

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**ESTUDO BIOQUÍMICO,  
IMUNOLÓGICO E FARMACOLÓGICO  
DO VENENO DO ESCORPIÃO  
*Hadruroides lunatus* E DA  
PATOLOGIA DO SEU  
ENVENENAMENTO**

---

**Fernanda Costal Oliveira**

BELO HORIZONTE

ABRIL DE 2013

FERNANDA COSTAL OLIVEIRA

**ESTUDO BIOQUÍMICO,  
IMUNOLÓGICO E FARMACOLÓGICO  
DO VENENO DO ESCORPIÃO  
*Hadruido lunatus* E DA  
PATOLOGIA DO SEU  
ENVENENAMENTO**

---

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Departamento de  
Bioquímica e Imunologia do Instituto de  
Ciências Biológicas, Universidade  
Federal de Minas Gerais como requisito  
parcial para obter o título de mestre em  
Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Carlos Chávez Olótegui

Co-orientadora: Dra. Clara Guerra Duarte

BELO HORIZONTE

ABRIL DE 2013

*Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunoquímica de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas, localizado na Universidade Federal de Minas Gerais. E contou com o apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.*

## **Agradecimentos**

Ao Dr. Carlos Chávez Olórtégui, pela orientação e ensinamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Dra. Clara Guerra Duarte, pela amizade, disponibilidade, confiança e coorientação que enriqueceu este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas pelas ajudas com os coelhos, camundongos, cálculos, experimentos, gráficos e ideias. Obrigada por tornarem meu ambiente de trabalho tão agradável e serem não apenas colegas, mas amigos de verdade.

À Karen, por ter tanto carinho e preocupação com os escorpiões e nunca se esquecer de cuidar deles.

À Gabi, por me acompanhar em todas as etapas, tanto da vida acadêmica quanto da vida pessoal. Obrigada por estar sempre presente.

Ao Eric, pelos ensinamentos no começo da minha Iniciação Científica que foram fundamentais para minha vida no laboratório.

Ao Dr. Ricardo Andrez, pela amizade, disponibilidade e pelas análises de espectrometria de massa.

Ao Dr. Cesar Bonilla Ferreira e ao Instituto Nacional del Lima, Peru, por ter capturado, mantido e fornecido os escorpiões e parte do veneno.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Marília Martins Melo, à Marina Cunha Longuinhos Pinto e a Dra. Maira Oliveira pela participação fundamental neste trabalho.

À Dra. Eliane Arantes, Karla Bordon e a todos do Laboratório de Físico-Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela ajuda nos experimentos de hialuronidase.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Sílvia Guatimosim, à Dra. Aline Alves Lara e ao Dr. Éneas Gomes, pela ajuda nos experimentos de transiente de cálcio.

Ao Prof. Dr. Ricardo Fujiwara e ao Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães, pela atenção e pelos experimentos de CBA.

## II

À Prof. Cleida Aparecida de Oliveira pela coloração das lâminas histológicas.

Ao Prof. Dr. Prof. Dr. Geovani Cassali pelas fotografias e análises das lâminas.

Aos meus amigos da Biologia, por ainda participarem da minha vida.

Aos meus colegas de Bases, por tornarem esse período mais descontraído.

Às minhas amigas Luiza, Bárbara, Paulinha, Ana Luiza e Mariana, pela amizade sincera, pelas conversas intermináveis e por estarem sempre ao meu lado.

A todos meus amigos de Lagoa Santa, por divertirem minha vida.

Ao Gabriel, pela atenção e por me ajudar com a formatação deste trabalho.

Ao Luan, pela amizade, carinho e incentivo.

À Dum, pelo livro que tanto me ajudou e pelos conselhos e conversas.

À minha irmã e ao Felipe, pelo amor e paciência.

Aos meus pais, pelo incentivo, dedicação, confiança e amor.

Aos animais experimentais e aos escorpiões, por possibilitarem a realização deste, e de tantos outros trabalhos.

Às agências financiadoras, que possibilitaram a execução deste trabalho.

E todos que, de alguma maneira, contribuíram para a concretização deste trabalho.

## Resumo

O escorpião *Hadruidoidea lunatus* é o mais abundante na costa central do Peru, onde ocorre a maioria dos casos de picadas e envenenamento em humanos. Entretanto, pouco se sabe sobre a composição e mecanismo de ação do veneno. Este trabalho tem como objetivo descrever, em termos gerais, a caracterização bioquímica, imunológica e farmacológica do veneno de *H. lunatus*, assim como analisar a patofisiologia de seu envenenamento. Análises proteômica mostraram que o veneno é composto por peptídeos e proteínas com massas moleculares que variam entre 2.000 e 70.000 Da. A dose letal média (DL<sub>50</sub>) via intracranial (i.c.) e via intraperitoneal (i.p.), em camundongos, foram determinadas como 0,1 mg/kg e 21,55 mg/kg, respectivamente. Como parâmetros bioquímicos foram avaliadas as atividades hialuronidásica, proteolítica e fosfolipásica. No que se refere aos estudos imunológicos, demonstramos a existência de reatividade cruzada entre o veneno de *H. lunatus* e os venenos de *Centruroides sculpturatus* e *Tityus serrulatus*. A análise hematológica de ratos envenenados mostrou que houve uma diminuição significativa de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos nesses animais. Além disso, foi detectado um aumento nos níveis séricos de proteínas totais, albumina e proteínas de fase aguda, assim como de CK, CK-MB, AST e LDH. Esses dados, juntamente com a observação de que a produção de IL-6 se encontrou elevada em camundongos envenenados, sugerem a presença de inflamação e lesão muscular. A análise histopatológica dos pulmões de ratos injetados com veneno revelou a presença de hemorragia difusa. Foi observado que o veneno estudado leva ao aumento da frequência cardíaca e causa diversas arritmias, prejudicando assim o funcionamento do coração. A análise do transiente de cálcio em cardiomiócitos confirmou o efeito deletério que o veneno exerce sobre o coração, já que este se apresentou diminuído. Estes dados sugerem que, apesar de apresentar toxicidade moderada para mamíferos o veneno de *H. lunatus* é capaz de induzir efeitos típicos do envenenamento escorpiônico, como as alterações cardiopulmonares demonstradas, além de apresentar atividades menos comuns nos venenos escorpiônicos, como a proteolítica e fosfolipásica, justificando o estudo mais aprofundado deste veneno.

## Abstract

*Hadruidoidea lunatus* scorpions are the most abundant in the Peruvian central coast, where occurs most of the cases of stings and envenoming in humans. However, little is known about the composition and mechanism of action of venom. The aim of this study is to describe, in general terms, the biochemical, immunological and pharmacological characterization of *H. lunatus* venom as well as to analyze the pathophysiology of its envenoming. Proteomic analysis showed that *H. lunatus* venom is composed of peptides and proteins with molecular weights ranging from less than 2,000 Da to greater than 70,000 Da. The median lethal dose (LD<sub>50</sub>) via intracranial (i.c.) and intraperitoneal (i.p.) in mice were determined as 0.1 mg/kg to 21.55 mg/kg, respectively. As biochemical parameters it were evaluated hyaluronidasic, proteolytic and phospholipasic activities. Regarding immunological studies, we demonstrated cross-reactivity between *H. lunatus* venom and *Tityus serrulatus* and *Centruroides sculpturatus* venoms. Hematological analysis in envenomed rats showed that there was a significant decrease of leukocytes, neutrophils, eosinophils and lymphocytes in these animals. Furthermore, an increase was detected in serum total proteins, albumin and acute phase proteins, as well as CK, CK-MB, AST and LDH levels. These data, together with the observation that IL-6 production was increased in envenomed mice, suggests the presence of inflammation and muscle injury. Lungs histopathological analysis revealed the presence of diffuse hemorrhage due *H. lunatus* envenoming. It was observed that *H. lunatus* venom increased heart rate and causes various arrhythmias, thereby impairing the heart functioning. Calcium transient analysis was measured in isolated cardiomyocytes and appeared diminished, confirming that *H. lunatus* venom exerts a deleterious effect on heart. These data suggest that, despite having moderate toxicity to mammals, the *H. lunatus* venom is capable of inducing effects typical of scorpion envenoming, such as the cardiopulmonary alterations demonstrated, and also presents less common activities observed in scorpion venoms, such as proteolytic and phospholipasic, justifying further studies of this venom.

## Sumário

1.	Introdução .....	1
1.1.	Os Escorpiões .....	1
1.2.	O Veneno e seu Mecanismo de Ação .....	3
1.3.	Sintomas Clínicos.....	7
1.4.	Diagnóstico e Tratamento .....	10
1.5.	Venenos e Biotecnologia.....	12
1.6.	Escorpiões do Gênero Hadruróides .....	13
2.	Objetivos .....	18
2.1.	Objetivo Geral .....	18
2.2.	Objetivos específicos.....	18
3.	Materiais e métodos.....	19
3.1.	Animais e venenos .....	19
3.2.	Caracterização Geral do Veneno .....	20
3.2.1.	Eletroforese.....	20
3.2.2.	Cromatografia .....	20
3.2.3.	Espectrometria de Massa.....	21
3.2.4.	Dose Letal Média (DL <sub>50</sub> ).....	21
3.2.5.	Atividade Proteolítica .....	21
3.2.6.	Atividade de Fosfolipase A <sub>2</sub> .....	22
3.2.7.	Atividade Hialuronidásica .....	22
3.3.	Caracterização Imunoquímica do Veneno.....	23
3.3.1.	Protocolos de Imunização .....	23
3.3.2.	Western Blot.....	24
3.3.3.	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	24
3.4.	Caracterização Patofisiológica do Envenenamento.....	25

3.4.1.	Análise Hematológica .....	25
3.4.2.	Análise Bioquímica.....	26
3.4.3.	Análise Histopatológica .....	26
3.4.4.	Análise da Produção de Citocinas .....	26
3.5.	Caracterização dos Efeitos Cardiotóxicos do Veneno.....	27
3.5.1.	Eletrocardiografia (ECG).....	27
3.5.2.	Análise do Transiente de Cálcio em Cardiomiócitos .....	28
4.	Resultados .....	30
4.1.	Caracterização geral do veneno.....	30
4.1.1.	Perfil eletroforético .....	30
4.1.2.	Espectrometria de Massas.....	31
4.1.3.	Perfil Cromatográfico .....	32
4.1.4.	Dose Letal Média (DL <sub>50</sub> ).....	33
4.1.5.	Atividade Proteolítica .....	34
4.1.6.	Atividade Fosfolipásica .....	35
4.1.7.	Atividade Hialuronidásica .....	39
4.2.	Caracterização Imunoquímica do Veneno.....	40
4.2.1.	Western Blot.....	40
4.2.2.	ELISAs .....	42
4.3.	Caracterização Patofisiológica do Envenenamento .....	45
4.3.1.	Análise Hematológica .....	45
4.3.2.	Análise Bioquímica.....	47
4.3.3.	Análise Histopatológica .....	49
4.3.4.	Análise da Produção de Citocinas .....	50
4.4.	Caracterização dos Efeitos Cardiotóxicos do Veneno.....	52
4.4.1.	Eletrocardiografia (ECG).....	52
4.4.2.	Análise do Transiente de Cálcio em Cardiomiócitos .....	56

5.	Discussão .....	58
6.	Conclusões .....	75
7.	Referências Bibliográficas.....	77
8.	Anexo.....	86

## Lista de Figuras

Figura 1- Distribuição mundial dos escorpiões. ....	1
Figura 2- Morfologia externa de um escorpião ( <i>Tityus aba</i> ).....	2
Figura 3- Representação esquemática de canais para sódio. São ilustrados os principais sítios de receptores para neurotoxinas.....	5
Figura 4- Distribuição geográfica da família Luridae na América do Sul... 14	14
Figura 5- Escorpião <i>Hadruroides lunatus</i> (OCHOA E PRENDINI, 2010). 15	15
Figura 6- Distribuição da espécie <i>H. lunatus</i> . ....	16
Figura 7- Eletrocardiografia em ratos.....	28
Figura 8- Perfil eletroforético do veneno de <i>H. lunatus</i> . ....	30
Figura 9- Perfil eletroforético do veneno de <i>H. lunatus</i> utilizando padrão de baixo peso molecular. ....	31
Figura 10- Espectrometria de massas do veneno total de <i>H. lunatus</i> .....	32
Figura 11- Perfil cromatográfico do veneno total de <i>H. lunatus</i> .....	33
Figura 12- Sintomas observados após injeção de veneno de <i>H. lunatus</i> (via intraperitoneal) em camundongos.....	34
Figura 13- Atividade proteolítica do veneno de <i>H. lunatus</i> sobre dimetilcaseína.....	35
Figura 14- Halos da atividade fosfolipásica do veneno de <i>H. lunatus</i> .....	36
Figura 15- Gráfico da atividade fosfolipásica (PLA <sub>2</sub> ) do veneno de <i>H. lunatus</i> . ....	37
Figura 16- Análise geral das frações do veneno de <i>H. lunatus</i> .....	39
Figura 17- Atividade hialuronidásica do veneno de <i>H. lunatus</i> e de <i>T. serrulatus</i> . ....	40
Figura 18- Western Blot mostrando imunogenicidade do veneno de <i>H. lunatus</i> . ....	41
Figura 19- Western Blot dos venenos de <i>A. australis</i> , <i>C. sculpturatus</i> , <i>T. serrulatus</i> e <i>H. lunatus</i> . ....	42
Figura 20- Reatividade cruzada dos soros anti-veneno de <i>H. lunatus</i> e anti-veneno de <i>T. serrulatus</i> frente a diferentes venenos escorpiônicos. 43	43
Figura 21- Reatividade cruzada dos soros anti-veneno total de <i>H. lunatus</i> , anti-veneno total e anti-toxinas de <i>T. serrulatus</i> frente aos venenos de <i>H. lunatus</i> e <i>T. serrulatus</i> . ....	45

Figura 22- Concentrações séricas de proteína total, albumina e globulinas. ....	47
Figura 23: Níveis séricos de uréia e creatinina. ....	48
Figura 24- Níveis séricos de CK e CK-MB. ....	49
Figura 25- Níveis séricos de AST e LDH. ....	49
Figura 26- Análise histopatológica de pulmões de ratos. ....	50
Figura 27- Produção citocinas em camundongos. ....	51
Figura 28- Produção de IL-6 em camundongos. ....	52
Figura 29- Eletrocardiografia mostrando aumento da frequência cardíaca nos animais tratados. ....	53
Figura 30- Eletrocardiografia mostrando complexo atrial e ventricular prematuro. ....	54
Figura 31- Eletrocardiografia de um animal do grupo tratado. ....	54
Figura 32- Eletrocardiografia de um animal do grupo tratado mostrando aumento de onda T. ....	55
Figura 33- Eletrocardiografia de dois animais do grupo tratado. ....	55
Figura 34- Transiente global de $Ca^{2+}$ em cardiomiócitos. ....	57
Figura 35- Funções das fosfolipases secretadas (sPLA <sub>2</sub> s). ....	64
Figura 36- Ondas de um ECG normal. ....	72
Figura 37- Resumo dos efeitos do envenenamento causado por <i>H. lunatus</i> . ....	74

**Lista de Tabelas**

Tabela 1- Principais respostas do organismo após estímulo de adrenalina e acetilcolina .....	8
Tabela 2- Citocinas pró e anti-inflamatórias.....	10
Tabela 3- Atividade fosfolipásica do veneno de <i>H. lunatus</i> .....	36
Tabela 4: Eritrograma de ratos envenenados.....	46
Tabela 5: Leucograma de ratos envenenados.....	46

**Lista de siglas e abreviaturas**

<b>APC</b>	Célula Apresentadora de Antígeno
<b>AST</b>	Aspartato Aminotransferase
<b>CBA</b>	<i>Cytometric Bead Array</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i>
<b>CK</b>	Creatina Cinase
<b>CK-MB</b>	Isoenzima cardíaca de creatina cinase
<b>DAB</b>	<i>Diamino Benzidine</i>
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose Letal Média
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>ECG</b>	Eletrocardiograma
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>FC</b>	Frequência Cardíaca
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>i.c.</b>	Intracranial
<b>IL</b>	Interleucina
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>INS</b>	<i>Instituto Nacional de Salud</i>
<b>LDH</b>	Lactato Desidrogenase
<b>MHC</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade
<b>MPD</b>	<i>Minimum Phospholipase Dose</i>
<b>PAGE</b>	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>PBS</b>	Tampão Salina Fosfato
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio

**TFA**

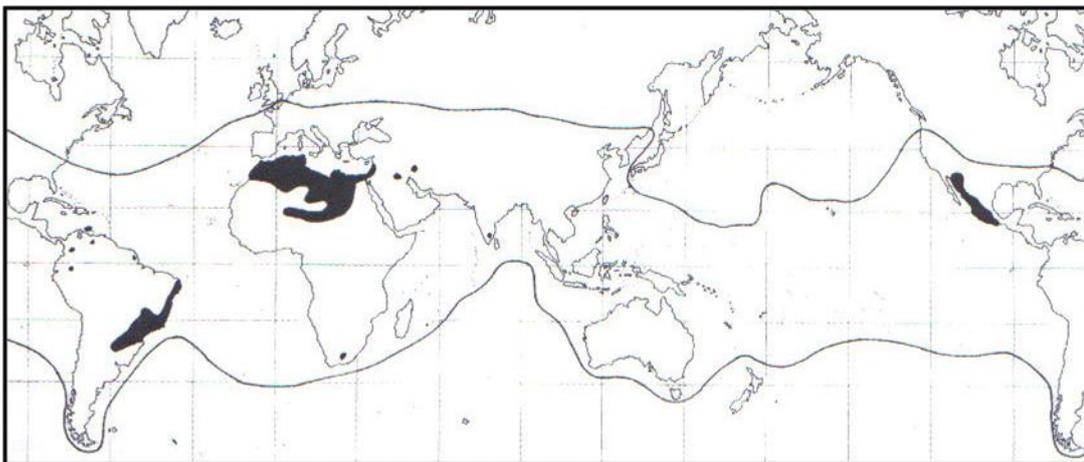
Acido Trifluoroacetico

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. OS ESCORPIÕES

Escorpiões são artrópodes quelicerados pertencentes à classe *Arachnida* e à ordem *Scorpiones*. Tem origem aquática e representam um grupo de animais primitivos com existência estimada de cerca de 400 milhões de anos (LOURENÇO e EICKSTDET, 2009).

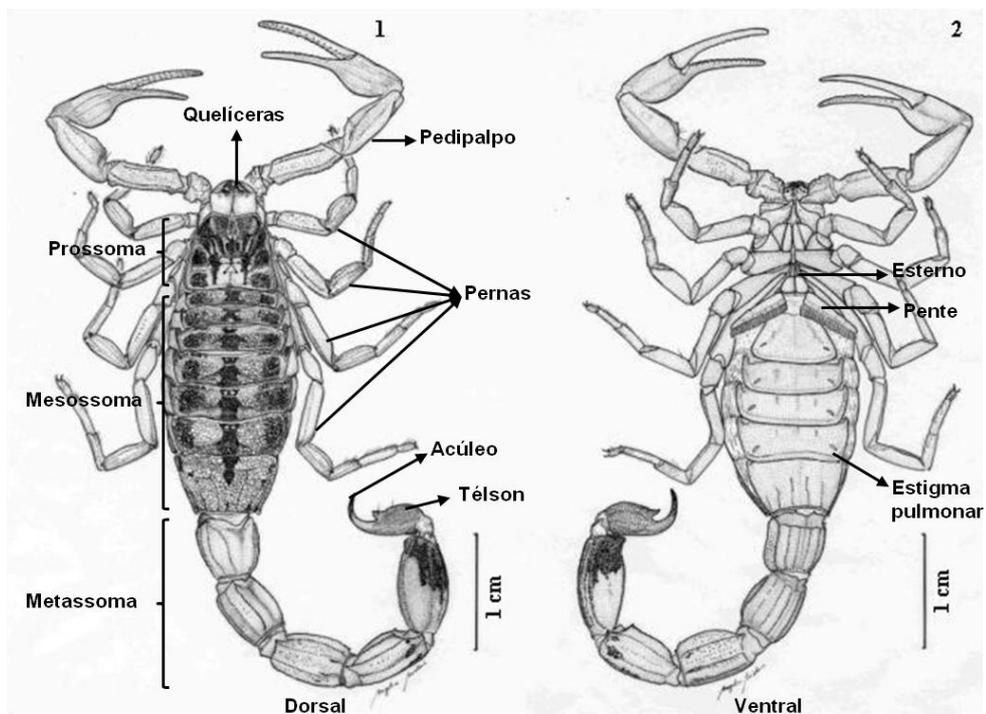
Atualmente, aproximadamente 1500 espécies de escorpiões já foram descritas. Apesar desse número não ser considerado expressivo, estes animais estão presentes em todos os continentes (exceto na Antártida), habitando principalmente as zonas tropicais e subtropicais do planeta (Figura 1). Os escorpiões tem a capacidade de sobreviver nos mais variados habitats, sendo encontrados tanto em regiões desérticas quanto em áreas de vegetação abundante (VELÁSQUEZ, 2004; LOURENÇO e EICKSTDET, 2009). Já foi relatada a existência desses aracnídeos em grandes altitudes, como nos Andes peruanos (aproximadamente 5.500m de altitude), e também em locais profundos como no interior de grutas (LOURENÇO e EICKSTDET, 2009). Sua alimentação é constituída principalmente de insetos e de outros pequenos animais (BARNES, 2005).



**Figura 1- Distribuição mundial dos escorpiões.**

As áreas habitadas por escorpiões estão delimitadas pelas linhas. As regiões hachuradas representam as áreas com grande ocorrência de escorpionismo (LOURENÇO e EICKSTDET, 2009).

Os escorpiões apresentam corpo revestido por exoesqueleto de quitina, que suporta e protege suas estruturas internas. O corpo é dividido em cefalotórax (prossoma), que é dorsalmente coberto por uma carapaça, e abdômen (opistossoma), que é composto pelo mesossoma e metassoma. A locomoção destes aracnídeos se dá através de quatro pares de patas articuladas inseridas no prossoma, que também podem ser úteis para escavação. O cefalotórax conta também com um par de quelíceras e um par de pedipalpos. O metassoma é constituída por cinco segmentos e na sua extremidade encontra-se o télson, que é formado pela vesícula e pelo acúleo. Na vesícula estão situadas duas glândulas (uma de cada lado do télson) produtoras e armazenadoras de veneno, que se ligam por dois canais a duas aberturas perto do final do télson, por onde o veneno é excretado (Figura 2). Quando necessário, as glândulas são comprimidas por musculatura lisa e o veneno é inoculado através do agulhão (LUTZ e MELLO, 1922; LOURENÇO e CUELLAR, 1995). Esses animais apresentam respiração aérea, realizada através de pulmões foliáceos e possuem na região ventral um apêndice denominado pente, que é uma característica exclusiva dos escorpiões (BRAZIL e PORTO, 2010).



**Figura 2- Morfologia externa de um escorpião (*Tityus aba*).** Representação esquemática das estruturas anatômicas da face dorsal (1) e ventral (2) do corpo de um escorpião (CANDIDO, 2005).

As espécies de escorpiões consideradas perigosas para o homem, e consequentemente as mais bem estudadas, pertencem à família Buthidae, sendo que esta família é uma das mais representativas tanto em número de gêneros quanto de espécies descritas (LOURENÇO e EICKSTDET, 2009). A patologia de acidentes causados por espécies de escorpiões com veneno altamente tóxico é amplamente estudada, porém existem poucos trabalhos que se referem a reações causadas por espécies consideradas pouco tóxicas, ainda que estas também exijam atenção médica, sendo importante ressaltar que todo escorpião é capaz de produzir secreções tóxicas que podem causar alterações no organismo no qual foi inoculado (DUTTO *et al.*, 2012). Tendo isto em vista, fica claro que acidentes com escorpiões considerados não letais são negligenciados, levando a escassez de informações acerca da composição de seus venenos assim como das alterações biológicas causadas pelo envenenamento. Faz-se necessário então, o aumento de estudos nessa área, e é esta a principal motivação do presente trabalho.

## **1.2. O VENENO E SEU MECANISMO DE AÇÃO**

A produção de substâncias tóxicas é um recurso de defesa que foi sendo adquirido ao longo da evolução dos mais variados organismos, tanto vertebrados quanto invertebrados (GAZARIAN *et al.*, 2005). No caso dos escorpiões, o veneno é constituído por uma mistura complexa de compostos químicos que abrangem desde pequenas moléculas até grandes proteínas, e está relacionado principalmente à predação e à digestão, tendo a defesa como papel secundário (LOURENÇO e CUELLAR, 1995; GAZARIAN *et al.*, 2005).

Sabe-se que o veneno de escorpiões é rico em neurotoxinas, proteínas de caráter básico de baixa massa molecular, que exercem seu efeito nocivo através de ligações de alta afinidade e especificidade com vários canais iônicos. Esta interação prejudica o funcionamento dos sistemas neuromuscular, respiratório e cardiovascular, fazendo com que as neurotoxinas sejam as principais responsáveis pelos efeitos tóxicos observados em envenenamentos. Além disso, devido a sua alta afinidade e especificidade por seu alvo, essas moléculas são muito utilizadas para o estudo do funcionamento de canais iônicos, sendo importantes para o campo da fisiologia (ROBERTS e WINK, 1998; COLOGNA *et al.*, 2009).

As neurotoxinas escorpiônicas são divididas em quatro grupos, de acordo com os canais em que atuam, como potássio ( $K^+$ ), cálcio ( $Ca^{+2}$ ), cloreto ( $Cl^-$ ) e sódio ( $Na^+$ ) (SRINIVASAN *et al.*, 2001).

Os canais para potássio são responsáveis pela regulação de vários processos fisiológicos como: excitabilidade neuronal e celular, regulação do batimento cardíaco, contração muscular, liberação de neurotransmissores, secreção hormonal, transdução de sinal e proliferação celular (MARTIN-EUCLAIRE *et al.*, 2009). As toxinas que afetam estes canais são pequenas, contendo 31 a 38 aminoácidos e são estabilizadas por três ou quatro pontes dissulfeto. Essas toxinas atuam como bloqueadoras de canais, pois se ligam à face extracelular do canal, impossibilitando a passagem de íons (POSSANI *et al.*, 1999).

Foram caracterizadas poucas toxinas escorpiônicas que atuam em canais para  $Ca^{+2}$  e  $Cl^-$  (GRANIER *et al.*, 2009). Canais para  $Ca^{+2}$  estão relacionados principalmente com a contração, secreção e neurotransmissão (CATTERALL *et al.*, 2007). As toxinas que agem em canais de  $Cl^-$  são chamadas de clorotoxinas e possuem 36 aminoácidos e quatro pontes dissulfetos (POSSANI *et al.*, 1999).

Canais para  $Na^+$  dependentes de voltagem são importantes para excitabilidade neuronal, já que são essenciais para iniciação e propagação de potenciais de ação em células excitáveis e participam da despolarização inicial da membrana (Figura 3) (CESTÈLE e CATTERAL, 2009). As toxinas que se ligam a estes canais são as principais responsáveis pela maioria dos sintomas observados no envenenamento escorpiônico (CUPO *et al.*, 2009). Elas são classificadas como de cadeia longa, possuem 60 a 76 aminoácidos e quatro pontes dissulfeto (POSSANI *et al.*, 1999). São divididas em tipo  $\alpha$  e tipo  $\beta$ , de acordo com o seu sítio de ligação nos canais de  $Na^+$  (mostrados na Figura 3) e com o efeito farmacológico característico resultante (JOVER *et al.*, 1980).

As toxinas do tipo  $\alpha$  são encontradas, principalmente, em escorpiões presentes na África, Europa e Oriente Médio, o chamado Velho Mundo, e se ligam no sítio 3 do canal de maneira dependente de voltagem, retardando o fechamento da comporta que inativa o canal. Estas neurotoxinas podem ainda ser separadas em três subgrupos. As  $\alpha$ -toxinas consideradas clássicas são altamente tóxicas para

mamíferos e se ligam com alta afinidade em sinaptossomos de ratos. As inseto  $\alpha$ -toxinas apresentam toxicidade baixa para mamíferos, sendo mais específicas para insetos. As toxinas  $\alpha$ -like podem atuar tanto em mamíferos quanto em insetos, porém não são capazes de se ligar a sinaptossomos de ratos da mesma maneira que a  $\alpha$ -clássica (BOSMANS *et al.*, 2007).

As toxinas do tipo  $\beta$  abrangem tanto toxinas específicas para mamíferos quanto para insetos e foram isoladas principalmente de escorpiões encontrados nas Américas, o chamado Novo Mundo (COHEN *et al.*, 2005). As toxinas do tipo  $\beta$  interagem com o sítio 4 dos canais para  $\text{Na}^+$  de maneira independentemente de voltagem, resultando em uma maior sensibilidade do canal, o que faz com que este se abra mais rapidamente. Toxinas do tipo  $\alpha$  e  $\beta$  também podem ser encontradas simultaneamente em um só organismo, como ocorre no escorpião sul-americano *T. serrulatus* (GORDON *et al.*, 1996; CESTÈLE e CATTERALL, 1998; BOSMANS *et al.*, 2007; CATTERALL *et al.*, 2007; COLOGNA *et al.*, 2009).

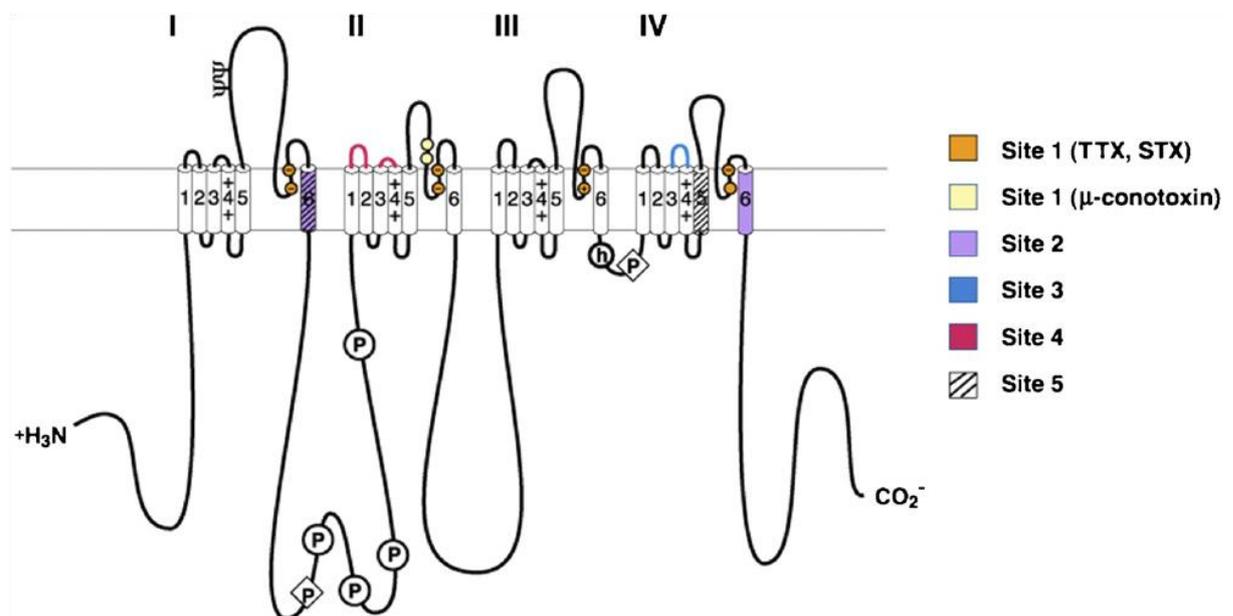


Figura 3- Representação esquemática de canais para sódio. São ilustrados os principais sítios de receptores para neurotoxinas (CATTERALL *et al.*, 2007).

Vários outros compostos também já foram identificados em venenos escorpiônicos, entre eles estão: sais diversos, açúcares, histamina, serotonina, peptídeos, proteínas, mucopolissacarídeos, nucleotídeos, aminoácidos, inibidores de

enzimas, entre outros. Enzimas como proteases, fosfolipase A<sub>2</sub> e hialuronidase também são encontradas e auxiliam na ação do veneno (COLOGNA *et al.*, 2009).

Enzimas proteolíticas são responsáveis por quebrar ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Muitos animais venenosos, inclusive escorpiões, apresentam essas moléculas como componentes de seus venenos (ALMEIDA *et al.*, 2002; SEYEDIAN *et al.*, 2010). No veneno escorpiônico, supõem-se que as proteases podem também estar relacionadas ao processo pós-traducional de outras moléculas que compõem o veneno. Além disso, essas enzimas estão envolvidas na inibição de agregação plaquetária, regulação da produção de citocinas ou ativação do sistema complemento. Assume-se também que estas moléculas têm a função de degradar o tecido da região onde o veneno é inoculado, aumentando a permeabilidade e facilitando o espalhamento dos seus componentes (ALMEIDA *et al.*, 2002; VENANCIO *et al.*, 2013). Assim, essas proteases podem atuar como fatores de espalhamento, mas também já foi aventado o seu papel como responsáveis diretas por patologias associadas ao envenenamento (ALMEIDA *et al.*, 2002).

As fosfolipases A<sub>2</sub> desempenham diversas funções celulares, como manutenção dos fosfolipídios de membrana, produção de prostaglandinas e leucotrienos, transdução de sinais, proliferação celular e contração muscular. Estas enzimas estão presentes nos venenos de muitos animais, como serpentes, abelhas, caramujo, aranhas e escorpiões (VALDEZ-CRUZ *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2010). A fosfolipase A<sub>2</sub> é responsável por catalisar a hidrólise de fosfolipídios de membrana, especificamente na ligação 2-acil éster de fosfolipídeos, levando à formação de lisofosfolipídios e ácidos graxos livres. Esta reação é dependente de cálcio e facilita a quebra de estruturas de membranas e o consequente espalhamento do veneno (WITTCOFF, 1951; MURAKAMI e KUDO 2002; VALDEZ-CRUZ *et al.*, 2007)

As hialuronidases estão presentes em diversos organismos tais como: bactérias, fungos, protozoários, insetos, aranhas, escorpiões, peixes, lagartos, serpentes e alguns mamíferos (FENG e GOPALAKRISHNAKONE, 2008). Estas moléculas formam um grupo de enzimas que catalisam a degradação do ácido hialurônico, um polissacarídeo de alta massa molecular presente na matriz extracelular e em tecidos conjuntivos (PESSINI *et al.*, 2001). Quando presente em

venenos, as hialuronidasas atuam como fatores de espalhamento, facilitando a difusão dos componentes tóxicos do veneno pelos tecidos e contribuindo para o envenenamento sistêmico (PESSINI *et al.*, 2001).

### **1.3. SINTOMAS CLÍNICOS**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, considerando os envenenamentos por animais peçonhentos, o escorpionismo é o segundo incidente de maior importância no mundo, representando um grave problema de saúde em várias partes do globo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (BAWASKAR, 2010; CUPO e HERING, 2002; IZQUIERDO *et al.*, 2012). Estima-se que ocorram aproximadamente 1,5 milhões de casos de envenenamento escorpiônico por ano, sendo que destes, cerca de 2.600 evoluem para morte. A incidência de escorpionismo é maior em indivíduos adultos, porém a ocorrência de quadros graves e a mortalidade são mais elevadas em crianças (CHIPPAUX, 2012).

Apesar da existência de várias espécies de escorpiões, a sintomatologia do envenenamento é similar para todas elas, variando basicamente na intensidade dos diferentes sinais que podem ser observados (BAWASKAR, 2012). Os quadros clínicos de escorpionismo podem ser classificados como leve, moderado ou grave, de acordo com os sintomas do envenenamento, que vão de dor intensa a insuficiência cardiorrespiratória, levando à morte (CUPO e HERING, 2002; GOKDEMIR e SEZER, 2013). A severidade do envenenamento está associada aos efeitos sistêmicos apresentados, como insuficiência respiratória, neurológica e cardiovascular (BAWASKAR, 2012).

O quadro clínico do envenenamento escorpiônico está relacionado com a liberação exacerbada de catecolaminas e acetilcolina, que ocorre após a despolarização das membranas das células excitáveis como consequência da interação das toxinas do veneno com seus sítios específicos nos canais para sódio. Os sintomas apresentados pelos pacientes dependem da ação predominante de acetilcolina ou adrenalina (REZENDE *et al.*, 1996; CUPO *et al.*, 2009). Os efeitos desses dois neurotransmissores no organismo são resumidos na Tabela 1.

**Tabela 1- Principais respostas do organismo após estímulo de adrenalina e acetilcolina (CUPO et al., 2009).**

Órgão efector	Estímulo simpático (Adrenalina)	Estímulo parassimpático (Acetilcolina)
Olho	Midríase	Miose
Glândulas	Sudorese	Aumento da secreção lacrimal, nasal, salivar, brônquica e pancreática
Coração/arteríolas	Aumento da frequência cardíaca e respiratória, vasoconstricção periférica, arritmia ventricular	Diminuição da frequência cardíaca, parada vagal, vasodilatação
Pulmão	Relaxamento da musculatura brônquica	Broncoconstricção, aumento da produção de muco
Trato alimentar		Aumento da motilidade, da secreção gástrica e pancreática e diminuição do tônus dos esfíncteres
Pele	Palidez, piloereção	
Genitais		Priapismo
Músculo		Tremores, contrações
SNC	Ansiedade, tremores, estimula a respiração	Excitação ou inibição
Efeitos metabólicos	Aumento da glicemia, ácido láctico e do consumo de oxigênio, diminuição da potassemia	Aumento da amilase
Medula adrenal		Aumento da secreção de adrenalina e noradrenalina

O primeiro sinal clínico detectado no envenenamento escorpiônico é a dor no local da picada, que ocorre imediatamente após a inoculação do veneno, sendo que em alguns casos pode-se detectar também edema, hiperemia, sudorese e piloereção. Dentro de poucas horas, as vítimas podem apresentar manifestações sistêmicas como agitação, taquicardia, sialorréia, sudorese, vômito, vasoconstricção periférica, hipo ou hipertensão, hiperglicemia, broncodilatação, dor abdominal entre outros (CUPO *et al.*, 2009; CHIPPAUX, 2012).

Sabe-se que as alterações cardiorrespiratórias e vasculares observadas nos quadros de envenenamento escorpiônico são resultantes principalmente da liberação excessiva de catecolaminas provocadas pela ação das neurotoxinas do veneno e são as maiores responsáveis pela severidade dos casos. Entre as manifestações mais importantes apresentadas em envenenamentos estão: arritmias, hiper ou hipotensão, edema pulmonar e insuficiência respiratória (ANDRADE *et al.*, 2004). A liberação exacerbada de neurotransmissores, no coração, afeta principalmente o nó sino atrial, que é o marcapasso cardíaco, podendo causar alterações no funcionamento desse órgão (PINTO *et al.*, 2010). Também já foi observado que o veneno exerce ação direta sobre as fibras cardíacas, levando ao desenvolvimento de arritmias e problemas de contratilidade (TEIXEIRA JR. *et al.*, 2001). Já foram relatadas alterações eletrocardiográficas em pacientes com envenenamento severo causado pela picada de *T. serrulatus*. Entre os achados mais comuns estão extrassístoles ventriculares, taquicardia sinusal, bradicardia e alterações relacionadas ao segmento ST e as ondas T e Q (CUPO e HERING, 2002; CUPO *et al.*, 2007)

A resposta inflamatória também contribui para o desenvolvimento do quadro clínico apresentado por vítimas de escorpionismo. Verificou-se que a inflamação sistêmica severa, induzida pela injeção de altas doses de veneno escorpiônico, é provocada pela produção de citocinas pró-inflamatórias. A liberação dessas moléculas desencadeiam sintomas como febre, anorexia, ativação da vasodilatação, hipotensão e aumento da permeabilidade dos vasos, que pode levar a disfunção múltipla dos órgãos e até morte ( PETRICEVICH, 2010; ADI-BESSALEM, 2012)

As citocinas geralmente podem ser classificadas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, dependendo da sua atividade. As citocinas pró-inflamatórias são responsáveis por iniciar a defesa contra patógenos, porém quando produzidas de maneira exacerbada são prejudiciais ao organismo, podendo ocasionar choque, falência múltipla dos órgãos e até morte. As citocinas anti-inflamatórias tem papel de tentar diminuir a resposta inflamatória e manter a homeostase, entretanto quando excessivamente produzidas podem levar a imunossupressão. O quadro clínico apresentado pelos pacientes é reflexo do resultado do balanço entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Detalhes sobre origem e ação dessas citocinas são mostrados na Tabela 2 (PETRICEVICH, 2010).

**Tabela 2- Citocinas pró e anti-inflamatórias (PETRICEVICH, 2010).**

Pró inflamatórias	Principal fonte celular	Atividade Biológica
IL-1 $\alpha$ e IL-1 $\beta$	Macrófago e Células apresentadoras de antígenos (APC)	Coestimulação de APC e células T, inflamação e febre, reação de fase aguda e hematopoiese
IL-2	Células Th1 e NK ativadas	Proliferação de células B e células T ativadas, funções NK
IL-6	Células Th2 ativadas, APC, outras células somáticas	Reação de fase aguda, trombopoiese, proliferação de células B, sinergismo com IL-1 e TNF em células T
IL-8	Macrófagos, outras células somáticas	Quimioatrativo para neutrófilos e células T
TNF- $\alpha$	Monócitos e macrófagos	Grande espectro de efeitos biológicos em metabolismo de lipídeos, coagulação e função endotelial. Induz inflamação e febre, reação de fase aguda, perda de peso e efeitos anti-tumorais
INF- $\gamma$	Células Th1 e NK ativadas	Induz MHC de classe I em todas as células somáticas, induz MHC de classe II em APC e células somáticas, ativa macrófagos, neutrófilos, células NK, promove efeitos imunológicos antivirais mediados por células.
Anti-inflamatória		
IL-4	Células Th2 e mastócitos	Proliferação de células B, crescimento de eosinófilos e mastócitos, expressão de IgE e MHC de classe II em células B, inibição da produção de monocinas
IL-10	Macrófagos e linfócitos	Exerce sua atividade anti-inflamatória inibindo ativação de NF $\kappa$ B induzida por TNF

#### **1.4. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO**

O diagnóstico de envenenamento escorpiónico é dado, principalmente pela associação de informações pessoais do paciente (como idade, sexo, acidentes anteriores) com a observação dos sintomas apresentados e análise de exames laboratoriais, quando necessário. Nos pacientes que apresentam efeitos sistêmicos pode-se detectar alterações em exames de bioquímica sérica, eletrocardiograma, urina e de radiografia (CUPO *et al.*, 2009).

Já foram identificadas variações em diversos marcadores clínicos que podem ser associados a distúrbios biológicos causados pelo envenenamento. Vítimas de escorpionismo normalmente apresentam leucocitose, hiperglicemia e acidose láctica (ADI-BESSALEM, 2008). Também já foram relatadas alterações eletrolíticas (CORREA *et al.*, 1997) e hematológicas (CUSINATO *et al.*, 2010). Lesões musculares causadas pelo envenenamento podem ser identificadas pela quantificação de

marcadores bioquímicos como aspartato-amino transferase (AST), creatina cinase (CK) e sua isoenzima CK-MB e troponina I que indicam injúria cardíaca; alanina-amino transferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina que sugerem lesão hepática e lipases e amilases que indicam alterações pancreáticas (CHIPPAUX, 2012).

O eletrocardiograma é uma ferramenta complementar utilizada para o diagnóstico de envenenamento. Em humanos picados por escorpião pode-se detectar taquicardia sinusal, marcapasso mutável, fibrilação atrial ou ventricular, complexos atriais e/ou ventriculares prematuros, infra ou supradesnivelamento do segmento ST e bloqueios atrioventriculares (CUPO *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2009).

A quantificação do veneno no soro de pacientes envenenados pode ser feita utilizando a técnica de ELISA, desenvolvida em 1994 por Chavez-Olórtegui e colaboradores. Este ensaio permite a correlação dos sintomas apresentados com a quantidade de veneno circulante no sangue, o que pode auxiliar na determinação do tratamento a ser utilizado (CUPO *et al.*, 2009).

Os sintomas locais observados nos envenenamentos escorpiônicos, como a dor, podem ser combatidos pela utilização de analgésicos e anti-inflamatórios (CHIPPAUX, 2012). A soroterapia utilizando soro antiescorpiônico específico é o tratamento mais aceito para neutralizar os efeitos tóxicos do veneno em casos de envenenamentos moderados e graves (GOKDEMIR e SEZER, 2013). O sucesso da imunoterapia depende da rapidez com que o soro é aplicado, assim como da via de administração e da potência do soro utilizado (HAMED, 2003).

A produção de soros se dá pela hiperimunização de animais, sendo utilizados preferencialmente cavalos, devido ao seu grande porte, que possibilita a coleta de maior volume sanguíneo. Entretanto, a administração de proteínas estranhas pode causar reações adversas no paciente, sendo a anafilaxia a mais importante delas (CHIPPAUX e GOYFFON, 1998).

## 1.5. VENENOS E BIOTECNOLOGIA

Os animais venenosos sempre foram conhecidos pela letalidade e problemas clínicos causados pela inoculação de seus venenos. Entretanto, já se sabe que muitas das toxinas produzidas por estes organismos podem ser utilizadas tanto como ferramentas para investigar mecanismos fisiológicos quanto como objeto de estudo para o desenvolvimento de fármacos (RATES *et al.*, 2011).

Na China, toxinas escorpiônicas são utilizadas como drogas há quase 2000 anos. O conceito chinês “combater o veneno com outro veneno” foi a base para o uso do veneno total de escorpiões contra: epilepsia, espasmo, tétano e outras doenças (FAN *et al.*, 2010). Os venenos escorpiônicos, como dito anteriormente, contêm proteínas, nucleotídeos, lipídios, e outras moléculas. Pequenos peptídeos também estão presentes e apresentam várias atividades biológicas como: potenciação da bradicinina, atividade antimicrobiana e hemolítica, modulação do sistema imune e atividades similares a de hormônios (RATES *et al.*, 2008). Peptídeos potenciadores de bradicinina reduzem a pressão sanguínea. Essas moléculas foram primeiramente isoladas do veneno de *Bothrops jararaca*, e posteriormente também foram encontradas em outras serpentes, aranhas e escorpiões. Uma família destes peptídeos foi identificada no veneno do escorpião *T. serrulatus* e foi denominada *T. serrulatus* Hipotensinas (VERANO-BRAGA *et al.*, 2008).

Alguns venenos escorpiônicos tem sido utilizados em tratamentos de doenças, como é o caso do veneno do escorpião cubano *Rhopalurus junceus*, conhecido como escorpião azul. Este aracnídeo não representa perigo para mamíferos e uma solução diluída de seu veneno, conhecida como “Escozul”, tem sido utilizada principalmente em Cuba como tratamento alternativo contra o câncer (GARCÍA-GÓMEZ *et al.*, 2011).

A clorotoxina, toxina específica para canais para  $Cl^-$ , encontrada no escorpião israelense *Leiurus quinquestriatus*, se liga especificamente ao receptor MMP2 associado a canais de  $Cl^-$ , que são expressos em grande quantidade em gliomas (tumores de células da glia), mas não em células saudáveis. Uma versão sintética desse peptídeo, TM-601, ligado ao iodo radioativo já foi aprovado pela *Food and Drugs*

*Administration* (FDA) como tratamento contra esse tipo de câncer (MAMELAK *et al.*, 2006).

O avanço da tecnologia possibilitou, e possibilita cada vez mais, um estudo detalhado destes venenos e de suas atividades. Diante da existência de tantas moléculas com propriedades que podem ser usadas para o desenvolvimento de fármacos, e considerando que elas podem ser encontradas tanto no veneno de escorpiões de importância médica, quanto nos não letais, fica evidente a importância de estudar e caracterizar os diversos venenos existentes.

### **1.6. ESCORPIÕES DO GÊNERO HADRUIOIDES**

O gênero *Hadruioides* (Pocock, 1893) está incluído na família Luridae (cuja distribuição está representada na Figura 4) e na subfamília Caraboctoninae. Este gênero é composto por dezesseis espécies de escorpiões de tamanho pequeno a médio (até 80 mm), de coloração castanha amarelada com manchas mais escuras (MAURY, 1974; OCHOA e PRENDINI, 2010). Espécies pertencentes ao gênero *Hadruioides* já foram encontradas na Bolívia, Chile, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (KARSCH, 1879; POCOCK, 1900; MELLO-LEITÃO, 1945; ESQUIVEL DE VERDE, 1968; KINZELBACH, 1973; MAURY, 1974; CEKALOVIC, 1983; SISSON e FET, 2000). Entretanto, atualmente escorpiões do gênero *Hadruioides* ocorrem no Equador, Peru, norte do Chile e diversas ilhas, incluindo as ilhas Galápagos (CEKALOVIC, 1966; MAURY, 1974; FRANCKE e SOLEGLAD, 1981; OCHOA, 2005). A maior parte dessas espécies tem distribuição limitada, exceto por *H. charcasus* e *H. lunatus*, que, aparentemente, se distribuem mais amplamente nesses países. Porém, acredita-se que este fato possa ser atribuído às identificações errôneas, devido à taxonomia confusa deste grupo (OCHOA e PRENDINI, 2010).



**Figura 4- Distribuição geográfica da família Luridae na América do Sul.**

As áreas mais escuras mostram onde são encontrados escorpiões desta família (LOURENÇO E EICKSTDET, 2009).

O Peru é um dos países de maior ocorrência de escorpiões do gênero *Hadruidoidea*. Este país apresenta topografia acidentada, especialmente pela presença da cordilheira dos Andes, que corta o país do sul para o norte, dividindo-o em três macrorregiões: área do deserto, vales andinos e área de florestas úmidas. Esta diversidade ambiental permite que esta nação possua uma fauna rica e diversificada, com ampla distribuição geográfica. Entretanto essa biodiversidade ainda não foi devidamente estudada (OCHOA, 2005).

No Peru já foram relatados escorpiões de pelo menos quarenta e uma espécies e seis famílias: Bothriuridae, Buthidae, Chactidae, Euscorpidae, Ischnuridae e Luridae (VELÁSQUEZ, 2004). Somente no sul do país foram descritas três famílias, cinco gêneros e vinte e quatro espécies. Entre as espécies encontradas estão: *Tityus footei*, *Tityus soratensis*, *Hadruidoidea lunatus*, *Hadruidoidea mauryi*, *Brachistosternus (B.) ehrenbergii*, *Brachistosternus (M.) andinus*, *Brachistosternus (M.) peruvianus*, *Brachistosternus (L.) titicaca* e *Orobothriurus ampay* (OCHOA, 2005).

Treze das dezesseis espécies que compõem o gênero *Hadruidoidea* são encontradas no Peru. Quatro (*H. charcasus*, *H. chinchaysuyu*, *H. geckoi* e *H. leopardus*) ocorrem nas áreas de floresta seca no norte do Peru; três (*H.*

*bustamantei*, *H. carinatus* e *H. mauryi*) habitam os vales inter-Andinos e seis (*H. aguilari*, *H. graceae*, *H. juanchaparroi*, *H. lunatus*, *H. tishqu* e *H. vichayitos*) vivem no deserto, ao longo da costa do Pacífico (OCHOA E PRENDINI, 2010).

Os escorpiões peruanos começaram a ser estudados há mais de 40 anos, sendo que as primeiras informações toxicológicas foram resultantes principalmente de pesquisas sobre a espécie *H. lunatus* (Figura 5) (AGUILAR, 1968; ESCOBAR *et al.*, 2002). Como destacado em vermelho na Figura 6, *H. lunatus* habita o Chile, Equador e Peru. Porém, Em 2010, Ochoa e colaboradores relataram que encontraram escorpiões da espécie *H. lunatus* somente em Lima e na Isla Pachacamac, ambos no Peru. Segundo os autores, os relatos de existência de *H. lunatus* no Chile e no Equador seriam resultantes de erros de identificação e espécie *H. lunatus* estaria sendo confundida com outras espécies do gênero *Hadruroides*.

*H. lunatus* é a espécie mais abundante na costa central do Peru, onde ocorre a maioria dos casos de picadas e envenenamento em humanos (ZVALETA *et al.*, 1981). O Ministério da Saúde do Peru (Instituto Nacional de la Salud- INS) relatou a ocorrência de 41 casos de picadas por *H. lunatus* em Lima no ano de 2009. Apesar da picada não ser considerada fatal, ela causa dor e ardor, sendo aconselhado tratamento dos pacientes com analgésico e anti-inflamatório.



**Figura 5-** Escorpião *Hadruroides lunatus* (OCHOA E PRENDINI, 2010).



**Figura 6- Distribuição da espécie *H. lunatus*.**

A distribuição de escorpiões *H. lunatus* está representada pela área destaca em vermelho (Fonte: <http://www.toxinology.com>).

São poucos os estudos desenvolvidos acerca da caracterização de propriedades e ação do veneno de *H. lunatus*. Trabalhos anteriores já relataram alguns efeitos causados por venenos de escorpiões do gênero *Hadruidoies*. Em 1981, Zavaleta e colaboradores testaram o veneno de *H. lunatus* em camundongos e constataram sua baixa letalidade para mamíferos ( $DL_{50} = 68 \text{ mg/kg}$ ). Neste mesmo trabalho, foi observado que a injeção de veneno de *H. lunatus* em cães causava a queda da pressão sanguínea. Em 2004, Velásquez e Escobar identificaram uma toxina de natureza básica de 4,5kDa no veneno de *H. mauryi*, denominada Hm3, que causou contração e paralisia no membro inoculado de camundongos, assim como elevou os níveis plasmáticos creatina quinase e lactato desidrogenase. Em 2008, Escobar e colaboradores relataram a existência de peptídeos com atividade antibacteriana também no veneno de *H. mauryi*.

Apesar da existência dos trabalhos citados acima, a composição e os mecanismos de ação das proteínas responsáveis pelos efeitos toxinológicos ou

farmacológicos do veneno desses escorpiões ainda são pouco conhecidos. Dessa forma, tendo em vista a falta de estudo sobre o veneno do escorpião *H. lunatus*, seu potencial biotecnológico e sua possível relevância médica, este trabalho visa desenvolver a caracterização do veneno do escorpião em questão, assim como das alterações biológicas causadas por seu envenenamento em mamíferos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar de forma geral o veneno do escorpião peruano *Hadruidoidea lunatus* quanto a suas propriedades bioquímicas e imunológicas e descrever a patofisiologia de seu envenenamento em roedores.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar o conteúdo proteico do veneno por SDS-PAGE, HPLC e espectrometria de massas;
- Determinar a dose letal média do veneno por via intraperitoneal e intracranial;
- Investigar as suas possíveis atividades proteolítica, fosfolipásica e hialuronidásica;
- Avaliar a imunogenicidade e antigenicidade do veneno de *H.lunatus* e possíveis reações cruzadas dos anticorpos específicos produzidos contra outros venenos através do método de ELISA e Western Blot;
- Avaliar, no sangue de animais envenenados, alterações no hemograma e na bioquímica sérica;
- Avaliar alterações na histologia do coração, pulmão, rim e fígado de ratos envenenados;
- Avaliar a cinética da produção de citocinas em camundongos envenenados;
- Avaliar possíveis alterações cardíacas causadas pelo veneno de *H.lunatus*, através de eletrocardiograma dos animais e da medida da corrente transiente de cálcio em cardiomiócitos isolados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS E VENENOS

Escorpiões da espécie *H. lunatus* foram coletados nas “lomas” (elevações naturais de baixa altitude com declive suave e extenso, comuns do relevo peruano) de Atocongo (Lima, Peru) e mantidos no *Centro Nacional de Producción de Biologicos do Instituto Nacional de Salud* (INS), em Lima, Peru. Os escorpiões foram mantidos em caixas de plástico com água disponível para o consumo e alimentados semanalmente com baratas. O veneno foi extraído por eletroestimulação do télson (12 Volts) diluído em água Milli-Q e armazenado à -20 °C até seu uso. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951).

Escorpiões *Tityus serrulatus* foram coletados na região de Belo Horizonte e mantidos na "Seção de Animais Peçonhentos" da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) de Belo Horizonte, Brasil. O veneno foi obtido por eletroestimulação do télson, liofilizado e armazenado a -20 °C. O veneno de escorpiões *Androctonus australis* Hector foi cedido pelo Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, Marseille, France, e o veneno de *Centruroides sculpturatus* foi adquirido da Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.

Camundongos C57BL/6, “Swiss” (pesando 18–22 g) e ratos Wistar (pesando de 110-150 g) foram mantidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil. Todos os animais receberam água e comida *ad libitum*.

Coelhos “New Zealand” de oito a nove semanas de idade foram usados para produção de soro anti-veneno de *H. lunatus*, anti-veneno de *T. serrulatus*, anti-toxinas de *T. serrulatus* (Ts1, Ts2, TsIII) e anti a anatoxina de *T. serrulatus* TsNTxP. Os animais foram mantidos nas mesmas condições descritas acima.

Os protocolos experimentais para realização deste trabalho foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da UFMG-CETEAUFMG. (Protocolo nº 092/11).

## **3.2. CARACTERIZAÇÃO GERAL DO VENENO**

### **3.2.1. Eletroforese**

Amostras de veneno de *H. lunatus* foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE seguindo o método de Laemmli (1970). Foi utilizado gel 12,5, 15% ou 20% e, as amostras em condições redutoras foram diluídas 1:1 em tampão de amostra (Tris-HCl 0,7 M pH 6,8, azul de bromofenol a 0,25% p/v, glicerol a 10% v/v,  $\beta$ -mercaptoetanol 2,5% v/v e SDS 4% p/v), homogeneizadas, fervidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas no gel. Foram aplicados 20  $\mu$ g de veneno e a eletroforese foi realizada a 120 V, com duração de aproximadamente 90 minutos e os géis foram corados com Coomassie Blue ou prata. Para a coloração de Coomassie o gel foi colocado por 18 horas em 100 mL de solução de Coomassie Blue (0,275 g de Coomassie Blue, 50 mL de metanol, 10 mL de ácido acético glacial e 50 mL de água destilada). Depois de corado, o gel foi imerso em 100 mL de solução descorante (50 mL de metanol, 250 mL de ácido acético e 400 mL de água destilada) para a visualização das bandas. Para coloração por prata, o gel foi mergulhado em 100 mL de solução fixadora (50 mL de Metanol, 12 mL de Ácido Acético e 40  $\mu$ L de formaldeído, em água destilada) por pelo menos 1 h. Então a solução foi retirada e o gel foi lavado três vezes de 7 min cada com água destilada. Posteriormente o gel foi colocado em uma solução de tiosulfato de sódio 0,004% p/v durante 1 minuto. Após três ciclos de lavagem o gel foi imerso em 100 mL de uma solução contendo 0,1 g de  $\text{AgNO}_3$  e 75  $\mu$ L de formaldeído em água destilada). Então foi feita uma rápida lavagem e o gel foi colocado na solução de desenvolvimento (6 gramas de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  6% p/v, 50  $\mu$ L de formaldeído e 2 mL de tiosulfato de sódio em água destilada). Após o aparecimento das bandas, a solução de desenvolvimento foi descartada e a reação foi interrompida pela solução de parada (50 mL de Metanol, 12mL de Ácido acético em 100 mL de água destilada).

### **3.2.2. Cromatografia**

A separação cromatográfica das frações do veneno foi realizada em fase reversa utilizando *High Performance Liquid Chromatography* HPLC (Shimadzu). Um miligrama de veneno bruto foi aplicado em uma coluna de fase reversa Shimadzu-Pack CLC-ODS C18 (6x150 mm), eluída a 1mL/min. Após equilibrar a coluna, as

frações do veneno foram separadas por gradiente linear de 0 até 60% de Acetonitrila- TFA 0,1%, em 60 min. Em seguida foi aplicado um gradiente linear de 60 a 100% de Acetonitrila- TFA 0,1%, por 30 min. O ensaio cromatográfico foi monitorado por absorvância a 214 e 280 nm.

### **3.2.3. Espectrometria de Massa**

Tanto o veneno total quanto algumas frações obtidas da cromatografia foram submetidos a análise por espectrometria de massas MALDI-TOF. A análise foi realizada utilizando o instrumento MALDI-TOF-TOF AutoFlex III™ (Bruker Daltonics) em modo positivo/linear controlado pelo software FlexControl™. A calibração para a análise do veneno total foi feita utilizando *Peptide Calibration Standart I*, *Protein calibration standart I* e *Protein Calibration Standart II* (Bruker Daltonics) como padrão. Foram utilizadas as matrizes  $\alpha$ -ciano ou ácido sinapínico sendo que para a análise 1  $\mu$ L de matriz foi adicionado à 1  $\mu$ L de amostra. As amostras foram aplicadas em alvos MTP AnchorChip™ 400/384 (Bruker Daltonics) usando protocolos padrão para o método da gota seca.

### **3.2.4. Dose Letal Média (DL<sub>50</sub>)**

A letalidade foi avaliada pelas vias intraperitoneal (i.p.) e intracranial (i.c.). Grupos de quatro camundongos C57BL/6 receberam injeções via i.p. com diferentes doses de veneno (de 11,53 a 32,95 mg/kg) diluído em 0,5 mL de PBS-BSA 0,1%.

Para DL<sub>50</sub> via i.c., camundongos Swiss foram separados em grupos de seis animais, sendo que cada grupo recebeu uma dose de veneno diferente (variando de 0,075 a 0,8 mg por quilo) diluído em 5  $\mu$ L de PBS-BSA 0,1%.

Vinte quatro horas depois as mortes foram contabilizadas e a DL<sub>50</sub> foi calculada usando o programa de análise Probit (Finney, 1971).

### **3.2.5. Atividade Proteolítica**

A atividade proteolítica foi determinada utilizando dimetilcaseína (Sigma) como substrato. O ensaio foi realizado de acordo com o método de Lin et al. (1969), com modificações descritas por Sanchez et al. (2000). Em resumo, 250  $\mu$ L de dimetilcaseína 0,2% (em PBS) foram adicionados a 250  $\mu$ L de tampão HEPES 50

mM, pH 7,4, sendo então incubados por 5 minutos a 37 °C. Aplicou-se 5, 10, 20 e 40 µg de veneno e incubou-se por 30 minutos a 37 °C e mais 5 minutos em banho fervente. Após a adição de 250 µL de TNBS 0,1% e 250 µL de bicarbonato de sódio 4% a solução foi incubada por 30 minutos a 50 °C e em seguida foram adicionados 250 µL de SDS 10% e 125 µL de HCl 1N. Os valores da absorbância foram então determinados a 340 nm. Uma unidade foi definida como  $\Delta A$  340 nm/min (em relação ao branco). A atividade foi expressa em relação à concentração de proteínas (mg).

### **3.2.6. Atividade de Fosfolipase A<sub>2</sub>**

A atividade da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> foi determinada através de ensaio hemolítico indireto de acordo com Gutierrez *et al.* (1988) com pequenas modificações. Concentrações crescentes de veneno de *H. lunatus* (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 e 1 µg) foram preparadas em um volume final de 15 µL de PBS e adicionadas a poços de 2 mm em gel de agarose (0.8% em tampão fosfato pH=8.1) contendo 1.2% de eritrócitos de coelhos, 1.2% de gema de ovo, como fonte de lecitina, e 100mM CaCl<sub>2</sub>. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas e os diâmetros dos halos hemolíticos foram medidos. Como controle, foram testados 15 µL de PBS sozinho em um poço do gel. Uma unidade (*Minimum Phospholipase Dose* - MPD) corresponde à concentração mínima de veneno que produz um halo hemolítico de 10 mm diâmetro. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

### **3.2.7. Atividade Hialuronidásica**

A detecção da atividade hialuronidásica e de sua massa molecular relativa foi realizada de acordo com Cevallos *et al.* (1992).

Foi utilizado o sistema de eletroforese descrito por Laemmli (1970) com a modificação de que o ácido hialurônico (Sigma) foi incorporado (0,5 mg/mL) à matriz do gel durante a polimerização. Foram aplicados 5 e 10 µg dos venenos de *H. lunatus* e *T. serrulatus* e a eletroforese foi realizada a 110V à temperatura ambiente até o indicador alcançar o final do gel. Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes em 50 mL de uma solução de Triton X-100 a 5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 5,8, com 0,15M de NaCl, por uma hora; uma vez em 50 mL de Triton X-100, 0,05% em tampão pH 5,8, por uma hora e finalmente em 50 mL de tampão pH 5,8 sem Triton X-100 por 10 min. Todos estes passos foram realizados à

temperatura ambiente sob agitação, e permitiu a troca do dodecil sulfato de sódio por Triton X-100 e equilibrar o gel em um tampão adequado para a atividade enzimática. O gel foi então transferido para o tampão sem Triton X-100, colocado em um recipiente fechado e incubado a 37°C pelo tempo desejado. Após a incubação, o gel foi lavado duas vezes por 15 min em 50 mL de tampão Tris-HCl 0,015 M, pH 7,95, e colocado na solução corante sob rotação suave por pelo menos 5 horas e mantida no escuro até ser fotografado. Uma solução estoque de 0,1% de *Stains-all* (1-ethyl-2-[3-(1-ethylnaphthol [1,2-d] thiazolin-2-ylidene) - 2 - methylpropenyl] naphthol [1,2-d] thiazolium bromide; Cat. No. 2718 da *Eastman Kodak Company*, Rochester, NY, U.S.A.) em formamida pura foi guardada em um recipiente escuro. A solução corante foi preparada no momento de sua utilização, combinando 5 mL da solução corante estoque com 5 mL de formamida, 20 mL de isopropanol, 1,5 mL de Tris-HCl 1M, pH 7,95, e água deionizada para um volume de 100 mL (Green et al., 1973). Antes de registrar fotograficamente, o gel corado foi colocado em 5% de formamida e 20% de isopropanol, em Tris-HCl 0,015 M, pH 7,95, até que as bandas de atividade tornarem-se claras vistas contra um intenso fundo azul de ácido hialurônico não hidrolisado. As proteínas padrões de peso molecular foram sempre separadas na outra extremidade da placa de gel; imediatamente após a eletroforese, a linha correspondente foi cuidadosamente seccionada e corada com Coomassie brilliant blue R-250, visto que o ácido hialurônico não reage com este corante.

As amostras para eletroforese foram preparadas misturando o tampão de amostra (sem  $\beta$ -mercaptoetanol), à temperatura ambiente, visto que tanto a presença de agente redutor quanto o aquecimento da amostra abole irreversivelmente a atividade enzimática dos venenos testados.

### **3.3. CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO VENENO**

#### **3.3.1. Protocolos de Imunização**

Fêmeas adultas de coelhos New Zealand (2.0 – 2.5 kg) foram usadas para produção de anticorpos anti-veneno de *H. lunatus*, *T. serrulatus* anti-toxinas de *T. serrulatus* (Ts1, Ts2 e Ts3) e anti anatoxina de *T. serrulatus* TsNTxP. Após coletar soro pré immune, os animais imunizados com veneno receberam uma injeção inicial de 100  $\mu$ g de veneno total com adjuvante completo de Freund. Três reforços foram

feitos subcutaneamente 14, 21 and 28 dias depois com uma dose menor (50 µg) em adjuvante incompleto de Freund. Já os animais imunizados com Ts1, Ts2, Ts3 e TsNTxP receberam a primeira dose de 10 µg de antígeno e os três reforços foram feitos com 25 µg seguindo os mesmos intervalos descritos anteriormente. O sangue destes animais foi coletado e centrifugado, uma semana depois da última injeção.

### **3.3.2. Western Blot**

Para avaliar a imunogenicidade do veneno de *H. lunatus*, foram aplicados 10 e 20 µg deste veneno em gel contendo 12,5% de acrilamida. Já para os estudos comparativos foi realizada eletroforese SDS-PAGE (gel 20%) com 13,5 µg de veneno de *A. australis*, *C. sculpturatus*, *T. serrulatus* e *H. lunatus*, como descrito anteriormente. Após a corrida os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose (Towbin, 1979) e estas foram bloqueadas por 1 hora com PBS contendo 0,35% de Tween. Depois de três lavagens de 5 minutos com PBS-Tween 0,05%, as membranas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos com soro de coelho anti-*H. lunatus* na diluição de 1:1500. As membranas foram lavadas (PBS-Tween 0,05%) mais três vezes e então foram incubadas por 1 hora com IgG anti-coelho conjugada com peroxidase (1:4000 ou 1:8000). Após três lavagens de 5 minutos com PBS-Tween 0.05%, as proteínas imunorreativas foram detectadas utilizando DAB/cloronaftol de acordo com as instruções do produtor.

### **3.3.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Placas flexíveis de microtitulação (BD Biosciences, USA) foram sensibilizadas durante toda noite a 5 °C com 100 µL de uma solução de tampão carbonato pH 9.6 contendo 10 µg/mL de veneno total de *H. lunatus*, *T. serrulatus*, *A. australis* ou *C. sculpturatus*. Após lavagem com solução salina contendo 0,05% de Tween, os poços foram bloqueados com caseína 2% em PBS por 1 hora a 37 °C. Os poços foram lavados novamente e em seguida foram adicionados soros pré imune e imune de coelhos em diferentes diluições sendo incubados por 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas e a IgG anti-coelho conjugada com peroxidase foi incubada por 1 hora a 37 °C na diluição de 1:8000. Após lavagem das placas foram adicionados 100 µL de o-fenilenediamina (0,33 mg/ml em tampão citrato, pH 5,2, na presença de 0,04% de peróxido de hidrogênio). A reação foi parada após 20 minutos pela adição de 20

$\mu\text{L}$  de uma solução de ácido sulfúrico (1:20). Os valores de absorbância foram determinados a 492 nm usando leitor de placas de ELISA (BIO-RAD, 680 models). Os experimentos foram feitos em duplicata e as médias foram calculadas.

### **3.4. CARACTERIZAÇÃO PATOFISIOLÓGICA DO ENVENENAMENTO**

Ratos Wistar (110-150 g) foram distribuídos em dois grupos experimentais, cada um com seis animais. Animais do grupo controle receberam 400  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e os do grupo tratado foram inoculados com 400  $\mu\text{L}$  de água ultra pura contendo 750  $\mu\text{g}$  de veneno de *H. lunatus*. A administração do veneno foi realizada subcutaneamente na região interescapular.

Trinta minutos após a injeção os animais foram anestesiados via intramuscular com uma mistura de hidróclorido de xilazina (10 mg/kg) e cetamina (75 mg/kg). O sangue foi coletado por punção intracardíaca 30 min depois da administração de placebo ou veneno. Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por hipovolemia por punção intracardíaca e submetidos a necrópsia.

#### **3.4.1. Análise Hematológica**

Para avaliar alterações no hemograma de ratos envenenados, foram investigados os níveis de plaquetas, hemácias, hemoglobina (Hb), volume globular (VG), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM). As contagens totais de eritrócitos e leucócitos e de concentração de hemoglobina foram realizadas com auxílio de contador eletrônico. Para contagem diferencial de leucócitos e total de plaquetas, foram feitos esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro, fixados e corados com panótico, de acordo com Ferreira Neto *et al.* (1982). O volume globular foi mensurado utilizando centrífuga para microhematócrito. A concentração das proteínas totais foi determinada por refratometria.

O perfil eletroforético das proteínas séricas foi obtido por eletroforese de gel de agarose (*Celmgel*, CELM *general agarose gel*) e o gel foi corado com Ponceau. Visando a determinação das concentrações de albumina e globulina, foi utilizado o software CELM SE-250.

### **3.4.2. Análise Bioquímica**

Para avaliar o possível dano tecidual causado pelo envenenamento, foram determinadas as concentrações séricas de diversas proteínas nos ratos envenenados. O perfil bioquímico foi estabelecido por análise cinética de creatina cinase (CK), isoenzima CK-MB, lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST) com kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil) utilizando *TP analyser*.

### **3.4.3. Análise Histopatológica**

Coração, pulmões, rins e fígado coletados dos animais envenenados e eutanasiados foram fixados em formol a 10% neutro tamponado e embebidos em parafina. Confeccionou-se cortes histológicos de 4 µm que foram corados pela hematoxilina-eosina e avaliados microscopicamente.

### **3.4.4. Análise da Produção de Citocinas**

Para esta análise específica, foram utilizados camundongos Swiss (18-22 g), divididos em seis grupos de cinco animais cada. Três grupos foram injetados subcutaneamente com 0,1 mL de solução de PBS contendo 20 µg de veneno total de *H. lunatus*. Os três grupos restantes foram utilizados como controle e receberam apenas 0,1 mL de PBS pela mesma via. Foram definidos três intervalos (30, 180 e 360 min) e a cada intervalo dois grupos, um controle e um tratado, foram sangrados. Para a obtenção do soro as amostras sanguíneas foram colocadas por 15 min em estufa a 37 °C, em seguida foram transferidas para geladeira permanecendo por 30 min e por fim foram centrifugadas a 4000 RPM.

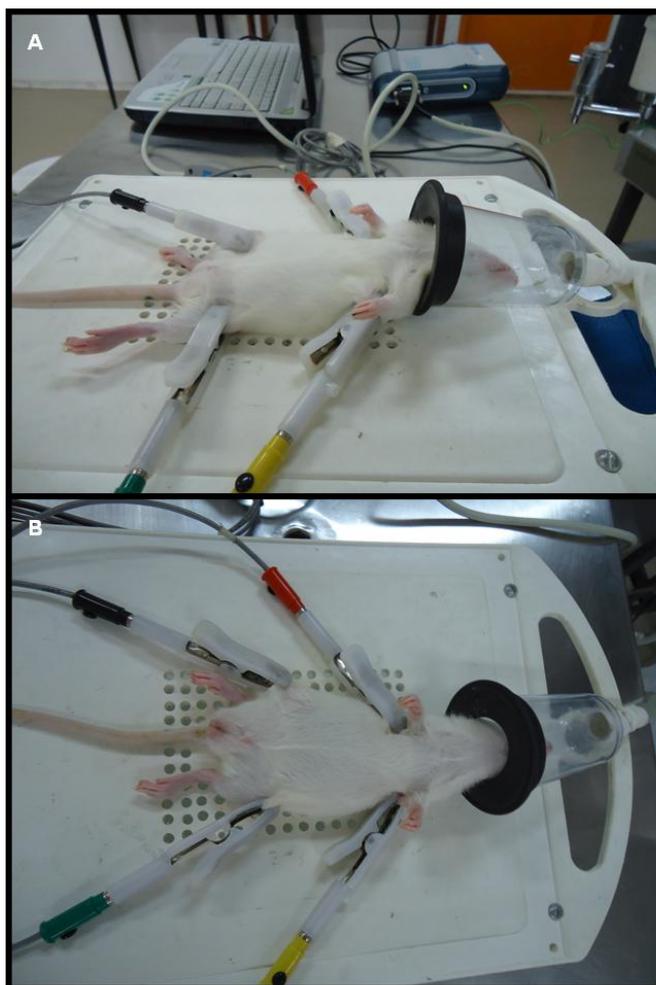
O perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 foi avaliado nos soros obtidos conforme descrito anteriormente. As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF, IL-10 e IL-17A foram dosadas por citometria de fluxo com citômetro de fluxo FACScan (BD Biosciences, USA) utilizando kit *Cytometric Bead Array* (CBA - BD Biosciences, USA).

### **3.5. CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOTÓXICOS DO VENENO**

#### **3.5.1. Eletrocardiografia (ECG)**

Conforme descrito na seção “Análise Hematológica” de Materiais e Métodos foram utilizados dois grupos experimentais, cada um contendo 6 ratos Wistar. Em um grupo controle foi inoculado 400µL de água ultra pura, já no outro grupo foi inoculado 750µg de veneno diluído em 400µL de água ultra pura. Para a realização do exame eletrocardiográfico os ratos foram transferidos para o consultório de cardiologia do Hospital Veterinário da UFMG.

Os animais foram mantidos sob anestesia geral utilizando-se a injeção intramuscular da associação entre morfina (2,5 mg/kg) e diazepam (2,5 mg/kg) (Flecknell, 1996) como pré anestesia. Para indução e manutenção da anestesia geral os animais foram colocados em posição supina e foi aplicado isoflurano 2,5% utilizando o inalador anestésico *Metalvet Plus* (Metalvet, São Paulo, SP, Brazil). Os eletrodos foram ligados nos membros anteriores (amarelo no membro esquerdo e vermelho no direito) e nos posteriores (verde no esquerdo e preto do direito) como é mostrado na Figura 7. Traçados computacionais de ECG (ECG-PC TEB, São Paulo, Brazil) foram obtidos antes do experimento (T0) e durante 30 min depois. A cada 5 min as variáveis foram examinadas, totalizando sete tempos de análise (T0, T5, T10, T15, T20, T25 e T 30). Foram avaliados frequência cardíaca (FC), ritmo cardíaco, medição e intervalo das ondas. Como a *software* de ECG apresenta resultados como intervalo de RR em ms, a frequência cardíaca (batimentos por minuto) foi calculada pela divisão 60000/intervalo RR (ms), já que 1 min corresponde a 60000 ms. ECG foi gravado com a velocidade de 50 mm/s, foram considerados para a análise a sensibilidade de 2N e derivação II.



**Figura 7- Eletrocardiografia em ratos.**

Ratos foram mantidos sob anestesia inalatória e para isto foram colocados em posição supina e foi aplicado isoflurano 2,5% utilizando o inalador anestésico *Metalvet Plus* (Metalvet, São Paulo, SP, Brazil)

**3.5.2. Análise do Transiente de Cálcio em Cardiomiócitos**

Dois camundongos C57BL/6 foram eutanasiados por deslocamento cervical. O tórax foi aberto e, posteriormente, as cartilagens condrocostais em ambos os lados e o esterno rebatido para cima, expondo dessa forma a cavidade torácica. Em seguida, o coração foi retirado e colocado em uma placa de petri. Na placa de petri, todos os tecidos, exceto o do coração, foram removidos, deixando à mostra o coto da aorta. O coração foi canulado pelo coto da aorta, com o auxílio de duas pinças, e fixado na cânula por uma linha. O órgão canulado foi então colocado no sistema de Langendorff para o início da perfusão retrógrada.

Para a obtenção de cardiomiócitos utilizou-se o procedimento padrão para dissociação enzimática como descrito por Mitra e Morad (1985). Os corações colocados em um sistema de Langendorff foram perfundidos por cerca de cinco minutos com solução tampão. Posteriormente os corações foram perfundidos por 10 a 15 minutos com uma solução contendo 1mg/mL de colagenase tipo II (Worthington, USA) e 0,17 mg/mL protease tipo IX (Sigma). O coração digerido foi removido da cânula e a região dos ventrículos foi separada e cortada em pequenos pedaços. Células isoladas foram obtidas por isolamento mecânico. Após a dissociação dos cardiomiócitos ventriculares, as células foram colocadas em meio de cultura DMEM (Sigma) com soro fetal bovino à 10% (Cultilab, Brasil). Apenas células tolerantes ao cálcio, quiescentes e com estriações bem definidas foram utilizadas. Os cardiomiócitos foram usados até 2 a 3 horas após o final da preparação.

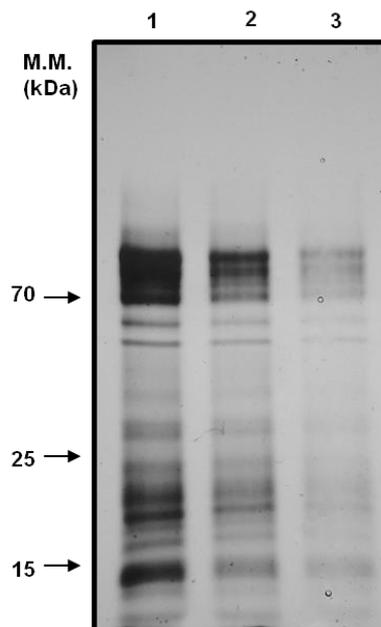
Para realização da medida do transiente de cálcio intracelular, foi feita uma incubação dos cardiomiócitos com uma sonda fluorescente sensível a cálcio (fluo 4 AM – 5  $\mu\text{mol/L}$ ), excitada no comprimento de onda 488nm e com emissão em 515nm, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após a marcação, o excesso de sonda foi removido e adicionado novamente DMEM para a realização dos experimentos. Os cardiomiócitos foram incubados com 0,025  $\mu\text{g}$  de veneno por 5 minutos e como controle foram usadas as células incubadas apenas com a sonda e DMEM. As células cardíacas foram estimuladas na frequência de 1 hertz, com um pulso quadrado de duração de 5ms e 30V. Após a aplicação de 8 pulsos elétricos foi feita uma varredura repetitiva ao longo de uma linha no eixo longitudinal das células (512 x 3000 pixels), com laser argônio (488nm) e frequência de aquisição de 1,54 ms, utilizando-se um microscópio confocal Zeiss 510 Meta (GUATIMOSIM, 2001).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO GERAL DO VENENO

#### 4.1.1. Perfil eletroforético

Para a visualização geral do conteúdo do veneno bruto de *H. lunatus* foi realizada eletroforese SDS-PAGE com 12,5% de acrilamida. A Figura 8 mostra o perfil eletroforético do veneno de *H. lunatus* em diferentes concentrações. Foram aplicados 40, 20 e 10 $\mu$ g nas canaletas 1, 2 e 3, respectivamente. Verifica-se que o veneno possui moléculas de tamanhos bem distintos, sendo que as menores observadas possuem massa com valor inferior a 15 kDa e as maiores apresentam valores superiores a 70 kDa. As amostras utilizadas foram preparadas em condições redutoras e o gel foi corado pela prata.

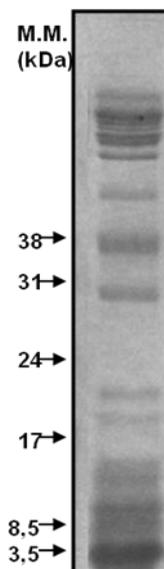


**Figura 8- Perfil eletroforético do veneno de *H. lunatus*.**

O gel de poliacrilamida 12,5% correu em tampão Tris-Glicina de acordo com Laemmli (1970). Foram aplicadas amostras contendo 40 (canaleta 1), 20 (canaleta 2) e 10 $\mu$ g (canaleta 3) de veneno. O gel foi corado pela prata.

Como já é sabido, venenos escorpionicos são ricos em neurotoxinas (proteínas de pequena massa molecular), por isso, para melhor visualização dessas moléculas foi realizado outro gel, com maior porcentagem de acrilamida e foi

utilizado um padrão de proteínas de baixo peso molecular. É possível observar na Figura 9 a existência de proteínas com massa próxima de 8,5 kDa assim como de uma banda mais espessa com peso molecular de aproximadamente 3,5 kDa.

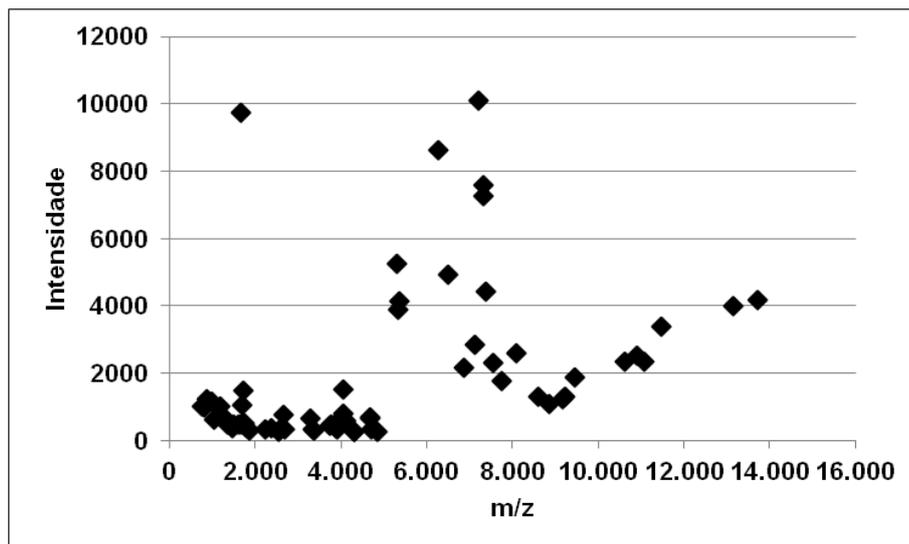


**Figura 9- Perfil eletroforético do veneno de *H. lunatus* utilizando padrão de baixa massa molecular.**

O gel de poliacrilamida 15% correu em tampão Tris-Glicina de acordo com Laemmli (1970). Foram aplicados 20 µg de veneno de *H. lunatus*. O gel foi corado com Coomassie Blue.

#### **4.1.2. Espectrometria de Massas**

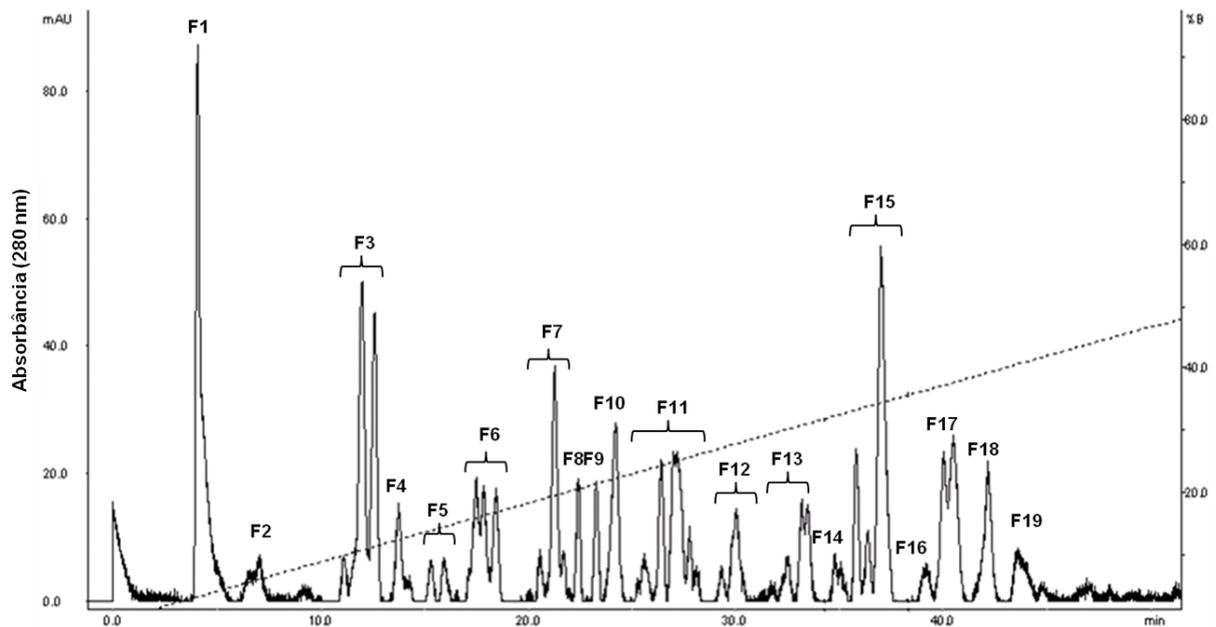
Após a determinação do perfil eletroforético, foi feita análise mais acurada das massas das moléculas contidas no veneno total de *H. lunatus*. Para isso, foi utilizada a técnica de espectrometria de massa. Como é possível observar na Figura 10, existe um grande número de moléculas com massa menor do que 5000 Da, que provavelmente representam os peptídeos presentes no veneno. Observa-se também a presença de muitas proteínas com massa entre 5000 e 10000 Da, sugerindo a presença de neurotoxinas. Adicionalmente foram identificadas algumas proteínas com massa entre 10000 e 14000 Da.



**Figura 10- Espectrometria de massas do veneno total de *H. lunatus*.**  
 O veneno bruto foi submetido à análise por MALDI-TOF usando a resina  $\alpha$ -ciano como matriz.

#### **4.1.3. Perfil Cromatográfico**

O veneno de *H. lunatus* foi purificado por HPLC em fase reversa (C18) e o perfil cromatográfico é mostrado na Figura 11. Foram obtidos diversos picos de eluição, porém, como foi utilizado um coletor automático, alguns deles foram agrupados, tendo sido isoladas 19 frações, eluídas ao longo de todo o gradiente de acetonitrila, demonstrando grande variabilidade na hidrofobicidade das moléculas presentes no veneno.



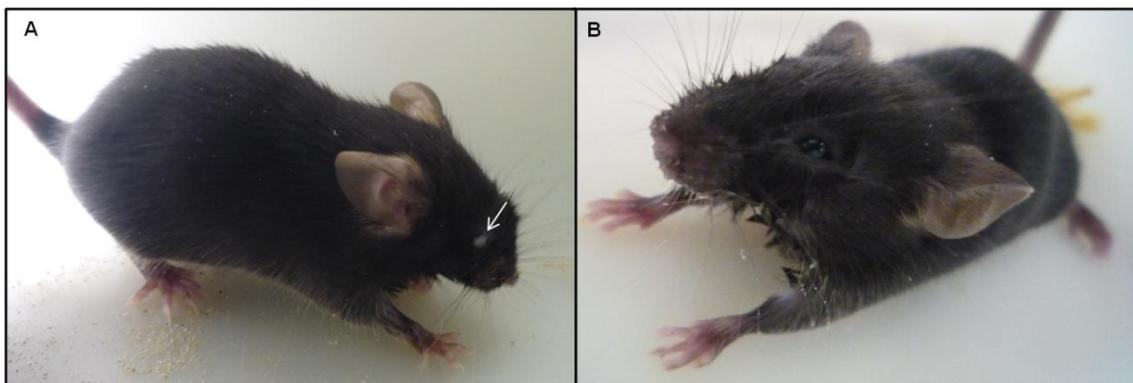
**Figura 11- Perfil cromatográfico do veneno total de *H. lunatus***

Para separação das frações do veneno por HPLC foi aplicado 1 mg de veneno em uma coluna de fase reversa (Shimadzu-Pack CLC-ODS C18). Após equilibrar a coluna, as frações do veneno foram separadas por gradiente linear de 0 até 60% de Acetonitrila- TFA 0,1%, em 60 min. Em seguida foi aplicado um gradiente linear de 60 a 100% de Acetonitrila- TFA 0,1%, por 30 min. As frações (F) foram observadas antes do gradiente chegar em 50% de Acetonitrila- TFA 0,1% e estão numeradas de 1 a 19.

#### **4.1.4. Dose Letal Média (DL50)**

A primeira atividade a ser testada foi a toxicidade do veneno de *H. lunatus* para mamíferos. O ensaio foi realizado utilizando camundongos C57BL/6. Após injeção intraperitoneal (i.p.), foram observados sintomas típicos de envenenamento escorpionico, como agitação, salivação, lacrimejamento, sudorese e letalidade (Figura 12). O valor da DL<sub>50</sub> foi determinado como 21,55 mg/kg de massa corporal de camundongo.

A neurotoxicidade do veneno também foi avaliada através da DL<sub>50</sub> intracranial (i.c.). O veneno apresentou efeitos neurotóxicos significativos, já que imediatamente após a injeção os camundongos apresentaram agitação acentuada e movimentação anormal. Alguns se colocaram em decúbito dorsal e apresentaram movimentos de pedalagem. O valor da DL<sub>50</sub> foi de 0,1mg/kg de massa corpórea de camundongo.

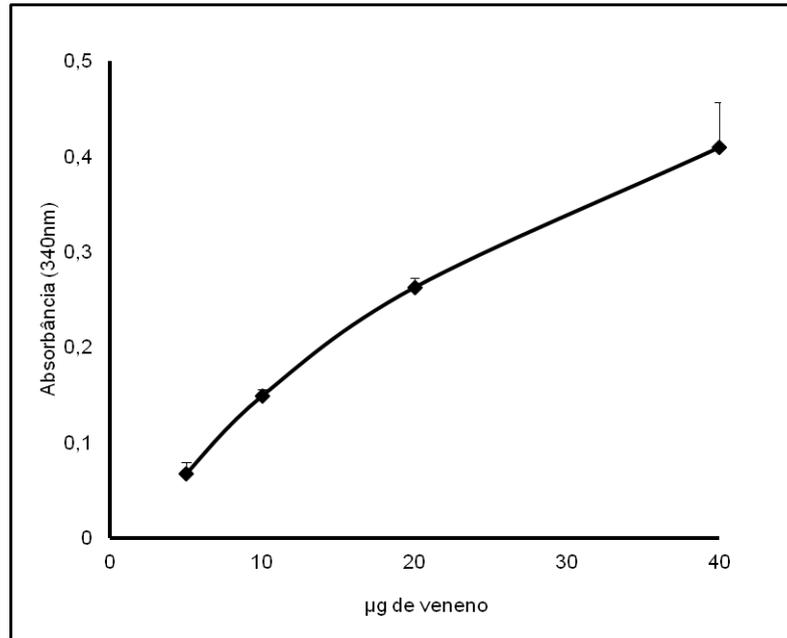


**Figura 12- Sintomas observados após injeção de veneno de *H. lunatus* (via intraperitoneal) em camundongos.**

Figura (A) Animal com olhos esbranquiçados (apontado pela seta) devido ao intenso lacrimejamento. (B) Camundongo com sudorese e salivação acentuada.

#### **4.1.5. Atividade Proteolítica**

Algumas atividades enzimáticas do veneno de *H. lunatus* também foram analisadas. A primeira a ser determinada foi a atividade proteolítica. Os ensaios realizados para investigar esta propriedade do veneno foram executados de acordo com o método de Lin *et al.* (1969) modificado por Sanchez *et al.* (2000). Foi verificado que o veneno de *H. lunatus* apresentou atividade proteolítica sobre dimetilcaseína. A Figura 13 mostra os valores de absorbância resultantes quando 5, 10, 20 e 40  $\mu\text{g}$  de veneno foram incubados com o substrato por 30 minutos a 37 °C. A atividade específica do veneno bruto foi de  $0,46 \pm 0,03$  U/mg.min, sendo que uma unidade é a  $\Delta A_{340}$  nm/min em relação à concentração de proteínas (mg). Os experimentos foram realizados em duplicata.



**Figura 13- Atividade proteolítica do veneno de *H. lunatus* sobre dimetilcaseína.**

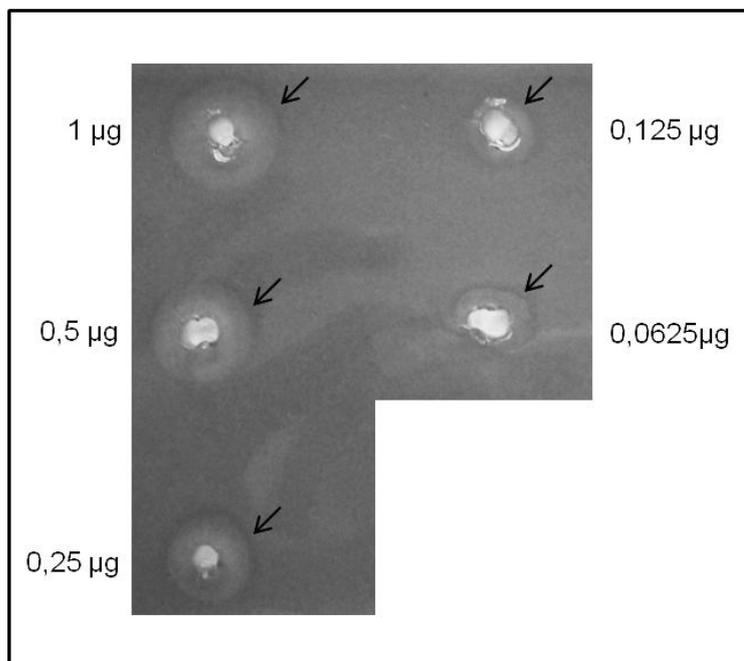
Os experimentos foram realizados utilizando o método de Lin *et al.* (1969) com algumas modificações descritas em Sanchez *et al.*(2000), como descrito em Materiais e Métodos. Os valores da absorbância (a 340 nm) indicam a atividade proteolítica referente a 5, 10, 20 e 40 µg de veneno após 30 min de incubação com o substrato. Uma unidade proteolítica foi definida como  $\Delta A$  340nm/min, e a atividade foi expressa em relação à concentração de proteína (mg).

#### **4.1.6. Atividade Fosfolipásica**

Também foi investigada a presença de atividade fosfolipásica no veneno de *H. lunatus*. Esta atividade enzimática foi avaliada pelo método hemolítico indireto descrito por Gutiérrez *et al.*(1988) com pequenas modificações. As diferentes concentrações de venenos testadas e o diâmetro dos halos produzidos são apresentados na Tabela 3 e os halos hemolíticos podem ser visualizados na Figura 14. O gráfico representado na Figura 15 demonstra que a atividade fosfolipásica é dose dependente e que a dose mínima fosfolipásica (MPD), que corresponde à menor concentração de veneno que produz um halo de 1 cm de diâmetro, foi determinada como 0,125µg

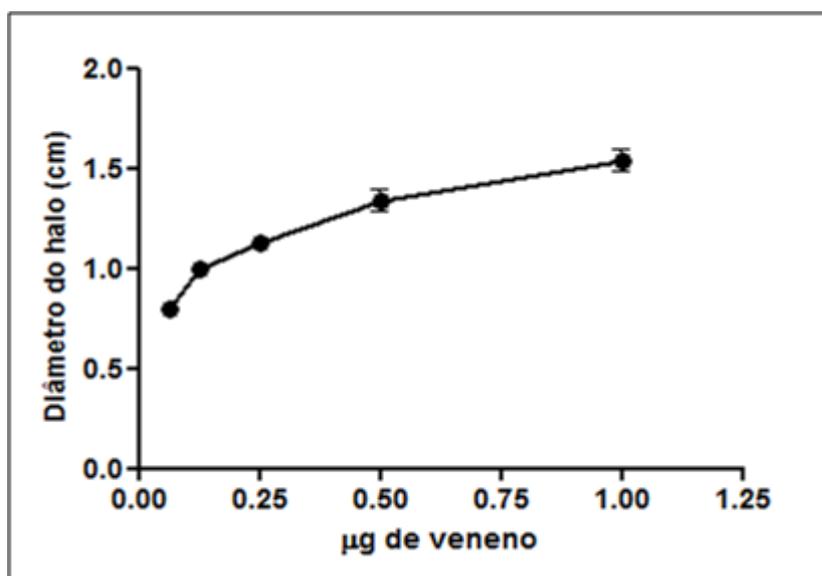
**Tabela 3- Atividade fosfolipásica do veneno de *H. lunatus*.**  
Diâmetros dos halos observados em relação à quantidade de veneno aplicada.

Veneno ( $\mu\text{g}$ )	Diâmetro do halo (cm)
1	1,537
0,5	1,337
0,250	1,125
0,125	1,0
0,0625	0,8



**Figura 14- Halos da atividade fosfolipásica do veneno de *H. lunatus*.**

O ensaio foi realizado de acordo com Gutiérrez et al.(1988), com pequenas modificações. Foram avaliadas as doses de 0,0625; 0,125; 0,250; 0,5 e 1  $\mu\text{g}$  de veneno, as quais produziram halos de 0,8; 1,0; 1,125; 1,337 e 1,537 cm de diâmetro, respectivamente. A dose mínima fosfolipásica (MPD) foi de 0,125 $\mu\text{g}$



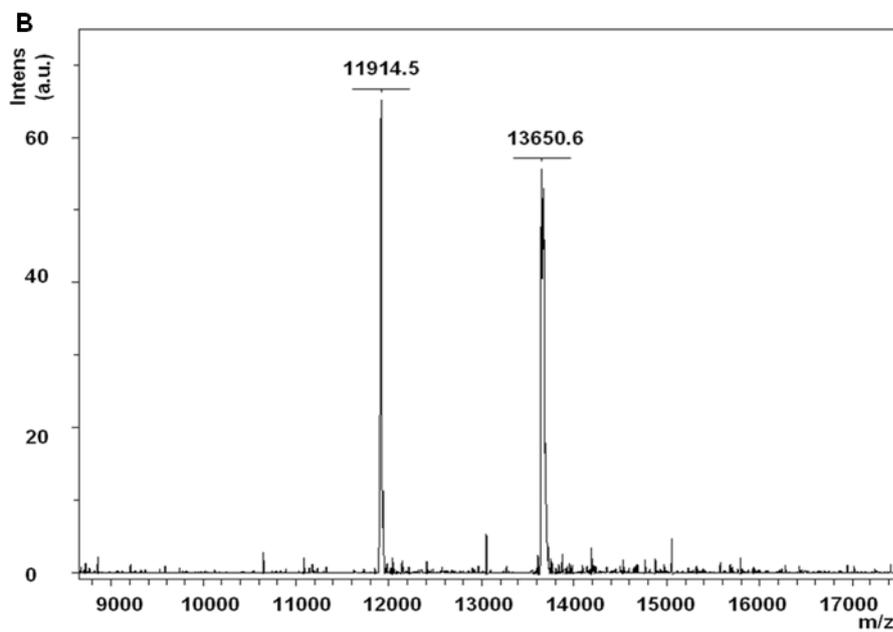
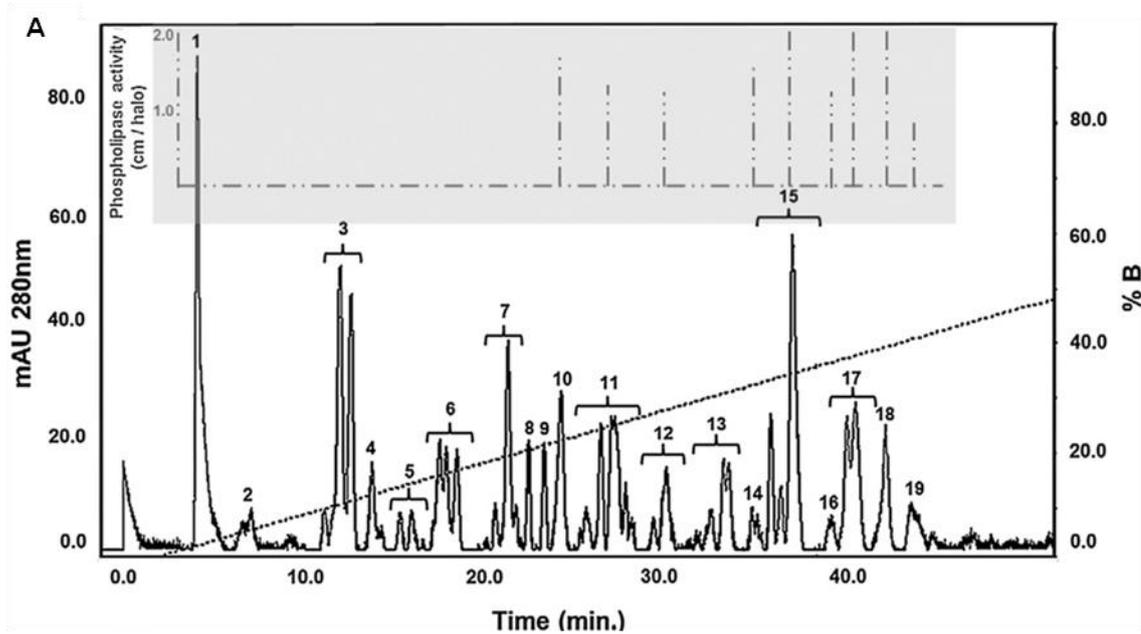
**Figura 15- Gráfico da atividade fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>) do veneno de *H. lunatus*.**

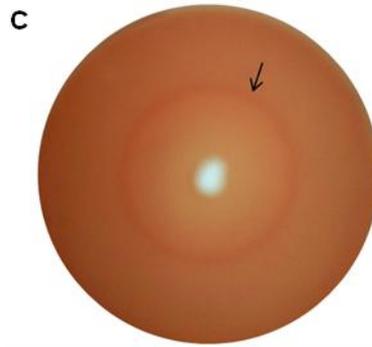
A atividade foi avaliada através do método hemolítico indireto. Foram aplicados 15 µL de PBS contendo diferentes concentrações (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 µg) de veneno de *H. lunatus* e 15 µL de PBS foram usados como controle. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas e os diâmetros dos halos hemolíticos foram medidos.

Foi investigada a atividade fosfolipásica de todas as frações obtidas na purificação por fase reversa descrita anteriormente. Devido a pouca quantidade de amostra de cada fração, os testes foram apenas qualitativos, pois não foi possível realizar a dosagem de proteínas dessas amostras. As frações testadas e o diâmetro dos respectivos halos são mostrados na Figura 16A. Os halos produzidos pelas frações 10, 11 e 12 apresentaram-se mais amarelados, enquanto os outros halos mostram-se esbranquiçados. Apesar de o teste feito ser considerado específico para fosfolipase A2, as diferenças nas colorações dos halos podem indicar tipos de fosfolipases diferentes, porém estudos mais específicos devem ser feitos para que se possa obter esta informação com precisão (HABERMANN, 1972).

Pelo já mencionado problema de pouca disponibilidade de cada amostra, não foi possível repetir os experimentos para todas as frações. A fração que apresentou atividade e que estava em maior volume foi a de número 15 e por isso foi testada novamente e teve seu teor analisado por espectrometria de massa. A Figura 16B mostra os valores de massa molecular (11914,5 Da e outra de 13650,6 Da) que foram

encontrados para esta fração. A atividade da fração 15 está representada na Figura 16C sendo que 13,6 µg produziram um halo hemolítico de 2,1 cm de diâmetro.



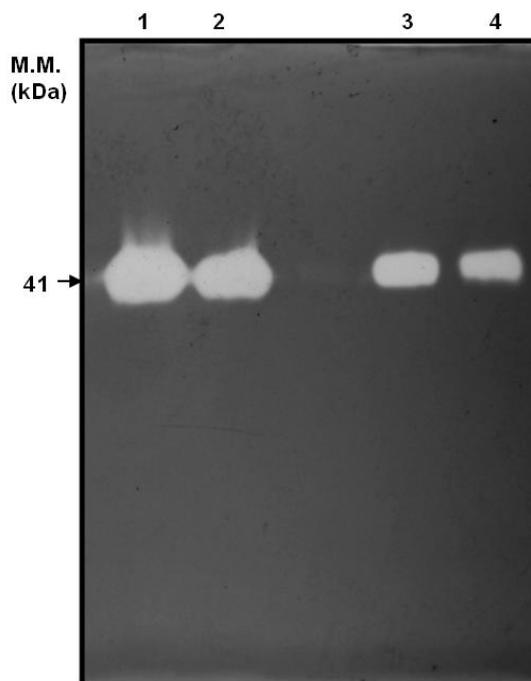


**Figura 16- Análise geral das frações do veneno de *H. lunatus*.**

Fig 16A mostra a separação em HPLC de 1 mg do veneno bruto de *H. lunatus*. A amostra foi aplicada em uma coluna de fase reversa (Shimadzu-Pack CLC-ODS C18). Após equilibrar a coluna, as frações do veneno foram separadas por gradiente linear de solução A a 60% de solução B, correndo por 60 min. No cromatograma o perfil cromatográfico está representado pela linha preta e o gradiente de concentração de acetonitrila pela linha tracejada. A atividade fosfolipásica de algumas frações foi determinada por ensaio hemolítico indireto. As frações 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 apresentaram atividade fosfolipásica. O halo produzido por cada fração está representado pela linha cinza localizada acima da respectiva fração. A Fig 17B mostra a análise espectrofotométrica principal fração do veneno de *H. lunatus* que apresentou atividade fosfolipásica (fração 15). Duas massas moleculares foram identificadas, uma de 11914,5 e outra de 13650,6 Da. A Fig 13 C mostra a atividade fosfolipásica da fração 15 foram aplicados 13,6µg desta fração e o halo hemolítico foi medido, apresentando 2,1 cm de diâmetro.

**4.1.7. Atividade Hialuronidásica**

A atividade hialuronidásica do veneno foi analisada usando a técnica de zimografia (CEVALLOS *et al.*,1992), na qual o substrato que se deseja estudar é incorporado a um gel de acrilamida. As possíveis enzimas com atividade hialuronidásica presentes no veneno são renaturadas e a atividade sobre o substrato incorporado ao gel é visualizada pelo descoramento de corante específico. Dessa forma, esta técnica possibilita identificar tanto a presença da enzima quanto sua massa molecular relativa. Foram aplicados 10 e 5 µg de veneno de *H. lunatus* nas canaletas 1 e 2, respectivamente. Da mesma forma foram aplicados 10 e 5 µg de veneno de *T. serrulatus* nas canaletas 3 e 4, respectivamente. A Figura 17 mostra o gel resultante do ensaio, que revelou que o veneno apresenta, de fato, atividade hialuronidásica e a enzima possivelmente responsável possui uma massa molecular de, aproximadamente, 41 kDa. O mesmo resultado foi observado para o veneno de *T. serrulatus*.



**Figura 17- Atividade hialuronidásica do veneno de *H. lunatus* e de *T. serrulatus*.**

Foi feito o zimograma dos veneno de acordo com Cevallos *et al.* (1992). Nas canaletas 1 e 2 foram aplicados 10 e 5  $\mu\text{g}$  de veneno de *H. lunatus*, respectivamente. Nas canaletas 3 e 4 foram aplicados 10 e 5  $\mu\text{g}$  de veneno de *T. serrulatus*, respectivamente. As bandas revelam a presença de uma enzima com massa molecular em torno de 41 kDa.

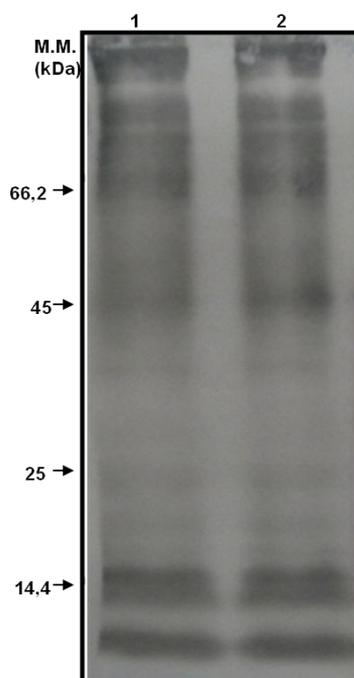
## **4.2. CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO VENENO**

### **4.2.1. Western Blot**

Para realização dos estudos imunoquímicos, foi feita a imunização de coelhos visando à obtenção de anticorpos específicos anti-veneno de *H. lunatus*. Para comparação direta, foi imunizado também um coelho com veneno de *T. serrulatus*.

Para avaliar a imunogenicidade das proteínas do veneno de *H. lunatus*, foi realizado *Western Blot* como descrito em Materiais e Métodos. Foram aplicados 10 e 20  $\mu\text{g}$  de veneno e, após a eletroforese (gel 12,5%), o padrão foi cortado e o restante da membrana foi submetida ao imunoensaio. O soro de coelho anti-veneno de *H. lunatus* foi utilizado na diluição de 1:1500 e a IgG anti-coelho conjugada com peroxidase na diluição de 1:8000. O *Western Blot* revelou que a grande maioria das

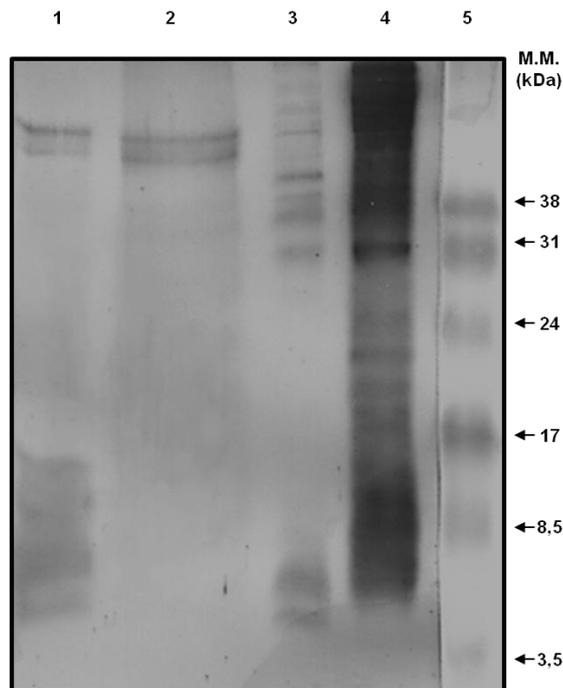
proteínas visualizadas no gel é imunogênica (Figura 18), uma vez que a maior parte das bandas detectadas por SDS-PAGE foram reconhecidas pelo soro imune de coelho.



**Figura 18- Western Blot mostrando imunogenicidade do veneno de *H. lunatus*.**

Reconhecimento do veneno de *H. lunatus* pelo soro de coelho anti-*H. lunatus*. 20 e 10  $\mu\text{g}$  de veneno foram aplicadas nas canaletas 1 e 2, respectivamente, no gel contendo 12,5% de acrilamida. O veneno foi submetido à eletroforese SDS-PAGE e o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. O soro foi aplicado na diluição de 1:1500 e o anticorpo secundário na diluição de 1:8000.

A investigação da existência de reatividade cruzada do soro anti-veneno de *H. lunatus* com venenos de outros escorpiões também foi realizada utilizando o ensaio de *Western Blot*. Foram aplicados 13,5  $\mu\text{g}$  dos venenos de *A. australis*, *C. sculpturatus*, *T. serrulatus* e *H. lunatus* nas canaletas 1, 2, 3, e 4, respectivamente (Figura 19). Na canaleta 5 foram aplicados 5  $\mu\text{L}$  de padrão de massa molecular. O soro de coelho anti-veneno de *H. lunatus* foi utilizado na diluição de 1:1500 e a IgG anti-coelho conjugada com peroxidase na diluição de 1:4000. Na canaleta 4 confirma-se a imunogenicidade do veneno e o soro também reagiu com bandas presentes nos venenos outros escorpiões, revelando reatividade cruzada (canaletas 1, 2 e 3).



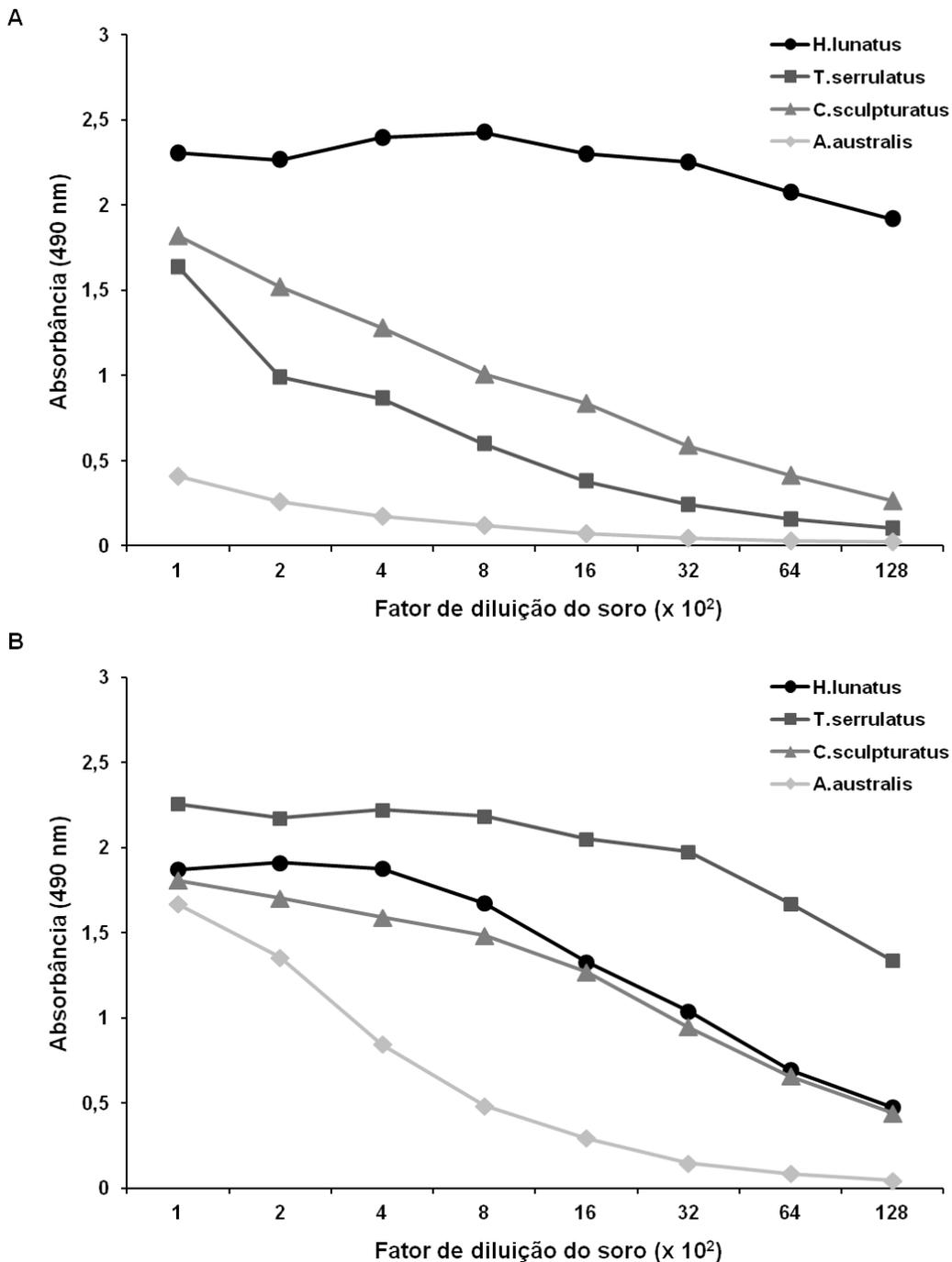
**Figura 19- Western Blot dos venenos de *A.australis*, *C. sculpturatus*, *T. serrulatus* e *H. lunatus*.** Os venenos (13.5 µg) foram submetidos a eletroforese em gel com 20% de acrilamida. O soro de coelho e a IgG conjugada com peroxidase foram utilizados na diluição de 1:1500 and 1:4000, respectivamente.

#### **4.2.2. ELISAs**

A fim de quantificar a reatividade cruzada identificada por *Western Blot*, foram realizados ensaios de ELISA. A Figura 20A mostra os resultados obtidos nesse experimento, no qual foi testado o soro de coelho imunizado com veneno de *H. lunatus* frente aos venenos dos escorpiões *H. lunatus*, *T. serrulatus*, *C. sculpturatus* e *A. australis*. Como controle foi testado o soro pré-imune destes coelhos. O mesmo procedimento foi repetido utilizando o soro de coelho anti-veneno de *T. serrulatus* (Figura 20B), com objetivo de verificar se este soro também era capaz de reagir com outros venenos escorpiônicos.

O soro anti-veneno de *H. lunatus* mostrou imunorreatividade significativa quando testado com o veneno correspondente. Os resultados revelaram que também há uma importante reatividade cruzada deste soro com os venenos de *T. serrulatus* e *C. sculpturatus*, mas não foi observado um reconhecimento considerável do veneno de *A. australis*. Além disso, o soro anti-veneno de *T. serrulatus* reconheceu tanto o veneno do próprio *T. serrulatus* quanto dos outros três

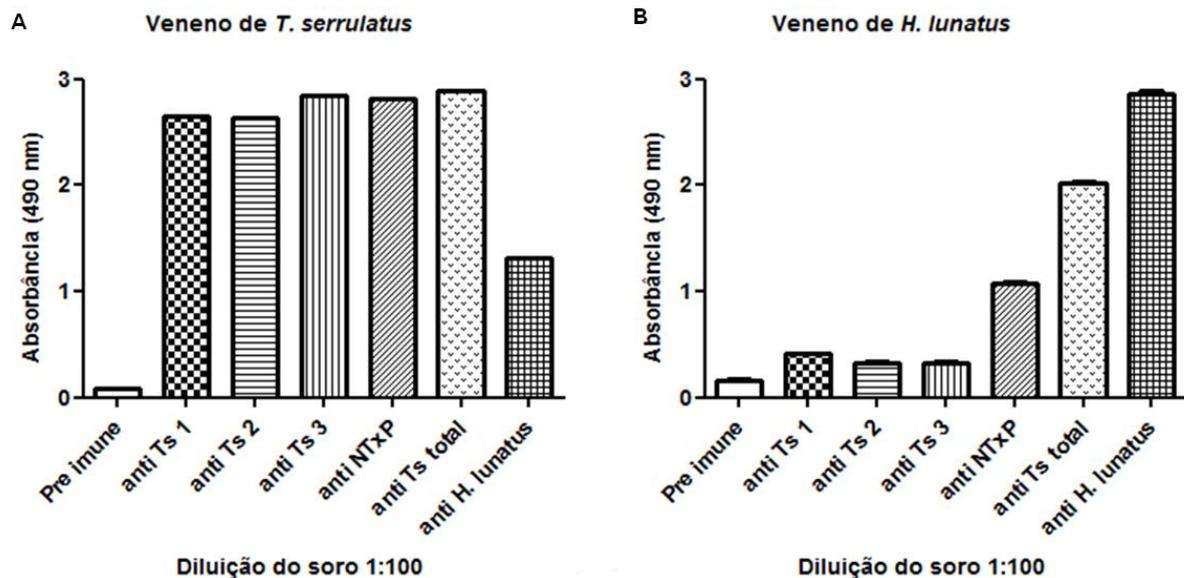
escorpiões, mostrando que também há reatividade cruzada deste soro com os outros venenos.



**Figura 20- Reatividade cruzada dos soros anti-veneno de *H. lunatus* e anti-veneno de *T. serrulatus* frente a diferentes venenos escorpiónicos.**

Reatividade de soros de coelhos imunizados com veneno de *H. lunatus* (Fig 15A) e com veneno de *T. serrulatus* (Fig 15 B) frente aos venenos de *H. lunatus*, *T. serrulatus*, *C. sculpturatus* and *A. a. Hector* (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Valores representam a média de triplicatas. A absorbância do soro pré-imune usado como controle negativo foi subtraída.

Com objetivo de investigar a reatividade cruzada identificada entre os soros anti-veneno de *H. lunatus* e o veneno de *T. serrulatus* e também entre o soro anti-veneno de *T. serrulatus* e o veneno de *H. lunatus* foram realizados dois ELISAs. A Figura 21A mostra a reatividade dos soros contra as principais toxinas de *T. serrulatus* (Ts1, Ts 2, Ts 3), contra a anatoxina TsNTxP, anti-veneno total de *T. serrulatus* (Ts total), anti-veneno total de *H. lunatus* e do soro pré imune frente ao veneno total de *T. serrulatus*. Como era esperado, os soros anti-toxinas, anti-anatoxina e anti-veneno total de *T. serrulatus* reagiram fortemente com o veneno de *T. serrulatus*. Houve reatividade do soro anti-veneno de *H. lunatus* com o veneno de *T. serrulatus* como já havia sido observado anteriormente e o soro pré-imune praticamente não reagiu com este veneno. Na Figura 21B está representado o gráfico do ELISA no qual foram utilizados os mesmos soros descritos anteriormente, porém frente ao veneno total de *H. lunatus*. Os soros pré-imune e contra as toxinas de *T. serrulatus* reagiram fracamente com o veneno de *H. lunatus*, já o soro anti-NTxP teve uma reatividade moderada frente a este veneno. Como havia sido observado anteriormente, o soro anti-veneno total de *H. lunatus* reconheceu o veneno do respectivo escorpião e houve reatividade cruzada entre o soro anti-veneno total de *T. serrulatus* e o veneno de *H. lunatus*.



**Figura 21-** Reatividade cruzada dos soros anti-veneno total de *H. lunatus*, anti-veneno total e anti-toxinas de *T. serrulatus* frente aos venenos de *H. lunatus* e *T. serrulatus*.

Os gráficos mostram a reatividade dos soros (diluição 1:100) com os venenos de *H. lunatus* (A) e *T. serrulatus* (B). Os resultados representam médias de duplicatas.

### **4.3. CARACTERIZAÇÃO PATOFISIOLÓGICA DO ENVENENAMENTO**

A fim de avaliar possíveis alterações causadas pelo envenenamento por *H. lunatus* no organismo, foram feitas análises da hematologia, da bioquímica sérica e da histopatologia de ratos envenenados com 750 µg de veneno, conforme descrito em Materiais e Métodos.

#### **4.3.1. Análise Hematológica**

A fim de avaliar possíveis alterações causadas pelo envenenamento por *H. lunatus* no organismo, foram feitas análises da hematologia, da bioquímica sérica e da histopatologia de ratos envenenados.

Como pode ser observado na tabela 4, os valores médios de plaquetas, hemácias, hemoglobina (Hb), volume globular (VG), volume globular médio, hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média

(CHGM) apresentados pelos animais envenenados são similares aos dos animais do grupo controle. Entretanto, ratos do grupo veneno apresentaram níveis séricos de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos significativamente diminuídos como é mostrado na Tabela 5.

**Tabela 4: Eritrograma de ratos envenenados.**

Valores médios de plaquetas, hemácias, hemoglobina (Hb), volume globular (VG), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de ratos 30 min após a administração de placebo (grupo controle) ou de 750 µg de veneno de *H. lunatus* (grupo veneno).

Grupo	Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /µl)	Hemácias (x10 <sup>6</sup> /µl)	Hb (g/dL)	VG (%)	VGM (fl)	HGM (pg)	CHGM (%)
Controle	616.6 ±66.03	6.61 ± 0.58	13.38 ± 0.49	43.16 ± 0.98	65.32 ± 6.6	20.14 ± 2.05	30.63 ± 1.58
Veneno	550.16 ± 145.33	6.21 ± 1.08	12.18 ± 2.48	38 ± 7.42	61.11 ± 5.44	20.36 ± 2.49	32.07 ± 1.83

**Tabela 5: Leucograma de ratos envenenados.**

Contagens médias de leucócitos, neutrófilos, *ring cell*, linfócitos, bastonetes, monócitos e eosinófilos totais de ratos 30 min após a administração de placebo (grupo controle) ou de 750 µg de veneno de *H. lunatus* (grupo veneno).

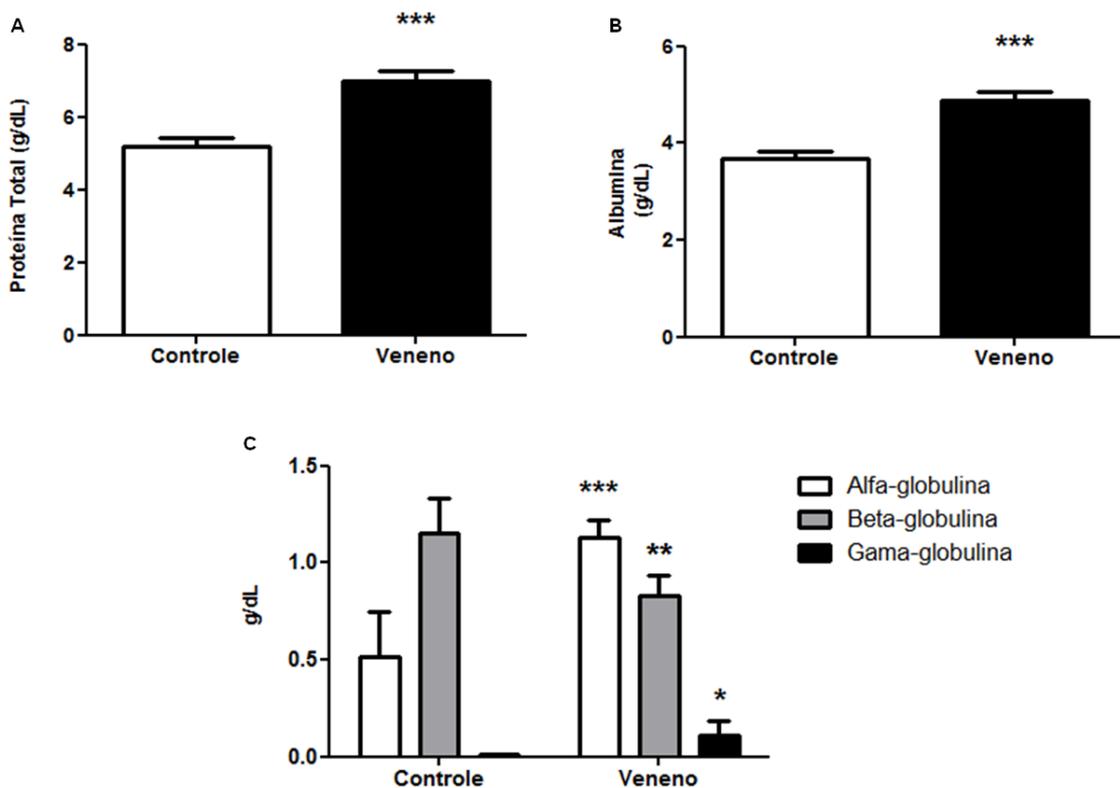
Grupo	Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Neutrófilos (x10 <sup>3</sup> /µl)	<i>Ring cell</i> (x10 <sup>3</sup> /µl)	Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Bastonetes (x10 <sup>3</sup> /µl)	Monócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Eosinófilos (x10 <sup>3</sup> /µl)
Controle	6.6 ± 0.94	0.98 ± 0.1	0,19 ± 0,08	5.06 ± 0.95	0.15 ± 0.07	0.12 ± 0.06	0.08 ± 0.05
Veneno	3.65 ± 2.29*	0.61 ± 0.35*	0,13 ± 0,09	2.06 ± 1.06***	0.21 ± 0.19	0.11 ± 0.09	0**

\* $P < 0.05$  comparado com grupo controle. \*\* $P < 0.01$  comparado com grupo controle. \*\*\* $P < 0.001$  comparado com grupo controle.

#### 4.1.1. Análise Bioquímica

Além dos parâmetros hematológicos, foram analisados parâmetros bioquímicos do soro de ratos envenenados.

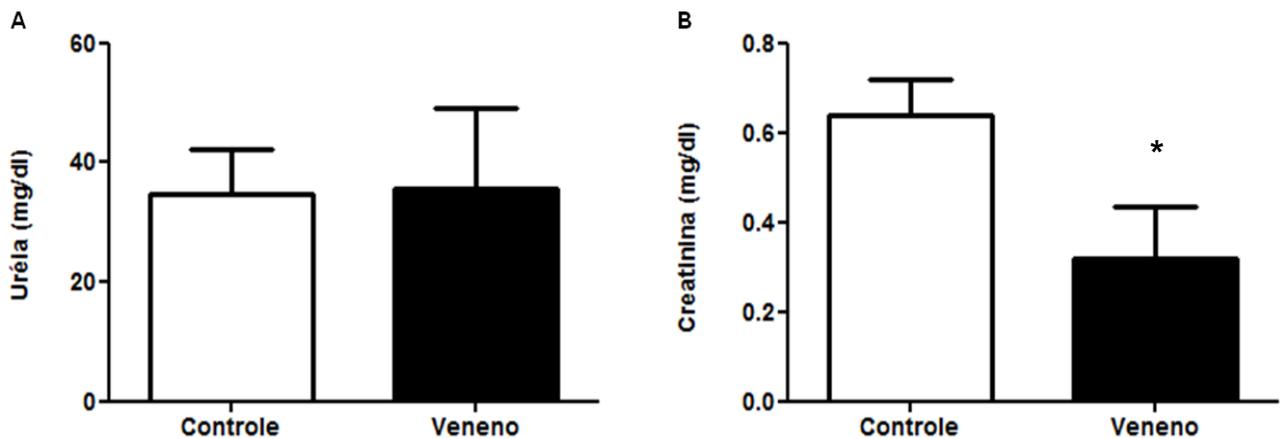
Proteínas totais compreendem albumina, globulinas e fibrinogênio. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que tanto a concentração de proteína total quanto a concentração de albumina aumentaram significativamente 30 min após a administração do veneno (Figura 22A e B). A eletroforese das proteínas de fase aguda constatou que houve um aumento das frações de alfa e gama-globulinas e uma diminuição de beta-globulina nos animais envenenados (Figura 22C).



**Figura 22- Concentrações séricas de proteína total, albumina e globulinas.**

Efeitos do veneno de *H. lunatus* nos níveis de proteína total (A) albumina (B) e alfa, beta e gama-globulinas (C). Trinta minutos depois da inoculação de 750 µg/rato (grupo veneno) e água (grupo controle) os animais foram eutanasiados e foi feita a coleta sanguínea. Valores representam as médias ± SEM de 6 animais. . \* $P < 0.05$  comparado com grupo controle. \*\* $P < 0.01$  comparado com grupo controle. \*\*\* $P < 0.001$  comparado com grupo controle.

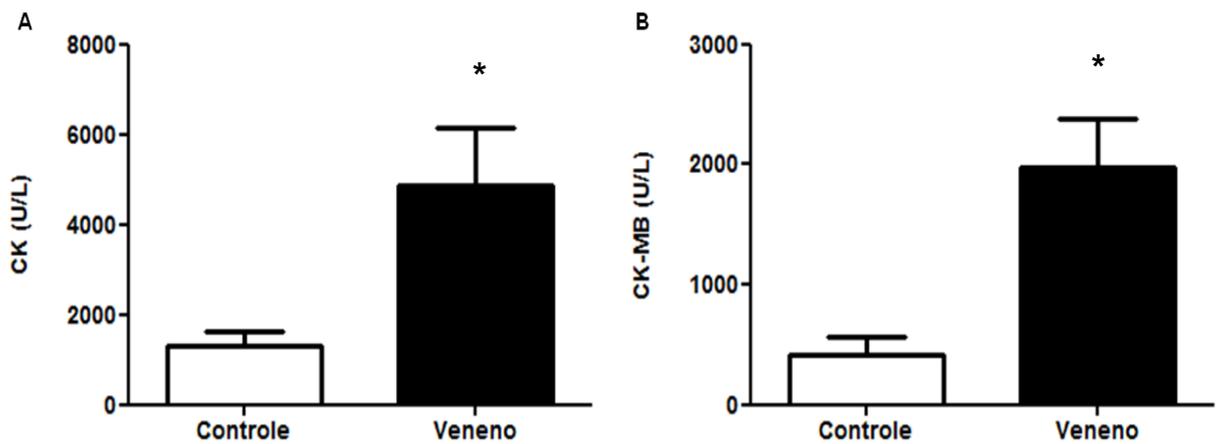
Valores de uréia e creatinina normalmente são utilizados como diagnóstico de alteração na função renal. Como é mostrado na Figura 23A ratos envenenados não apresentaram alterações significativas na concentração sérica de uréia quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, foi observada uma diminuição considerável nos níveis de creatinina no soro dos animais que foram tratados com veneno (Figura 24B).



**Figura 23: Níveis séricos de uréia e creatinina.**

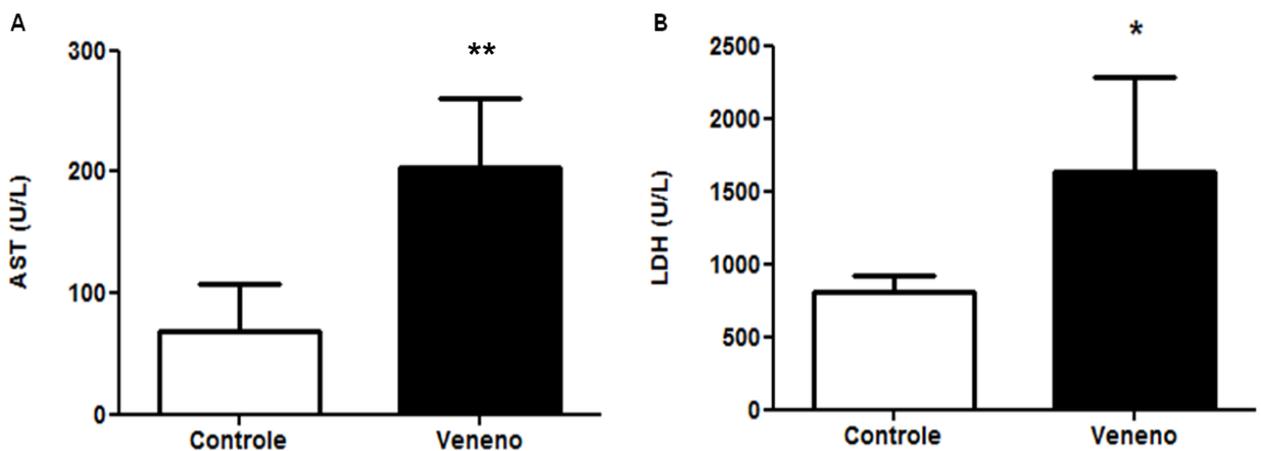
Resultados do envenenamento por *H. lunatus* nos níveis de uréia (A) e creatinina (B). Trinta minutos depois da inoculação de 750  $\mu$ g/rato (grupo veneno) e água (grupo controle) os animais foram eutanasiados e foi feita a coleta sanguínea. Valores representam as médias  $\pm$  SEM de 6 animais. \*  $P < 0,001$  comparado com grupo controle.

A atividade das enzimas séricas CK, CK-MB, AST e LDH também foi investigada, já que estas proteínas estão diretamente relacionadas com lesão tecidual. Após 30 min de envenenamento os níveis séricos tanto de CK e CK-MB (Figura 24) quanto de AST e LDH (Figura 25) se mostraram aumentados.



**Figura 24- Níveis séricos de CK e CK-MB.**

Resultados do envenenamento por *H. lunatus* nos níveis de CK (A) e CK-MB (B). Trinta minutos depois da inoculação de 750 µg/rato (grupo veneno) e água (grupo controle) os animais foram eutanasiados e foi feita a coleta sanguínea. Valores representam as médias ± SEM de 6 animais. \* $P < 0,001$  comparado com grupo controle.



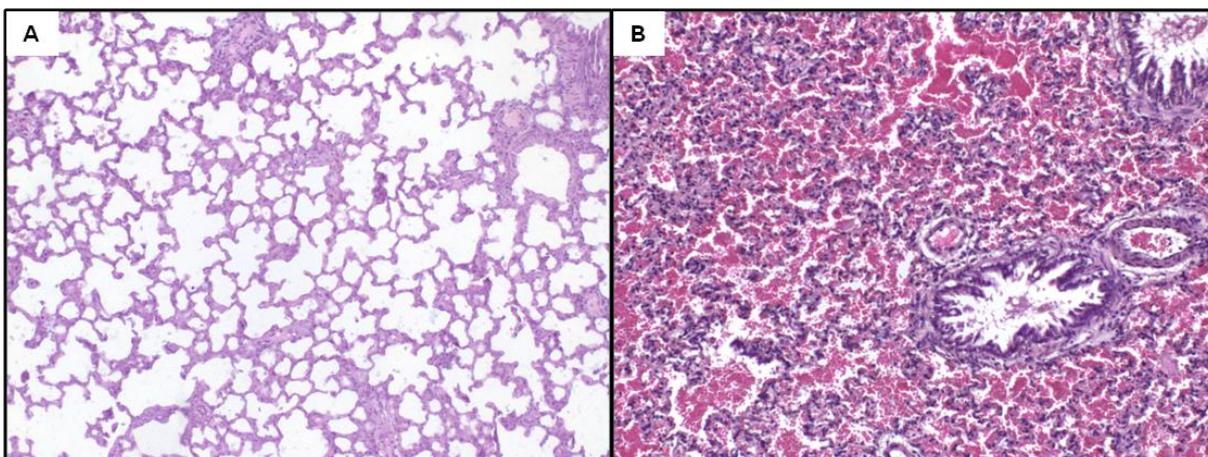
**Figura 25- Níveis séricos de AST e LDH.**

Resultados do envenenamento por *H. lunatus* nos níveis de AST (A) e LDH (B). Trinta minutos depois da inoculação de 750 µg/rato (grupo veneno) e água (grupo controle) os animais foram eutanasiados e foi feita a coleta sanguínea. Valores representam as médias ± SEM de 6 animais. \* $P < 0,05$  comparado com grupo controle. \*\* $P < 0,001$  comparado com grupo controle.

#### **4.1.2. Análise Histopatológica**

Para investigar a existência de lesão tecidual microscópica nos órgãos dos ratos envenenados, foram retirados coração, pulmão, rins, fígado e baço de cada um dos animais dos dois grupos avaliados. Estes órgãos foram analisados microscopicamente e foi verificado que apenas os pulmões dos animais tratados com veneno de *H. lunatus* apresentaram alterações evidentes. Como é mostrado na

Figura 26 os animais controle apresentaram pulmões com morfologia normal (A), enquanto nos animais envenenados foi identificada hemorragia intensa e difusa (B).

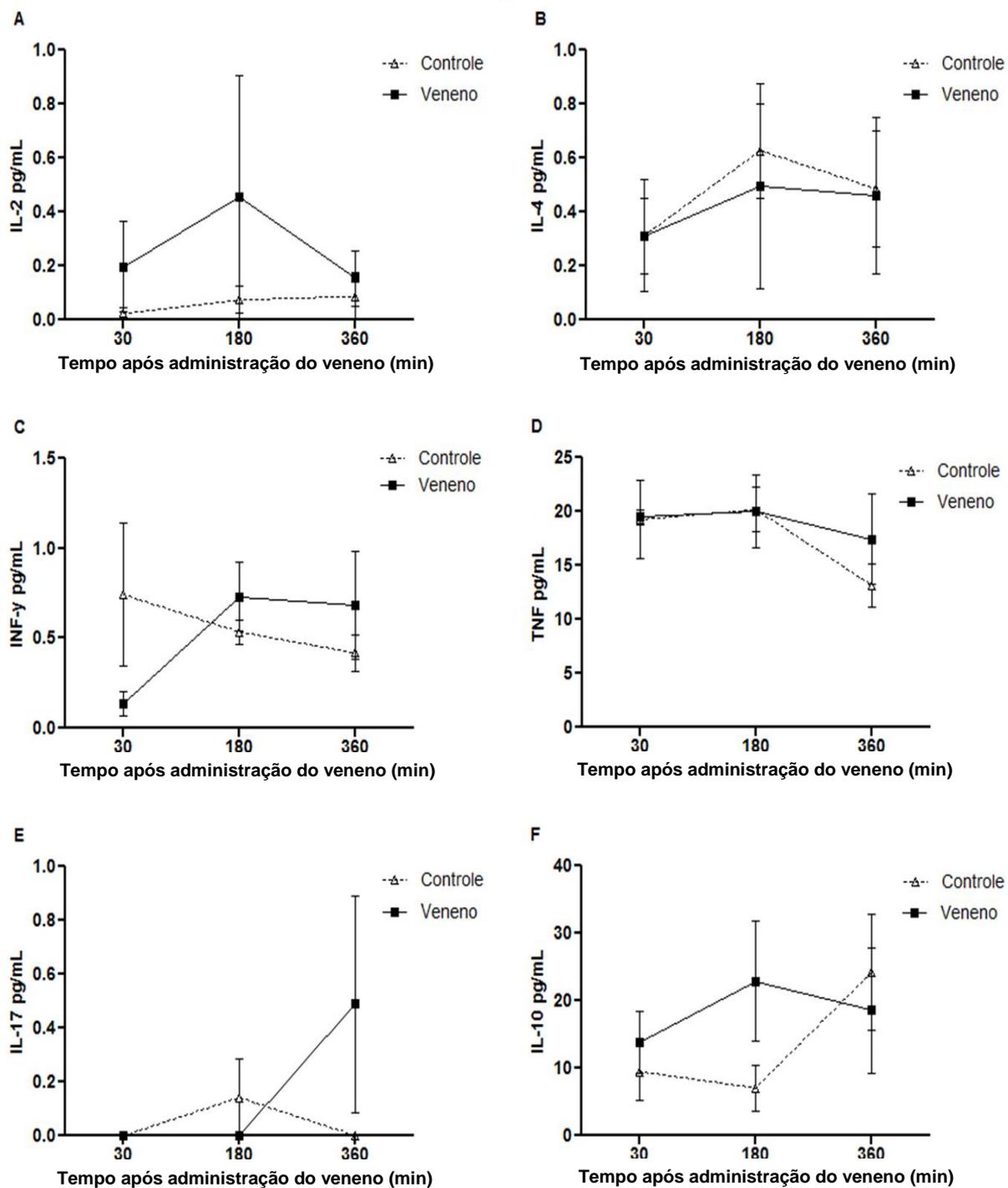


**Figura 26- Análise histopatológica de pulmões de ratos.**

Foram avaliados os pulmões dos animais do grupo controle (A) e do grupo tratado com 750 µg de veneno de *H. lunatus* (B). A histopatologia dos pulmões dos animais envenenados revelou a presença de hemorragia intensa e difusa.

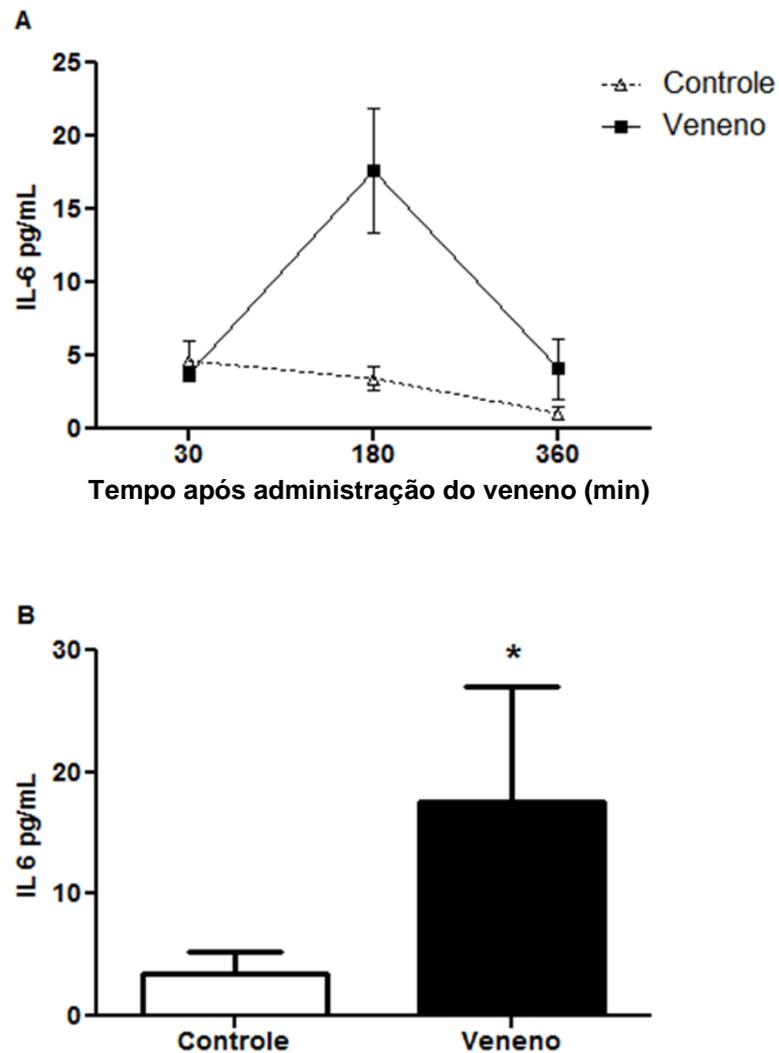
#### **4.1.3. Análise da Produção de Citocinas**

Para investigar a possível produção de citocinas induzida pelo envenenamento por *H. lunatus* foi realizado um ensaio cinético em camundongos Swiss. Foram quantificadas a produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, INF- $\gamma$ , TNF, IL-17A e IL-10 utilizando a técnica de CBA. Os animais receberam a dose 20 µg de veneno e a coleta sanguínea foi feita 30, 180 e 360 min após a administração. Foram utilizados grupos controles para cada intervalo, sendo que nestes grupos os animais receberam PBS ao invés de veneno de *H. lunatus*. Apesar de uma aparente diferença na produção das citocinas IL-2 (180 min), INF- $\gamma$  (30 min), IL-17 (360 min) e IL-10 (180 min) entre o grupo tratado e o controle, a análise estatística revelou que essa diferença não foi significativa, provavelmente devido a alto valor do desvio padrão. Portanto, não se pode afirmar que houve diferença significativa entre o grupos tratado e o grupo controle na produção de IL-2, IL-4, INF- $\gamma$ , TNF, IL-17A e IL-10, como pode ser visualizado na Figura 27 A-F. A Figura 28A mostra a cinética da produção de IL-6 após a injeção do veneno. Foi observado um aumento estatisticamente significativo nos níveis séricos de IL-6 no tempo de 180 min quando comparado com placebo. Essa alteração pode ser melhor visualizada na Figura 28B.



**Figura 27- Produção citocinas em camundongos.**

Cinética da produção de IL-2 (A), IL-4 (B), INF- $\gamma$  (C), TNF (D), IL-17 (E) e IL-10 (F) em animais que receberam 20  $\mu$ g de veneno de *H. lunatus*. As análises foram realizadas 30, 180 e 360 min após a administração do veneno. Foram utilizados como controle animais que receberam PBS.



**Figura 28- Produção de IL-6 em camundongos.**

Cinética da produção de IL-6 em animais que receberam 20 µg de veneno de *H. lunatus* e em animais controle que receberam PBS. Análises foram realizadas 30, 180 e 360 min após a administração do veneno (A). Produção de IL-6 180 min após a administração de PBS (controle) ou 20 µg de veneno de *H. lunatus* (B). Valores representam as médias ± SD de 5 animais. \* $P < 0.05$  comparado com grupo controle. \*\* $P < 0,01$  comparado com grupo controle. \*\*\* $P < 0,001$  comparado com grupo controle.

**4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOTÓXICOS DO VENENO**

**4.2.1. Eletrocardiografia (ECG)**

Com o objetivo de investigar os efeitos do envenenamento causado pelo escorpião *H. lunatus* no coração, foi realizado eletrocardiograma em ratos (n=6)

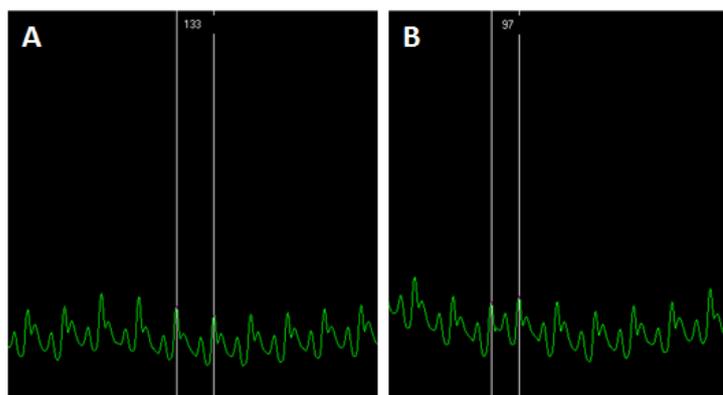
experimentalmente envenenados com 750 µg de veneno, conforme descrito anteriormente.

Em T0 todos os animais dos dois grupos apresentaram traçados de ECG similares, sendo que nenhuma alteração foi detectada.

Cinco minutos após a injeção do veneno de *H. lunatus* os primeiros sinais de envenenamento no grupo tratado foram identificados. Essa alteração foi demonstrada pelo aumento significativo da frequência cardíaca (média de 424 para 463 bpm), sendo que foi detectada a frequência cardíaca de 619 bpm em um dos animais. Nenhuma alteração foi observada no grupo controle neste intervalo.

Em T10, a frequência cardíaca do grupo tratado diminuiu para valores similares aos de T0, permanecendo inalterada até T30. Dentro do grupo tratado a frequência cardíaca apresentou um padrão cúbico de ( $R^2 = 74.36\%$ ;  $p = 0.0486$ ) e T5 indicou o maior valor de frequência cardíaca ( $p = 0.0380$ ), sendo os outros similares a T0. Dentro do grupo controle, a frequência cardíaca teve um padrão linear ( $R^2 = 93.04\%$ ;  $p = 0.0004$ ) e nenhuma diferença foi detectada entre os tempos avaliados.

A distância do intervalo RR foi utilizada para calcular a frequência cardíaca. A Figura 29 A mostra os traçados de um animal do grupo tratado, cujo intervalo RR foi de 133 ms (FC de 451 bpm) em T0 (Figura 29A) a 97ms (FC de 619 bpm) em T5 (Figura 29B).



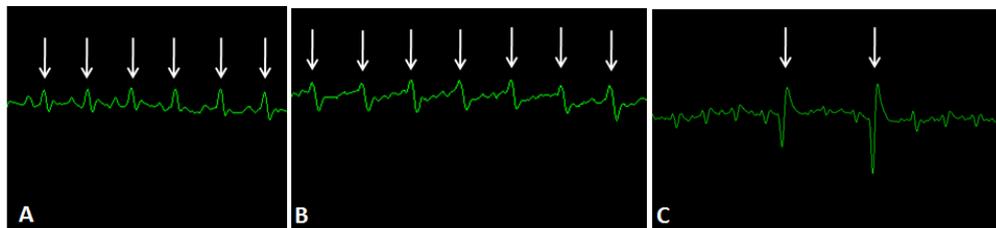
**Figura 29- Eletrocardiografia mostrando aumento da frequência cardíaca nos animais tratados.** Eletrocardiografia de um animal do grupo tratado mostrando a frequência cardíaca aumentada, indicada pela diminuição do intervalo RR de 133 ms (A) antes da administração do veneno a 97 ms (B) cinco minutos depois da administração. Velocidade 50mm/s, sensibilidade 2N, derivação II.

Arritmias foram detectadas apenas no grupo envenenado. Dois animais do grupo tratado, em T15, apresentaram complexo atrial prematuro e complexo ventricular prematuro (Figura 30) Outro animal do grupo tratado apresentou onda rS em T5 e depois um complexo ventricular prematuro em T25 (Figura 31).



**Figura 30- Eletrocardiografia mostrando complexo atrial e ventricular prematuro.**

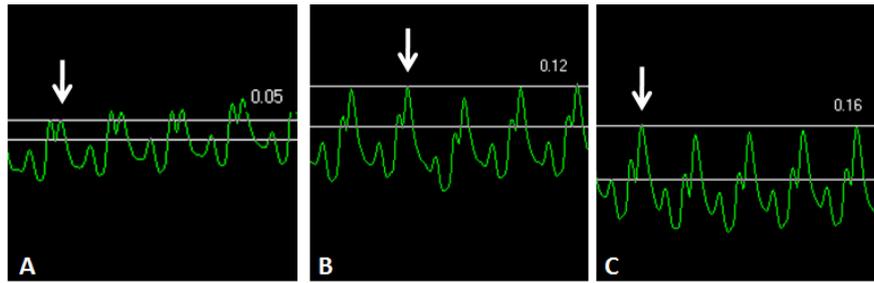
Eletrocardiografia de dois animais do grupo tratado apresentando complexo atrial prematuro (A) e complexo ventricular prematuro (B) 15 minutos depois da administração do veneno. Velocidade 50 mm/s, sensibilidade 2N, derivação II.



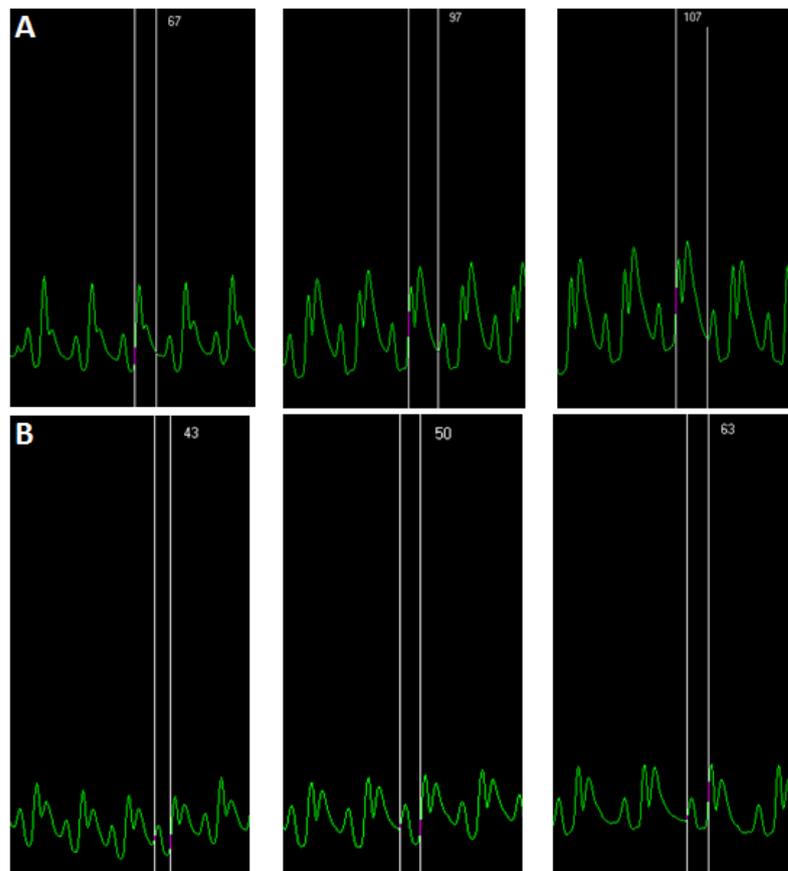
**Figura 31- Eletrocardiografia de um animal do grupo tratado.**

Em T0 todos complexos QRS foram normais (setas, A). Em T5 todos os complexos sofreram alteração na morfologia para ondas rS (setas, B). Em T25 foi detectado complexo ventricular prematuro (setas, C). Velocidade 50 mm/s, sensibilidade 2N, derivação II.

Outros sinais de envenenamento detectados nos animais tratados foram onda T aumentada em T20 (Figura 32), intervalo QT aumentado em T20 (Figura 33A), e intervalo PR aumentado em T30 (Figura 33B).



**Figura 32- Eletrocardiografia de um animal do grupo tratado mostrando aumento de onda T.**  
 Em T0 a onda T foi de 0,05 mV (seta, A). Em T20 a onda T mais que dobrou sua amplitude, alcançando 0,12 mV (seta, B). Em T30 a onda T foi de 0,16 mV (seta, C). Velocidade 50 mm/s, sensibilidade 2N, derivação II.

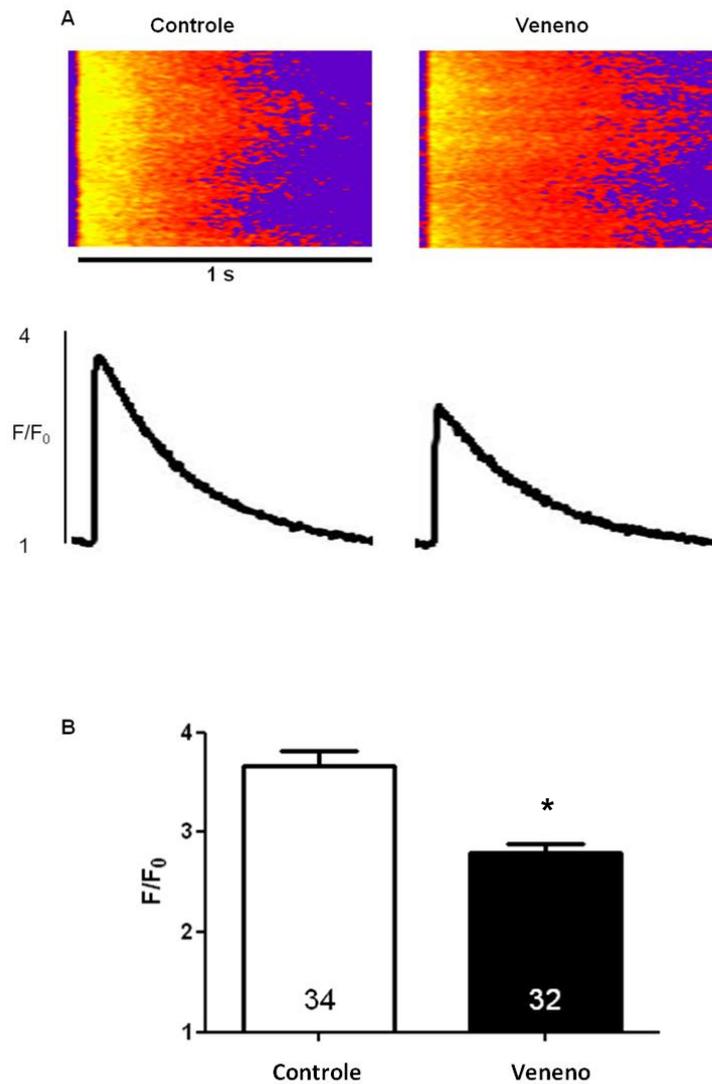


**Figura 33- Eletrocardiografia de dois animais do grupo tratado.**  
 Em A, foi detectado um aumento no intervalo QT de 67 ms em T0, para 97 ms em T20 e 107 ms em T30. Em B foi detectado um aumento no intervalo PR de 43 ms em T0, para 50 ms em T10 e 63 ms em T30. Velocidade 50 mm/s, sensibilidade 2N, derivação II.

#### **4.2.2. Análise do Transiente de Cálcio em Cardiomiócitos**

Após a identificação de alterações no funcionamento cardíaco por eletrocardiografia, foi investigado se o veneno de *H. lunatus* causava também alterações no transiente de cálcio em cardiomiócitos isolados de camundongos C57BL/6, conforme metodologia já descrita.

Durante a medição do transiente, o pico de cálcio, que é dado pela razão entre a fluorescência máxima e fluorescência basal ( $F/F_0$ ), foi significativamente menor nas células tratadas com veneno quando comparadas às células do controle (Figura 34). Enquanto o controle apresentou valores de  $3,66 \pm 0,154$  no pico de  $Ca^{2+}$ , o grupo tratado com veneno obteve uma relação no transiente de  $2,79 \pm 0,093$ .



**Figura 34- Transiente global de Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos.**

(A) Imagens representativas da varredura de cardiomiócitos incubados com a sonda sensível a Ca<sup>2+</sup>, estimulados com pulsos elétricos. Foram analisados cardiomiócitos controle e cardiomiócitos que foram incubados com 0,025 µg veneno por 5 minutos. (B) Pico do transiente de cálcio, relação entre fluorescência máxima sobre a fluorescência basal. Foram avaliadas 34 células no grupo controle e 32 no grupo veneno. (Os dados são expressos como média ± EPM, \*P < 0,0001 em relação ao controle).

## 5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a diversidade de moléculas identificadas em venenos escorpiônicos aumentou consideravelmente devido aos avanços de técnicas como espectrometria de massas e seqüenciamento de DNA em larga escala. Inicialmente, a grande maioria destes estudos visava identificar e caracterizar componentes responsáveis pelo envenenamento ocasionado pela picada destes animais, principalmente de escorpiões de relevância médica, como os da família Buthidae (RODRIGUEZ DE LA VEGA *et al.*, 2009). Poucos trabalhos foram feitos com venenos de escorpiões que não representam grande perigo para mamíferos, como o de *H. lunatus*. Porém, como todo escorpião produz veneno e este pode causar alterações em organismos vivos é importante ressaltar a relevância da caracterização de peçonhas de espécies novas ou pouco estudadas, mesmo que estas não possuam grande relevância médica documentada (DUTTO *et al.*, 2012). Além disso, o estudo proteômico de venenos representa uma grande fonte para identificação de moléculas com potencial biotecnológico.

De acordo com o Instituto Nacional de Salud (INS), o escorpião *H. lunatus* é a espécie mais abundante nas zonas urbanas de Lima, sendo o principal responsável pelos casos de envenenamento nesta área. Em 1972, Cáceres e colaboradores descreveram pela primeira vez os sintomas apresentados por mamíferos envenenados por *H. lunatus*. Neste estudo foram utilizados diferentes animais experimentais (ratos, camundongos, coelhos, hamsters e porquinho-da-índia) e diferentes vias de administração do veneno (intramuscular, intraperitoneal e intradérmica). Além de sintomas neurotóxicos, típicos de envenenamento escorpiônico, também foi observada necrose no local da injeção quando esta foi administrada por via intradérmica. Zavaleta e colaboradores (1981) avaliaram a toxicidade do veneno de *H. lunatus* para camundongos e observaram alterações na pressão sanguínea e na frequência respiratória de cães envenenados. Em 2002 Escobar e colaboradores realizaram uma purificação parcial do veneno de *H. lunatus* por cromatografia de troca iônica, que resultou no isolamento de três toxinas básicas: HI1, HI2 e HI3. As três apresentaram efeitos de paralisia, sendo que HI1 é capaz de paralisar insetos, HI2 crustáceos e HI3 camundongos. Também foi

observado que quando HI3 foi inoculada no músculo gastrocnemio de camundongos houve um aumento dos níveis séricos de creatina quinase.

Diante dos escassos estudos existentes acerca da composição e ação do veneno de *H. lunatus* e considerando-se que a maioria dos existentes é antiga, fez-se necessário um estudo mais aprofundado nesta área.

Neste trabalho, foi feita uma análise geral dos componentes do veneno de *H. lunatus*. Para o estudo da variedade na composição de proteínas e peptídeos, foram utilizadas as técnicas de SDS-PAGE, espectrometria de massas e cromatografia de fase reversa. Foi observada a existência de moléculas de tamanhos variados sendo possível identificar bandas com massas moleculares menores que 15 kDa até maiores que 70 kDa. Para possibilitar a visualização de neurotoxinas presentes no veneno foi realizado um gel com maior concentração de acrilamida (15%) e um padrão de baixo peso molecular, já que estas moléculas normalmente são pequenas. Dessa forma, foi possível identificar a existência de proteínas com peso de aproximadamente de 8,5 kDa, assim como a presença de uma banda fortemente corada com massa em torno de 3,5 kDa. O aparecimento de moléculas com massa dentro desta faixa sugere a presença de neurotoxinas no veneno de *H. lunatus*, como já era esperado para um veneno escorpiónico (PLESSIS *et al.*, 2008).

A espectrometria de massa tem sido a técnica mais usada para o estudo de proteínas e peptídeos de venenos animais, já que permite a obtenção de grande quantidade de dados em um tempo reduzido e com quantidades mínimas de amostra (MARTIN-EAUCLAIRE, 2013; FAVREAU *et al.*, 2006). Neste trabalho foi observada a existência de moléculas de 1000 a 5000 Da, que representam, em grande parte a diversidade peptídica do veneno. Também foram identificadas proteínas com massa entre 5000 a 8000 Da, indicando provavelmente a presença das neurotoxinas componentes do veneno. Adicionalmente observou-se a presença de proteínas com massa entre 8000 a 14000. Apesar de ter sido utilizado padrão que possibilitasse a detecção de proteínas maiores, estas não foram visualizadas na espectrometria de massa. Porém, como foi demonstrado anteriormente por SDS-PAGE e por zimograma, proteínas de alto peso molecular estão presentes no veneno. A não observação destas moléculas se deve, provavelmente, ao fato de que elas podem não terem sido ionizadas corretamente.

O perfil cromatográfico do veneno de *H. lunatus* foi obtido por meio de purificação em HPLC de fase reversa. Foram observadas aproximadamente 19 frações e estas tiveram sua atividade fosfolipásica testada, como será discutido posteriormente.

Após a caracterização geral do conteúdo proteico e peptídico visou-se caracterizar algumas atividades tóxicas do veneno de *H. lunatus*. Para avaliar sua letalidade, foi feita a determinação da  $DL_{50}$  via intraperitoneal em camundongos. Nishikawa e colaboradores (1994) analisaram venenos de diferentes escorpiões brasileiros e os classificaram de acordo com a toxicidade apresentada. Neste estudo, os venenos das espécies *Tityus stigmurus* ( $DL_{50} = 0,773$  mg/kg), *T. bahiensis* ( $DL_{50} = 1,062$  mg/kg) e *T. serrulatus* ( $DL_{50} = 1,160$  mg/kg) foram considerados altamente tóxicos, enquanto o de *T. cambridgei* ( $DL_{50} = 12,136$  mg/kg) apresentou toxicidade moderada e os de *Rhopalurus agamemnon* ( $DL_{50} = 36,363$  mg/kg) e *Brotheas amazonicus* ( $DL_{50} = 90,909$  mg/kg) foram definidos como sendo praticamente não tóxicos para camundongos. A dose de 21,55 mg/kg foi definida como a  $DL_{50}$  via i.p. do veneno do escorpião peruano estudado neste trabalho. Levando em consideração as  $DL_{50}$  apresentadas anteriormente podemos classificar o veneno de *H. lunatus* como moderadamente tóxico. Este dado se confirma pelo fato de que, apesar da administração de uma dose alta de veneno, os camundongos envenenados experimentalmente apresentaram agitação, salivação, lacrimejamento e sudorese, que são sintomas neurotóxicos típicos de envenenamento escorpiônico.

Sabe-se que a injeção intracranial é mais sensível para detectar neurotoxicidade de moléculas do que a via intraperitoneal ou subcutânea (SCHWEITZ, 1984) e, por este motivo, a  $DL_{50}$  por esta via também foi determinada. Após a injeção contendo veneno os camundongos apresentaram comportamento anormal, comprovando mais uma vez a toxicidade moderada do veneno. A  $DL_{50}$  em camundongos foi calculada, sendo de 0,1 mg de veneno por kg de animal.

As neurotoxinas presentes em venenos escorpiônicos são moléculas básicas, de baixo peso molecular, que se ligam a canais iônicos com alta afinidade (CATTERALL, 2007). No veneno de *H. lunatus* foram identificados alguns componentes com massa molecular entre 6 e 8 kDa, o que indica a presença de toxinas específicas para canais para  $Na^+$ . Essas neurotoxinas apresentam estrutura

tridimensional altamente conservada e provavelmente são as principais responsáveis pelos sintomas neurotóxicos apresentados pelos camundongos (PLESSIS *et al.*, 2008).

Para avaliar algumas atividades enzimáticas do veneno de *H. lunatus* foram investigadas a atividade proteolítica, fosfolipásica e hialuronidásica.

Alguns animais como serpentes, aranhas, animais marinhos e lagartos possuem venenos com atividade proteolítica (COLOGNA *et al.*, 2009). A presença destas proteases em escorpiões já foi demonstrada, através de zimogramas. Foram detectadas enzimas gelatinolíticas no veneno das espécies *T. bahiensis*, *T. serrulatus* e *Hemiscorpius lepturus*, sendo que esta última também apresentou atividade caseinolítica. As enzimas encontradas em *T. bahiensis* e *T. serrulatus* são serino-proteases e o pH ótimo para sua atividade é 8,0 (ALMEIDA *et al.*, 2002; SEYEDIAN *et al.*, 2010). Recentemente, Venâncio e colaboradores (2013) também detectaram a presença de metalo-proteases em espécies do gênero *Tityus* (*T. bahiensis*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus*). A determinação da atividade proteolítica apresentada pelo veneno do escorpião *H. lunatus* foi realizada através de um método bastante sensível, que utiliza dimetilcaseína como substrato. Esta atividade foi determinada como 0.46 U/mg.min. e demonstrou ser dose dependente.

A atividade descrita acima já foi investigada anteriormente por Escobar e colaboradores, em 2002, não tendo sido encontrada atividade proteolítica no veneno de *H. lunatus*. Esta divergência se deu, provavelmente, pelo fato do método realizado não ser tão sensível quanto o que foi utilizado pelo nosso grupo.

A função de enzimas proteolíticas em venenos escorpiônicos ainda não é bem elucidada. Entretanto existem várias possíveis explicações para a presença destas enzimas nos venenos. Uma delas é que essas moléculas aumentam a permeabilidade dos tecidos, podendo atuar como fatores de espalhamento dos componentes do veneno. Elas também podem ser responsáveis pelas pancreatites observadas em pacientes envenenados, que é resultante da ativação intrapancreática do tripsinogênio (ALMEIDA *et al.*, 2002). Ainda não se sabe ao certo quais as reais razões das pancreatites agudas presentes em mamíferos picados por escorpiões. Porém já foi descrito que alguns venenos escorpiônicos foram capazes

de aumentar a quantidade de enzimas presentes no suco pancreático (RENNER *et al.*, 1983).

Já foi relatado que venenos de alguns escorpiões não apresentam atividade fosfolipásica (SOSA *et al.*, 1979; RAMANAIAH *et al.*, 1990). Entretanto, outros trabalhos mais recentes conseguiram detectar a presença de fosfolipases em venenos escorpiônicos como os de *Opisthacanthus cayaporum* (SCHWARTZ *et al.*, 2008) e *Rhopalurus junceus* (GARCÍA-GÓMEZ *et al.*, 2011).

As fosfolipases A2 podem ser divididas em 12 grupos, de acordo com a similaridade de seqüência. Escorpiões normalmente apresentam fosfolipases A2 pertencentes à classe III, sendo estas compostas de proteínas heterodiméricas que desempenham atividade neurotóxica através da inibição de receptores de rianodina (classe de canais para cálcio) (ZAMUDIO *et al.*, 1997). Entretanto, recentemente foi relatada a presença de fosfolipase D com massa molecular de 33 kDa no veneno do escorpião iraniano *Hemiscorpius lepturus* (BORCHANI *et al.*, 2011).

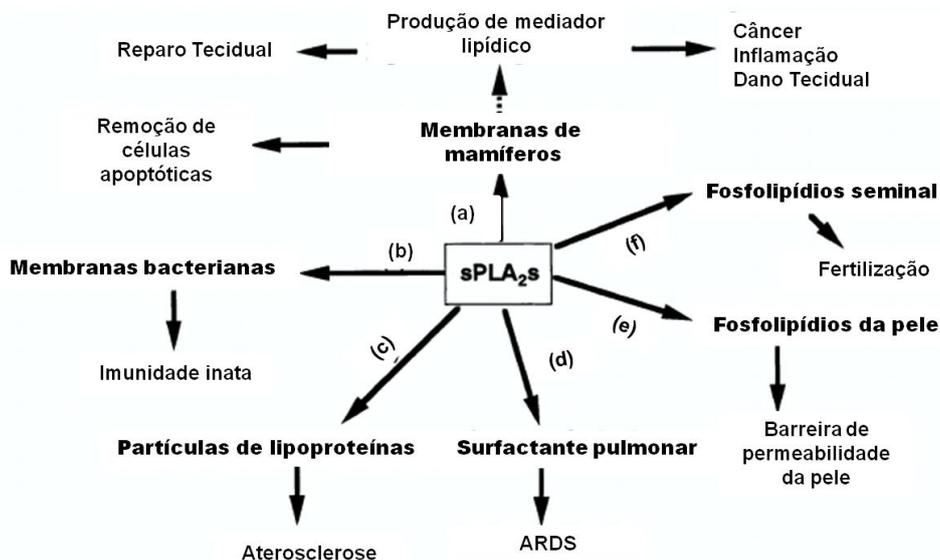
A atividade fosfolipásica do veneno de *H. lunatus* foi examinada através do método hemolítico indireto (GUTIERREZ *et al.*, 1988), sendo que 0,125 µg de amostra foi capaz de produzir um halo de 10 mm de diâmetro (dose mínima fosfolipásica). Diante deste dado, as frações resultantes da cromatografia do veneno em coluna C18 também foram testadas para verificar qual delas seria a provável responsável por esta propriedade do veneno. Uma das frações que apresentou atividade fosfolipásica foi escolhida para ser melhor analisada. Para isto foi feita espectrometria de massa da fração em questão, revelando que este possui massa moleculares de 11914,5 Da, 13650,6 Da, dentre outros. Já foi relatada a existência de fosfolipase escorpiônica com massa molecular de 14 kDa, como a de *Opisthacanthus cayaporum* (SCHWARTZ *et al.*, 2008). Este resultado é bem próximo do obtido para o veneno de *H. lunatus*.

Valdez-Cruz e colaboradores (2004) purificaram a primeira proteína de um escorpião da família Luridae (*Anuroctonus phaiodactylus*). Esta enzima apresentou uma atividade fosfolipásica dependente de cálcio e foi chamada de phaiodactilipina. A Phaiodactilipina foi capaz de causar inflamação muscular em camundongos (porém sem danificar a membrana basal, como ocorre com fosfolipases provenientes

de serpente), apresentou efeito hemolítico direto em eritrócitos humanos e retardou o tempo de coagulação sanguínea. Esta fosfolipase, considerada inusitada, apresentou pouca similaridade com outras fosfolipases já conhecidas (VALDEZ-CRUZ *et al.*, 2004). Este estudo exemplifica a possibilidade de se encontrar moléculas biologicamente importantes, e ainda desconhecidas, em venenos animais e demonstra a possibilidade de se encontrar moléculas semelhantes em *H. lunatus*.

Além de serem importantes para digestão de presas, as fosfolipases também estão relacionadas com os mais diversos eventos biológicos, como: inflamação, agregação plaquetária, mionecrose, hemólise, neurotoxicidade, cardiotoxicidade e bloqueamento de canais (LAMBEAU, 1999). Assim, estas enzimas podem estar associadas com os sintomas tóxicos presentes em envenenamentos.

Em humanos, as fosfolipases podem estar relacionadas à digestão, obesidade e diabetes (HUGGINS *et al.*, 2002). Acredita-se que estas moléculas também estejam envolvidas em outros eventos biológicos, tais como reparo ou dano tecidual, auxílio no combate às bactérias, desenvolvimento de aterosclerose e doenças respiratórias, fertilização entre outros, que são descritos com mais detalhes na Figura 35 (MURAKAMI e KUDO, 2004). Tendo em vista os diversos papéis que estas enzimas possivelmente desempenham em humanos e outros mamíferos, fica evidente sua importância como ferramenta de estudo para o desenvolvimento biotecnológico.



**Figura 35- Funções das fosfolipases secretadas (sPLA<sub>2</sub>s).**

(a) As fosfolipases podem atuar em células de mamíferos, provocando a produção de mediadores lipídicos, que são capazes de mediar eventos relacionados ao câncer, inflamação, dano tecidual ou até reparo tecidual. As fosfolipases também podem estar relacionadas com a remoção de células apoptóticas. (b) Estas fosfolipases podem participar da imunidade inata degradando os fosfolipídios de membrana de bactérias. (c) As fosfolipases podem estar envolvidas no desenvolvimento da aterosclerose, já que hidrolisa fosfatidilcolina nas partículas de lipoproteínas. (d) Estas enzimas hidrolisam surfactante presentes nos pulmões e esta hidrólise se realizada de forma excessiva resulta em doenças respiratórias graves, como ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*). (e) Na pele, as fosfolipases podem estar relacionadas com a permeabilidade da pele. (f) No homem, estas enzimas podem regular a espermatogênese e a reação acrossômica, estando assim relacionadas com a fertilidade masculina (MURAKAMI e KUDO, 2004).

A atividade hialuronidásica do veneno de *H. lunatus* foi testada utilizando a técnica de zimograma (CEVALLOS *et al.*, 1992). A hialuronidase identificada apresentou massa molecular de 41 kDa. Esta mesma enzima, apresentando a mesma massa molecular foi detectada no veneno de *T. serrulatus*. Este dado é compatível com resultados publicados anteriormente, nos quais enzimas de aracnídeos com esta atividade apresentaram massa molecular em torno de 40 kDa (BARBARO, 2005; SEYEDIAN, 2010). Hialuronidases também são encontradas em organismos patogênicos, serpentes, insetos venenosos e tecidos malignos (KREIL, 1995). A presença de hialuronidases em venenos está relacionada ao espalhamento mais efetivo da peçonha, dessa forma, mesmo não sendo consideradas moléculas tóxicas, elas contribuem para o envenenamento local e sistêmico, podendo assim dificultar a ação dos antivenenos utilizados em pacientes (PESSINI *et al.*, 2001).

Como as hialuronidasas aumentam a permeabilidade de células e tecidos, elas têm sido utilizadas terapêuticamente, pois são capazes de facilitar a absorção e diminuir o desconforto gerado pela injeção de substâncias pelas vias subcutânea e intramuscular. Elas também possibilitam a reabsorção do excesso de fluídos e de sangue extravasado em tecidos, assim como aumentam a efetividade de anestésicos locais (MOREY *et al.*, 2006). Hialuronidasas também podem exercer seu efeito terapêutico auxiliando no combate ao câncer. Alguns estudos sugerem que adjuvantes locais ou sistêmicos utilizando hialuronidase, quando combinados com drogas anti-tumorais, podem aumentar a eficácia do tratamento. Existem evidências de que estas moléculas aumentam a difusão dos fármacos, aumentando assim a captação de drogas pelos tecidos e tumores (CIVALLERI *et al.*, 1997). Assim, essas enzimas são ferramentas úteis para cirurgia, dermatologia, oncologia, entre outros campos profissionais. Além disso, inibidores potentes de hialuronidasas têm efeitos antialérgicos, podendo assim ser utilizados no desenvolvimento de drogas antialérgicas (MOREY *et al.*, 2006; PESSINI *et al.*, 2001)

A fim de avaliar a imunogenicidade do veneno, foi realizado um *Western Blot* com o soro anti-*H. lunatus* produzido em coelho. Através deste método foi possível detectar que grande parte das proteínas observadas através de SDS-PAGE do veneno foi reconhecida, revelando que tais proteínas do veneno são imunogênicas. Para avaliar possíveis reatividades cruzadas entre o soro anti-veneno de *H. lunatus* com proteínas de venenos de outros escorpiões, foi realizado outro *Western Blot*. O imunoenensaio revelou que o soro testado reconheceu bandas dos venenos de *A. australis*, *C. sculpturatus*, *T. serrulatus* indicando a existência de reatividade cruzada. Em geral, o soro reconheceu proteínas de baixa massa molecular (principalmente dos venenos de *A. australis*, *T. serrulatus* e do próprio *H. lunatus*), em torno de 8,5 kDa, e de massa maior que 38 kDa. Dessa forma, pode-se perceber que mesmo o veneno de *H. lunatus* sendo considerado moderadamente tóxico, ele foi capaz de gerar anticorpos que reconhece venenos de escorpiões altamente tóxicos, demonstrando a presença de toxinas similares nestes animais.

A técnica de ELISA foi utilizada para melhor quantificar a reatividade cruzada detectada anteriormente por *Western Blot*. Soros de coelhos imunizados com veneno de *H. lunatus* ou de *T. serrulatus* foram utilizados para testar a reatividade cruzada entre os escorpiões *H. lunatus*, *T. serrulatus*, *C. sculpturatus* e *A. australis*.

Conforme o esperado, cada soro reconheceu mais fortemente o seu veneno cognato, mas uma reatividade considerada alta também foi detectada com outros venenos, confirmando o que foi observado no *Western Blot*. O soro desenvolvido contra o veneno de *H. lunatus* apresentou um reconhecimento considerável pelos venenos de *C. sculpturatus* e de *T. serrulatus*. Já o veneno de *A. australis* foi reconhecido fracamente por este soro. O soro anti-veneno de *T. serrulatus* reconheceu todos os venenos testados, sendo que apresentou um maior reconhecimento pelo veneno de *A. australis* quando comparado com o soro anti-veneno de *H. lunatus*. O reconhecimento cruzado observado se deve ao fato de que as neurotoxinas escorpiônicas apresentam alto grau de similaridade. Novamente é possível observar que o soro anti-veneno de *H. lunatus* foi capaz de reconhecer venenos de importância médica. Adicionalmente, o veneno altamente tóxico de *T. serrulatus* foi capaz de gerar anticorpos que também reconheceram o veneno de *H. lunatus*.

A maioria dos escorpiões encontrados nas Américas apresenta maior teor de toxinas do tipo  $\beta$ , enquanto os escorpiões do Velho Mundo têm venenos ricos em toxinas do tipo  $\alpha$  (COOK *et al.*, 2002). Dessa forma, como *H. lunatus* é encontrado na América do Sul, espera-se que seu veneno seja composto principalmente por neurotoxinas do tipo  $\beta$ . Assim, os resultados aqui apresentados são coerentes tendo em vista que o soro anti-veneno de *H. lunatus* também reconheceu consideravelmente o veneno de *C. sculpturatus* e que grande parte do veneno desse escorpião é composta por toxinas tipo  $\beta$ . O veneno de *T. serrulatus* é um dos poucos venenos escorpiônicos que apresenta tanto neurotoxinas do tipo  $\alpha$  quanto  $\beta$  (COLOGNA *et al.*, 2009), e por isso também foi reconhecido, porém com menor intensidade. Esta hipótese foi reforçada pelo fato de que o veneno de *A. australis*, que só apresenta neurotoxinas do tipo alfa, não teve um reconhecimento considerável pelo soro anti-veneno de *H. lunatus*, mas foi reconhecido pelo soro anti-veneno de *T. serrulatus*.

A fim de investigar a origem dessa reatividade cruzada foram realizados ELISAs para testar o reconhecimento do veneno de *H. lunatus* por soros de coelhos imunizados com as principais toxinas de *T. serrulatus* (Ts1, Ts 2, Ts 3), com a anatoxina TsNTxP, com o veneno total de *T. serrulatus* (Ts total). Como experimento

controle foi realizado o mesmo ensaio, porém com o veneno de *T. serrulatus*. Conforme o previsto os soros anti-toxinas, anti-anatoxina e anti-veneno total de *T. serrulatus* reconheceram significativamente veneno de *T. serrulatus* e como foi observado nos ensaios anteriores houve reatividade cruzada do soro anti-veneno de *H. lunatus* com o veneno de *T. serrulatus*. Quando testados com o veneno de *H. lunatus* os soros pré-imune e contra as toxinas de *T. serrulatus* apresentaram baixa reatividade com o veneno de *H. lunatus*. Por outro lado, o soro anti-TsNTxP reagiu moderadamente com o mesmo veneno. Estes resultados mostram que, provavelmente, as toxinas de *H. lunatus* apresentam pelo menos alguns epítomos diferentes dos apresentados pelas toxinas de *T. serrulatus*, porém mais estudos são necessários acerca da especificidade e estrutura das neurotoxinas do veneno de *H. lunatus* para uma caracterização precisa.

Para analisar os efeitos do envenenamento por *H. lunatus*, foi feita a análise do sangue de animais (ratos) tratados com o veneno e de animais controle. O sangue foi coletado 30 min após a administração dos tratamentos e analisado. Não houve diferença significativa entre os valores médios de plaquetas, hemácias, hemoglobina, volume globular, volume globular médio, hemoglobina globular média e concentração de hemoglobina globular média apresentados pelo grupo envenenado e pelo grupo controle. Já foi relatado aumento de eritrócitos, volume globular e hemoglobina em cães tratados com veneno de *T. serrulatus* (RIBEIRO *et al.*, 2009). Em 2010, Cusinato e colaboradores também verificaram um aumento no hematócrito, na contagem de hemácias e na concentração de hemoglobina em ratos Wistar envenenados com o mesmo veneno citado acima. O aumento desses parâmetros se dá provavelmente por hemoconcentração resultante da desidratação causada pela intensa salivação, lacrimejamento, sudorese e diarreia observadas nas fases iniciais de envenenamentos escorpiônicos. Porém, deve-se ressaltar que em ambos os casos o aumento significativo foi detectado, principalmente, 2 horas após a administração do veneno, tempo superior ao utilizado neste trabalho. Sendo assim pode-se inferir que 30 min não foram suficientes para detectar alteração no eritrograma dos ratos tratados com veneno de *H. lunatus*. Leucocitose com neutrofilia é comumente observada em acidentes escorpiônicos (CUPO *et al.*, 2003; PESSINI *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2009), provavelmente devido à liberação de catecolaminas. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho mostram uma

diminuição significativa de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos totais em ratos envenenados pelo escorpião *H. lunatus*. Pode-se sugerir que devido ao curto intervalo entre a administração do veneno e a coleta sanguínea (30 min), a produção de leucócitos não teria sido suficiente para gerar leucocitose e os leucócitos já existentes na circulação provavelmente estariam em processo de migração da corrente sanguínea para locais de inflamação, resultando em uma diminuição dessas células circulantes no sangue.

Além da contagem de células sanguíneas, foi feita a análise da concentração das proteínas no plasma dos animais controle e dos animais que receberam veneno de *H. lunatus*. No presente trabalho, foi observado um aumento significativo tanto na concentração de albumina quanto na de proteína plasmática total, corroborando com os resultados obtidos por Pessini (2003) e por Cusinato (2010) para o veneno de *T. serrulatus*, indicando um quadro de desidratação dos animais envenenados. Além disso, a eletroforese revelou um aumento das frações de alfa e gama-globulinas e uma diminuição de beta-globulinas nos animais tratados, quando comparados com os animais controles. O aumento de proteínas de fase aguda também já foi relatado em envenenamentos escorpiônicos, sendo que níveis elevados da fração de alfa-globulina podem estar relacionados com lesão tecidual intensa (PESSINI *et al.*, 2003, CUSINATO *et al.*, 2010).

Já foram detectadas lesões em órgãos de animais injetados com veneno de escorpião (CORREA *et al.*, 1997). Portanto, após a observação do aumento das proteínas de fase aguda no soro dos animais tratados com o veneno de *H. lunatus*, foi investigado se tal veneno seria capaz de causar alterações nos órgãos dos animais envenenados.

Sabe-se que o rim é o principal órgão responsável por eliminar substâncias tóxicas do organismo. Para avaliar suas funções, foram dosados os níveis de uréia e creatinina presentes no sangue dos animais envenenados. A concentração de uréia no sangue dos ratos que receberam a dose de veneno foram similares a apresentada pelo grupo controle. Entretanto, foi observada uma diminuição significativa nos níveis de creatinina no sangue dos ratos envenenados quando comparados com os animais controle. Pode-se concluir então que o veneno de *H. lunatus*, na dose utilizada, não foi prejudicial para o funcionamento renal.

Na presença de lesão tecidual causada por envenenamentos, ocorre liberação de enzimas intracelulares na corrente sanguínea, como creatina cinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST) (PESSINI, 2001). Análises bioquímicas revelaram níveis elevados de CK, LDH e AST no soro de animais injetados com veneno de *H. lunatus*, indicando a existência de lesão muscular causada pela ação do veneno. Esses dados são similares aos obtidos por El Alfay (2007) para o veneno de *Leiurus quinquestriatus*, por Adi-Bessalem (2008) para o de *Androctonus australis*, por Cusinato (2010) para o de *T. serrutaus* e por Pinto (2010) para o de *T. fasciolatus*. No presente trabalho também foi observado o aumento da atividade da isoenzima CK-MB no soro dos animais tratados com veneno de *H. lunatus*. Esta isoenzima é encontrada principalmente no miocárdio e quando encontrada em altos níveis no soro indica danos no músculo cardíaco. Estes resultados mostram que apesar do veneno de *H. lunatus* não ser considerado letal, ele é capaz de causar alterações bioquímicas similares, porém em maior dose.

Trinta minutos após a administração do veneno ou de placebo os animais tiveram os rins, fígado, baço, pulmões e coração retirados, fixados e analisados microscopicamente, a fim de confirmar as lesões teciduais sugeridas pelo aumento das enzimas descritas anteriormente. Não foi detectada nenhuma anomalia nos rins, fígado e baço dos animais tratados. Sabe-se que envenenamentos escorpiônicos podem afetar consideravelmente o sistema cardio-respiratório. Contrariando o que era esperado, não foi encontrada nenhuma alteração microscópica significativa no coração dos ratos envenenados. Entretanto, como os animais sofreram punção intracardíaca, a preservação do órgão ficou comprometida, prejudicando a análise microscópica. A ocorrência de alterações pulmonares decorrentes de envenenamentos por escorpiões já foi relatada diversas vezes na literatura. Entre elas estão: edema pulmonar (BAHLOUL *et al.*, 2011), hemorragia (PINTO *et al.*, 2010) e inflamação (PANEQUE-PERES *et al.*, 2009). Neste estudo, foi identificada hemorragia intensa e difusa nos pulmões dos animais tratados com veneno de *H. lunatus*, confirmando a existência de lesão pulmonar ocasionada pelo envenenamento.

Recentemente foi verificado que a resposta inflamatória sistêmica também desempenha um importante papel no desenvolvimento das manifestações clínicas apresentadas por vítimas de escorpionismo, sugerindo que o quadro apresentado

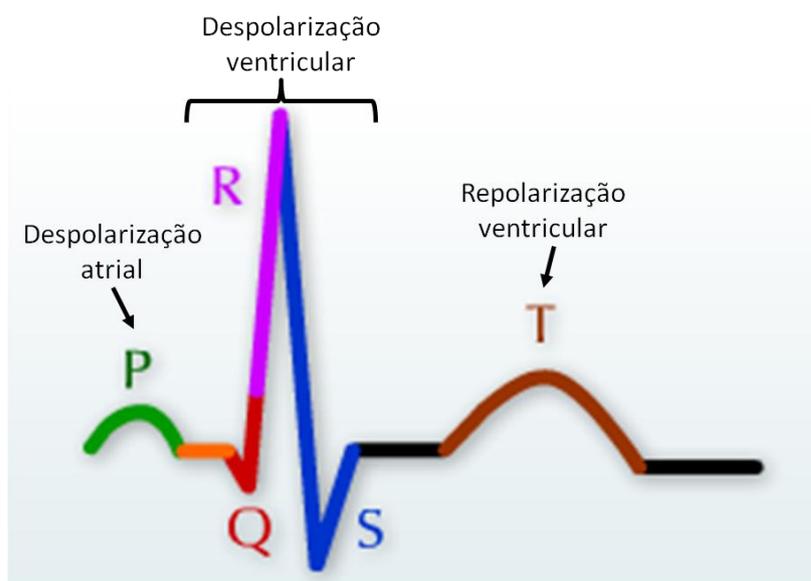
não se deve apenas a ação direta das toxinas. Em modelos de envenenamento severo foi observado que o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias está associado ao desequilíbrio imunológico, falência múltipla dos órgãos e morte (PETRICEVICH, 2010).

Citocinas estão envolvidas na regulação e amplificação da resposta imune e na indução de lesão tecidual, sendo cruciais para o desencadeamento de respostas inflamatórias sistêmicas (PESSINI *et al.*, 2003). Citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF e INF- $\gamma$ ) podem mediar tanto efeitos locais quanto efeitos sistêmicos da inflamação. Dentre as manifestações locais está a ativação do endotélio, aumento da permeabilidade vascular e a consequente migração leucocitária para os locais inflamados, adicionalmente os leucócitos são ativados e ocorre destruição tecidual. Já os efeitos sistêmicos incluem principalmente febre e resposta de fase aguda (PETRICEVICH, 2002). Em 2003, Fukuhara e colaboradores observaram o aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 e da citocina anti-inflamatória, IL-10, em pacientes envenenados por *T. serrulatus*. Neste trabalho, os autores obtiveram uma correlação positiva entre a produção de citocinas e a severidade do envenenamento, concluindo que, pelo menos em parte, a patofisiologia do envenenamento causado por *T. serrulatus* é mediada por essas moléculas (FUKUHARA *et al.*, 2003). Petricevich e colaboradores (2002) analisaram a cinética da produção de citocinas em camundongos envenenados por *T. serrulatus* e identificaram um aumento das seguintes citocinas: IL-1- $\alpha$ , 2 horas após a administração do veneno; IL-1 $\beta$  com um pico 2 horas e outro 18 horas após o envenenamento; IL-6, com aumento gradual atingindo o nível máximo 4 horas depois da injeção do veneno; INF- $\gamma$ , 4 horas após o envenenamento e IL-10, com níveis elevados entre 6 e 8 horas após a injeção. No presente trabalho foi avaliado a produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, INF- $\gamma$ , TNF, IL-17A e IL-10 após 30, 180 (3 h) e 360 min (6 h) de envenenamento. De todas as citocinas avaliadas, apenas os níveis de IL-6 encontraram-se significativamente alterados. O nível máximo de produção de IL-6 foi alcançado 3 horas após a administração do veneno, o que corrobora com os dados obtidos por Petricevich. Este resultado também está de acordo com o aumento de proteínas de fase aguda observado anteriormente neste trabalho, já que a IL-6 está relacionada com a indução da produção dessas proteínas. Contrariando o esperado, os níveis das outras citocinas não sofreram

alteração após o envenenamento. Porém uma análise mais acurada, com diferentes doses e diferentes intervalos, deve ser feita para a obtenção de um resultado mais preciso, uma vez que alterações foram sugeridas nas citocinas IL-2, INF- $\gamma$ , IL-17 e IL-10, porém sem alcançar significância estatística.

Já é sabido que a severidade dos envenenamentos escorpiônicos está associada às alterações hemodinâmicas e cardiorrespiratórias, que podem culminar em falência cardíaca, edema pulmonar e morte. As neurotoxinas presentes no veneno atuam em canais iônicos que levam à liberação massiva de neurotransmissores como acetilcolina, noradrenalina e adrenalina (CUPO e HERING, 2002; PINTO *et al.*, 2010). As alterações cardíacas observadas em envenenamentos escorpiônicos podem ser resultantes da liberação exacerbada de catecolaminas, da ação tóxica direta do veneno e ainda da ação de citocinas produzidas após o envenenamento, como dito anteriormente (CUPO e HERING, 2002).

O eletrocardiograma representa a atividade elétrica do coração. Para facilitar o entendimento dos resultados obtidos nas análises eletrocardiográficas dos ratos envenenados, a Figura 36 mostra a representação esquemática das ondas normalmente observadas nesse exame. A onda P representa a despolarização das células atriais, que irá levar a contração do átrio, enquanto o complexo QRS indica a despolarização das células ventriculares, gerando a contração ventricular. Já a onda T ilustra a repolarização ventricular, que culmina no relaxamento dos ventrículos (DALE DUBLIN, 1980).



**Figura 36- Ondas de um ECG normal.**

A onda P está associada a despolarização atrial, o complexo QRS representa a despolarização dos ventrículos e a onda T indica a repolarização ventricular. (Fonte: <http://fisiologiaessencial.blogspot.com.br/2010/02/ondas-do-ecg-normal-e-seus-significados.html>). (Adaptado).

No presente estudo, foi observado aumento da frequência cardíaca em ratos que receberam a dose de veneno de *H. lunatus*. Este resultado corrobora com os obtidos por Pinto (2010) para o veneno de *T. fasciolatus* e está de acordo com o esperado, já que envenenamentos escorpionicos levam ao aumento da liberação de adrenalina e esta apresenta efeito cronotrópico positivo.

Venenos escorpionicos geralmente interferem na regulação da atividade elétrica cardíaca, causando desequilíbrio iônico entre os espaços inter e extracelular. Este fato pode levar ao aumento da duração da fase de despolarização celular gerando um estado de hiper excitação (TILLEY, 1992). Este processo pode explicar a origem dos complexos atrial e ventricular observados nos ratos tratados com veneno de *H. lunatus*.

Um efeito sistêmico comumente observado em envenenamentos escorpionicos é o desequilíbrio eletrolítico causado pela desidratação e perda eletrolítica. Esta alteração pode ser diagnosticada pelo ECG através da presença de ondas T aumentadas. A amplitude das ondas T deve ser menor que um quarto da amplitude das ondas R (TILLEY, 1992). No ECG realizado nos animais envenenados por *H.*

*lunatus*, foi detectada a presença de ondas T aumentadas, sugerindo a existência de desequilíbrio eletrolítico causado pela ação do veneno. Além disso, foi identificada a presença de onda rS, o que pode indicar uma sobrecarga do ventrículo direito em razão da hemorragia pulmonar encontrada nas análises histopatológicas. Estes resultados também foram encontrados em ECG de ratos envenenados por *T. fasciolatus* (PINTO, 2010).

Após a constatação de que o veneno causava alterações cardíacas, resolveu-se avaliar se o mesmo era capaz de alterar a dinâmica do  $\text{Ca}^{+2}$  em cardiomiócitos isolados de camundongos.

A cada batimento cardíaco ocorre um aumento tempo-dependente da concentração de  $\text{Ca}^{+2}$ , o que resulta na ativação da contração desse músculo. O transiente de cálcio é composto pelo influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  e pela liberação desse íon e é ativado pelo potencial de ação cardíaco (GUATIMOSIM, 2002). No presente trabalho, a dinâmica do  $\text{Ca}^{2+}$  foi mensurada através de microscopia confocal, utilizando uma sonda fluorescente sensível ao cálcio. A relação entre a fluorescência máxima e a fluorescência basal, que indica a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático, mostrou-se diminuída nos cardiomiócitos que foram incubados com o veneno. Estes dados indicam que o veneno altera a homeostase do coração e possivelmente diminui a força de contração das células cardíacas.

Já foi observado que componentes de venenos escorpionicos podem interferir na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. Uma proteína isolada do escorpião *Pandinus imperator* foi capaz de inibir a liberação de cálcio através do bloqueio de canais/receptores de rianodina (RYR). Essa molécula apresenta aproximadamente 15 kDa e foi denominada "Imperatoxin I" (IpTxi). A IpTxi induz um bloqueio rápido e reversível nos canais RYR do músculo esquelético e cardíaco e, quando injetada em células ventriculares, levou a diminuição da amplitude da contração e do transiente de cálcio intracelular, indicando um bloqueio da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (VALVÍDIA *et al.*, 1992). Foi verificado que a IpTxi apresenta atividade fosfolipásica, e a utilização de um inibidor específico de PLA2 diminuiu, de forma significativa, a sua capacidade de inibição de RYR. Este fato sugere que, mais do que a ação direta da IpTxi no canal, um produto lipídico

resultante da atividade fosfolipásica está envolvido na inibição de RYR (ZAMUDIO *et al.*, 1997).

Canais para cálcio também estão envolvidos na via do impulso elétrico que parte do nó sinoatrial e se propaga pelo do átrio, através de fibras cardíacas lentas (TILLEY, 1992). As alterações no transiente de cálcio indica o envolvimento deste íon durante o envenenamento escorpiónico, pode explicar o intervalo PR prolongado observado no grupo tratado.

Tendo em vista os resultados do ECG e do transiente de cálcio, pode-se concluir que o veneno de *H. lunatus*, assim como outros venenos escorpiónicos, é deletério para o coração.

Para concluir, a Figura 37 resume os achados sobre a patofisiologia do envenenamento causado por *H. lunatus* obtidos neste trabalho.

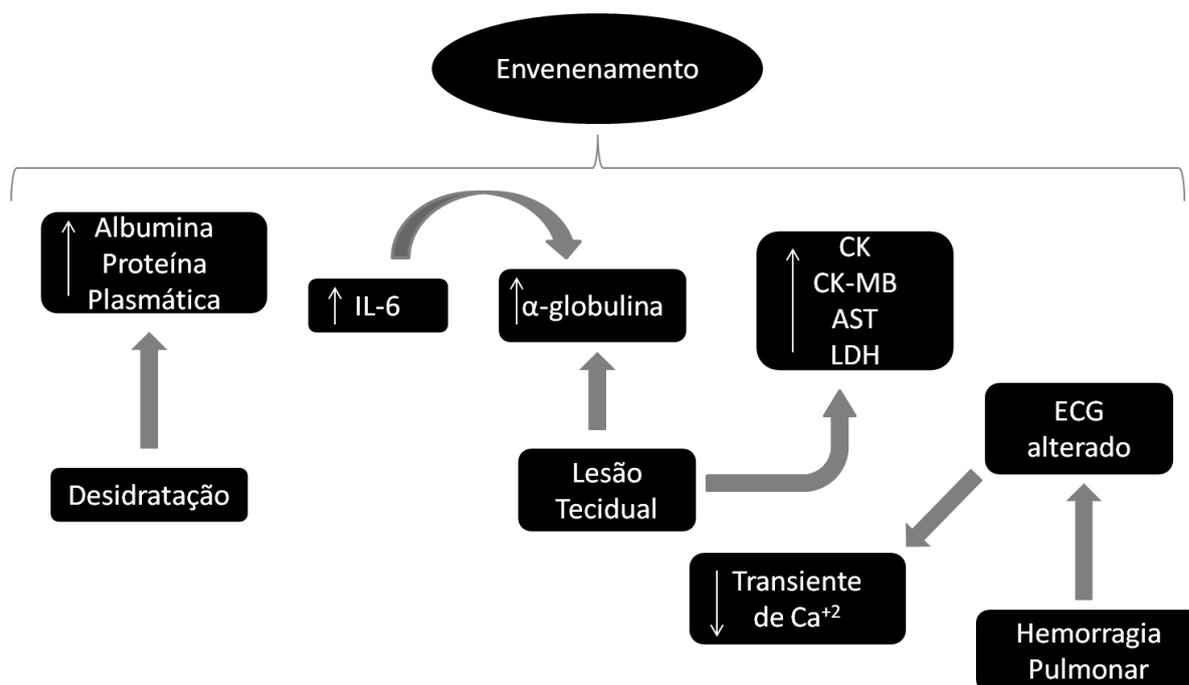


Figura 37- Resumo dos efeitos do envenenamento causado por *H. lunatus*.

## 6. CONCLUSÕES

- O veneno do escorpião *H. lunatus* apresenta toxicidade para mamíferos, porém necessita de altas doses para causar letalidade;
- O veneno apresenta as atividades hialuronidásica, proteolítica e fosfolipásica;
- Uma das frações purificadas do veneno apresenta atividade fosfolipásica e análises mostraram que os componentes dessa fração possuem massa molecular de aproximadamente 11.900 e 13.650 Da, o que está de acordo com algumas massas descritas na literatura para fosfolipases.
- Anticorpos produzidos contra o veneno de *H. lunatus* apresentaram reatividade cruzada considerável com venenos dos escorpiões *C. sculpturatus* e *T. serrulatus*, e em menor grau com o veneno de *Androctonus australis*, indicando que estes venenos apresentam moléculas similares.
- O envenenamento por *H. lunatus* causou aumento significativo tanto na concentração de albumina quanto na de proteína plasmática total, indicando um quadro de desidratação dos animais envenenados.
- O veneno de *H. lunatus* também causou aumento da fração de alfa-globulina, o que pode estar relacionado com lesão tecidual intensa.
- Análises bioquímicas revelaram níveis elevados de CK, LDH e AST indicando a existência de lesão muscular causada pela ação do veneno. Também foi observado o aumento da atividade da isoenzima CK-MB sugerindo danos no músculo cardíaco.
- Foi identificada hemorragia intensa e difusa nos pulmões dos animais tratados, confirmando a existência de lesão pulmonar ocasionada pelo envenenamento.
- Camundongos envenenados com *H. lunatus* apresentaram aumento na produção de IL-6, citocina envolvida na indução da produção de proteínas de fase aguda.
- O veneno de *H. lunatus* foi capaz de causar alterações cardíacas, corroborando com o que é esperado para venenos escorpiônicos.

Parte deste trabalho resultou na publicação do artigo intitulado “General biochemical and immunological characteristics of the venom from Peruvian scorpion *Hadruroides lunatus*”, que se encontra em anexo.

## 7. PERSPECTIVAS

- Purificar e caracterizar as enzimas identificadas no presente trabalho;
- Avaliar outras possíveis atividades biológicas do veneno de *H. lunatus*, como inseticida e anti-tumoral;
- Purificar toxinas presentes no veneno de *H. lunatus* e analisar como elas afetam os canais iônicos;
- Estudar mais profundamente a resposta imunológica causada pelo veneno de *H. lunatus*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADI-BESSALEM, S.; Hammoudi-Triki, D.; Laraba-Djebari, F. Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. **Toxicologic Pathology**, v. 60, p. 373-380, 2008.
- ADI-BESSALEM, S.; Mendil, A.; Hammoudi-Triki, D. Lung Immunoreactivity and Airway Inflammation: Their Assessment After Scorpion Envenomation. **Inflammation** 35(2):501-8. 2012.
- AGUILAR, P. Nota sobre los escorpiones de Lima. **Anales Científicos Universidad Nacional Agraria La Molina** VI (3): 165-172. 1968.
- ALMEIDA, F. M.; Pimenta, A. M. C.; Figueiredo, S. G. De; Santoro, M. M.; Martin-Eauclaire, M. F. Diniz, C. R.; Lima, M. E. De. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. **Toxicon**, v. 40, p. 1041-1045, 2002.
- ANDRADE, M. V.; Caraméz, M.P.R.; Abreu, E.M.N.N.; Dolnikoff, M.; Omar, E.D.; Velasco, I.T.; Cunha-Melo, J.R. Lung compliance, plasma electrolyte levels and acid – base balance are affected by scorpion envenomation in anesthetized rats under mechanical ventilation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 138, 97–104. 2004.
- BAHLOUL, M.; Chaari, A.; Dammak, H.; Samet, M.; Chtara, K.; *et al.* Pulmonary edema following scorpion envenomation: mechanisms, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **International journal of cardiology**, 162(2):86-91. 2011.
- BARBARO, K. C., Knysak I., *et al.* Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon** 45(4): 489-99. 2005.
- BARNES, R.D. Zoologia dos invertebrados. 7ª edição: **Ed. Roca**. 1168 p. 2002.
- BAWASKAR, H. S. Efficacy and safety of scorpion antivenom plus prazosin trial. **BMJ** p. 1-8. 2010.
- BAWASKAR, H.S., BAWASKAR, P.H. Scorpion sting: update. **J. Assoc. Physicians India**. 60:46-55. 2012.
- BORCHANI, L.; Sassi, A.; *et al.* Heminecrosis, the first hemolytic dermonecrotic toxin purified from scorpion venom. **Toxicon** 58 (1):130-9. 2011.
- BOSMANS, F.; Martin-Eauclaire, M.; Tytgat, J. Differential effects of five “ classical ” scorpion  $\beta$ -toxins on rNav1.2a and DmNav1 provide clues on species-selectivity. **Toxicology and Applied Pharmacology** 218(1):45-51, 2007.
- BRAZIL, T.K., Porto, T.J. Quem são os escorpiões? In: BRAZIL, T.K., Porto, T.J. **Os escorpiões**. Bahia. Editora da Universidade Federal da Bahia. Cap 1, p 15-28. 2010.
- CÁCERES C., I.E., Aguilar, P.G., Meneses G., O. Escorpiones y escorpionismo en el Perú.— II. Efectos del veneno del "escorpión de los pedregales" en la Costa Central. **Revista Peruana de Entomología**. 15 (1) : 38-43. 1972.

- CANDIDO, D.M.; Lucas, S.M.; Souza, C.A.R.; Diaz, D.; Lira-da-Silva, R.M. Uma nova espécie de *Tityus* c. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do estado da bahia, brasil **Biota Neotropica**. 2005.
- CATTERALL, W.A., Cestele S, Yarov-Yarovoy V., YU F.H., Konoki K., Scheuer T. Voltage gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon** 49:124-141. 2007.
- CEKALOVIC, K.T. Contribución al conocimiento de los escorpiones chilenos. **Museo Nacional de Historia Natural Noticiario Mensual** (Santiago) 10 (118): 1–8. 1966.
- CEKALOVIC, K.T. Catálogo de los escorpiones de Chile (Chelicerata, Scorpiones). **Boletín de la Sociedad Biológica de Concepción** 54: 43–70. 1983.
- CESTÈLE, S., Catterall, W.A. Toxins targeting mammalian sodium channels: Tools for molecular and models for therapeutic and biotechnological applications. Em: Lima, M.E., Pimenta A.M., Martin-Euclaire M.F., Zingali, R.B., Rochat, H. **Animals Toxins: State of the art. Perspectives in health and biotechnology**. Belo Horizonte. Ed. Ufmg. 2009. 99-121.
- CEVALLOS, M.A., Navarro-Duque, C., et al. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Toxicon** 30(8): 925-30. 1992.
- CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; Fonseca, S.C., Campolina, D., Amaral, C.F.; Diniz, C.R. ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon** 32(12):1649-56, 1994.
- CHIPPAUX JP; GOYFFON M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon** 36:823-846. 1998.
- CHIPPAUX, J.-P. Emerging options for the management of scorpion stings. **Drug design, development and therapy**, 6:165-73. 2012.
- CIVALLERI, D., Espositi, M., et al. Effects of adjuvant hyaluronidase in tumors refractory to chemotherapy. Review of the literature and pharmacokinetics of cisplatin after regional administration in animals and humans. **G. Chir.** 18 (4), 175–181. 1997.
- COHEN, L., Karbat, I.; *et al.* Common features in the functional surface of scorpion beta toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. **J Biol Chem** 280(6):5045-53. 2005.
- COLOGNA, C. T.; Marcussi, S.; *et al.* *Tityus serrulatus* Scorpion Venom and Toxins : An Overview. *Science*, p. 920-932, 2009.
- COOK, W. J., Zell A. et al. Structure of variant 2 scorpion toxin from *Centruroides sculpturatus* Ewing. **Protein Sci** 11(3): 479-86. 2002.
- CORREA, M.; Sampaio, S.V.; *et al.* Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. **Toxicon** 35(7): 1053-1067. 1997.
- CUPO, P.; HERING, S. E. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. **Toxicon** 40 p. 823-830. 2002.

- CUPO, P.; Azevedo-Marques, M.M.; Hering, S.E. Acidentes por animais peçonhentos: Escorpiões e Aranhas. **Simpósio: Urgências e Emergências Dermatológicas e Toxicológicas**. Ribeirão Preto. 2003. Capítulo V, 36: 490-497.
- CUPO, P.; Figueiredo, A.B.; *et al.* Acute left ventricular dysfunction of severe scorpion envenomation is related to myocardial perfusion disturbance. **International Journal of Cardiology**, v. 116, p. 98 - 106, 2007.
- CUPO, P.; Azevedo-Marques, M.M.; Hering, S.E. Escorpionismo. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad Jr, V. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia clínica e terapêutica dos acidentes**, 2ª edição. São Paulo. Sarvier, 2009. Capítulo 20, p 214-224.
- CUSINATO, D. A.; Sousa, A.M.; *et al.* Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon** 56(8):1477-1486. 2010.
- DALE DUBLIN, M.D., Interpretação rápida do ECG...um curso programado. Rio de Janeiro. Editora de Publicações Científicas, LTDA. 1980.
- DUTTO, M., Dutto, L., Bertero, M., Goyffon, M. Stings from *Euscorpis flavicaudis* (De Geer, 1778) (Scorpiones, Euscorpiidae) during pregnancy: a clinical case report. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. 2012.
- EL-ALFY ,A.T.; Ahmed, A.A.; Fatani, A.J.; Kader, F. Amelioration of the cardiovascular manifestations of the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus* envenomation in rats by red grape seeds proanthocyanidins. **Toxicon** 51(3):321-33. 2007.
- ESCOBAR, E., Rivera, C.; *et al.* Purificación parcial de las toxinas HI1, HI2 y HI3 del veneno del escorpión *Hadruroides lunatus* KOCH, 1867 (SCORPIONIDA: VEJOVIDAE).” **Revi. peru. biol.** 9 N° 1. 2002.
- ESCOBAR, E., Flores, L. Peptidos antibacterianos de los venenos de *Hadruroides mauryi* y *Centruroides margaritatus*. **Rev. peru. biol.** 15(1), 139-142. 2008.
- ESQUIVEL DE VERDE, M.A. Notas sobre Scorpionidae de Venezuela. Nuevos registros y comentarios sobre la distribución de algunos grupos en Venezuela. **Acta Biologica Venezuelica** 6 (2): 66–70. 1968.
- FAN, S.; Sun, Z.; *et al.* BmKCT toxin inhibits glioma proliferation and tumor metastasis. **Cancer Letters** 291(2):158-166. 2010.
- FAVREAU, P., Menin, L., Michalet, S., Perret, F., Cheneval, O., Stöcklin, M., Bulet, P., Stöcklin, R. Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: case applications with single arthropod specimen. **Toxicon** 47(6):676-87. 2006.
- FENG, L.; GAO, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Comparative Biochemistry and Physiology , Part C Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*. **Proteomics**, v. 148, p. 250-257. 2008.
- FERREIRA NETO, J.M.; Viana, E.; Magalhaes, L.M. **Patologia Clínica Veterinária**. 2ed. Belo Horizonte: Rabelo, 1982. 279p.

- FLECKNELL, P. Laboratory animal anaesthesia. **San Diego: Academic Press**, 1996. 269p.
- FINNEY D.J. Probit Analysis. **Cambridge University Press**. 1971.
- FRANCKE, O.F., Soleglad, M.E. The family Iuridae Thorell (Arachnida, Scorpiones). **Journal of Arachnology** 9: 233–258. 1981.
- FUKUHARA, Y. D.; Reis, M.L.; *et al.* Increased plasma levels of IL-1b , IL-6 , IL-8 , IL-10 and TNF-a in patients moderately or severely envenomed by Tityus serrulatus scorpion sting. **Toxicon** 41(1):49-55., 2003.
- GARCÍA-GÓMEZ, B. I.; Coronas, F.I.V. *et al.* Biochemical and molecular characterization of the venom from the Cuban scorpion Rhopalurus junceus. **Toxicon** 58(1):18-27.2011.
- GAZARIAN, K. G.; Gazarian, T.; *et al.* Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. **Vaccine** 23(26): 3357-68. 2005.
- GOKDEMIR, M.; SEZER, T. Evaluation of myocardial function using tissue Doppler imaging in children with moderate scorpion envenomation. **Clinical Toxicology** (Philadelphia, Pa.), 51(3):156-6. 2013.
- GORDON, D.; Martin-Euclaire, M.F.; *et al.* Scorpion Toxins Affecting Sodium Current Inactivation Bind to Distinct Homologous Receptor Sites on Rat Brain and Insect Sodium Channels. **Biochemistry** 271(14): 8034 -8045. 1996.
- GRANIER, C., Moreau, V., Chávez-Olórtegui, C., El Ayeb, M. Immunochemical Properties of scorpion alpha-toxins: Their use for diagnostic and therapy of scorpion drugs. Em: Lima, M.E., Pimenta A.M., Martin-Euclaire M.F., Zingali, R.B., Rochat, H. **Animals Toxins: State of the art. Perspectives in health and biotechnology**. Belo Horizonte. Ed. Ufmg. 2009. 123-136.
- GUATIMOSIM, S., Sobie E.A., *et al.* Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(2+) current. **Am J Physiol Cell Physiol**. v.280, n. 5, p. 1327-1339. 2001.
- GUATIMOSIM, S.; Dilly, K.; *et al.* Local Ca<sup>2+</sup> Signaling and EC Coupling in Heart: Ca<sup>2+</sup> Sparks and the Regulation of the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Transient. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 950, p. 941-950, 2002.
- GUTIERREZ, J.M., Avila, C., *et al.* An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon** 26, 411-413. 1988.
- HABERMANN, E., K. L. Hardt. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Anal Biochem** 50(1): 163-73. 1972.
- HAMED, M. I. Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12-years experience with serotherapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, p. 170-174, 2003.
- HUGGINS, K.W., Boileau A. C., Hui D. Y. Protection against diet-induced obesity and obesity-related insulin resistance in Group 1B PLA2-deficient mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol.Metab.**283, E994—E1001. 2002.
- IZQUIERDO, L. M.; RODRÍGUEZ BUITRAGO, J. R. Cardiovascular dysfunction and pulmonary edema secondary to severe envenoming by Tityus pachyurus sting. Case report. **Toxicon** 60(4): 603-6. 2012.

- JOVER E., Couraud, F., Rochat, H. Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. **Biochem Biophys Res Commun** 95(4):1607–14. 1980.
- KARSCH, F. Scorpionologische Beiträge. Part II. **Mitteilungen des Münchener Entomologischen Vereins** 3: 97–136. 1879.
- KINZELBACH, R. Scorpions from the Galapagos Islands. In Galapagos, Studi e Ricerche. Spedizione “L. Mares – G.R.S.T.S.”. **Firenze: Museo Zoologico dell’Universita` di Firenze**, 1–12. 1973.
- KREIL, G. Hyaluronidases- a group of neglected enzymes. **Protein Sci.** 4 (9): 1666-9. 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-5. 1970.
- LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. **Trends Pharmacol Sci.** 20(4):162-70. 1999.
- LIN, Y., Means, G.E., Feeney, R.E. The action of proteolytic enzymes on N,N-dimethyl proteins. **J. Biol. Chem.** 244, 789-793. 1969.
- LOURENÇO W.R., CUELLAR O. Scorpions, scorpionism, life history strategies and parthenogenesis. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 1995.
- LOURENÇO, W.R., EICKSTEDT, V. R .Escorpiões de Impotância Médica. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad Jr, V. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia clínica e terapêutica dos acidentes**, 2ª edição. São Paulo. Sarvier, 2009. Cap 19, p 198-213.
- LOWRY, O.H., Rosebrough, N.J. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 193(1): 265-75. 1951.
- LUTZ, A., MELLO, O. Descrição de 5 espécies brasileiras dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. **Folha Médica** 4:25-26. 1922.
- MA, Y., Zhao, Y., et al. Molecular diversity of toxic components from the scorpion *Heterometrus petersii* venom revealed by proteomic and transcriptome analysis. **Proteomics**, 2471-2485. 2010.
- MAMELAK, A.N., Rosenfeld, S., et al. Phase I single-dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma. **Journal of clinical oncology** 24:3644-50. 2006.
- MARTIN-EUCLAIRE, M.F., Bougis, P.B. “Kaliotoxin”: A high affinity blocker of the voltage-activated potassium channel Kv1.3. Em: Lima, M.E., Pimenta A.M., Martin-Euclaire M.F., Zingali, R.B., Rochat, H. **Animals Toxins: State of the art. Perspectives in health and biotechnology**. Belo Horizonte. Ed. Ufmg. 2009. 179-192.
- MARTIN-EAUCLAIRE, M.-F., Granjeaud, S., Belghazi, M., Bougis, P.E., Achieving automated scorpion venom mass fingerprinting (VMF) in the nanogram range, **Toxicon**. 2013.
- MAURY, E.A. Escorpiones y escorpionismo en el Perú IV: Revisión del género *Hadruroides* Pocock, 1893 (Scorpiones, Vejovidae). **Revista Peruana de Entomología** 17 (1): 9–21. 1974.

- MELLO-LEITÃO, C. de. Escorpiões sul-americanos. **Arquivos do Museu Nacional Rio de Janeiro** 40: 7–468. 1945.
- MINISTERIO DE SALUD. Lima reporto 41 casos de personas picadas por alacranes el 2009. Disponível em: [http://www.minsa.gob.pe/portada/prensa/notas\\_auxiliar.asp?nota=8450](http://www.minsa.gob.pe/portada/prensa/notas_auxiliar.asp?nota=8450) Acesso: 11/03/2013
- MITRA, R., Morad, M. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. **American Journal of Physiology** v. 249, n.5, p.H1056-1060, 1985.
- MOREY, S. S.; KIRAN, K. M.; GADAG, J. R. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. **Toxicon**. 47(2):188-95. 2006.
- MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A2. **J Biochem** 131(3):285-92. 2002.
- MURAKAMI, M. & Udo, I. K. Secretory Phospholipase A2. **Biol Pharm Bull** 27(8), 1158-1164. 2004.
- NISHIKAWA, A.K., Caricati C.P., et al. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. **Toxicon**. 32(8):989-98. 1994.
- OCHOA, A. Patrones de distribución de escorpiones de la región andina en el sur peruano. **Rev. peru. biol.** 12(1): 49-68. 2005
- OCHOA, J.A., Prendini, L. The Genus *Hadruidoidea* Pocock, 1893 (Scorpiones: Luridae), in Peru: New Records and Descriptions of Six New Species. **American Museum Novitates** 3687: 1-56. 2010.
- Ondas de um ECG normal. Disponível em: <http://fisiologiaessencial.blogspot.com.br/2010/02/ondas-do-ecg-normal-e-seus-significados.html>. Acesso: 10/04/2013
- PANEQUE-PERES, A. C. *et al.* Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. **Toxicon**, v. 53, p. 779-785. 2009.
- PESSINI, A. C. *et al.* Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. **International immunopharmacology** 3(5):765-74. 2003.
- PESSINI, A. C. .; TAKAO, T.T.; CAVALHEIRO, E.C.; VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; ARANTES, E. C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon** 39(10):1495-504. 2001.
- PESSINI, C.; SOUZA, A. M. DE; GREGO, Z. M. O. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 765 - 774. 2003.
- PETRICEVICH, V. L. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. **Mediators of Inflammation** 11(1):23-31. 2002.
- PETRICEVICH, V. L. Scorpion Venom and the Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation** 2010:903295. 2010.

- PINTO, M.C.L. *Tityus fasciolatus* e *Tityus serrulatus*: caracterização eletrocardiográfica e laboratorial do envenenamento em ratos. 05 de fevereiro de 2009. 54 páginas. **Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2009.
- PINTO, M. C. L. et al. *Tityus fasciolatus* envenomation induced cardio-respiratory alterations in rats. **Toxicon**, v. 55, p. 1132-1137. 2010.
- PLESSIS, L. H.; ELGAR, D.; PLESSIS, J. L. Southern African scorpion toxins : An overview. **Toxicon**, v. 51, p. 1-9, 2008.
- POCOCK, R.I. Some new or little-known Neotropical scorpions in the British Museum. **Annals and Magazine of Natural History** 5 (7): 469–478. 1900.
- POSSANI, L.D., Becerril, B., et al. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. **European journal of biochemistry** 264(2), 287-300. 1999.
- RAMANAIAH, M., Parthasarathy, P.R., Venkaiah, B. Isolation and characterisation of hyaluronidase from scorpion (*Heterometrus fulvipus*) venom. **Biochem. Int.** 20 (2), 301– 310. 1990.
- RATES, B., Ferraz, K. K. F., Borges, M. H., Richardson, M., De Lima, M. E., & Pimenta, A. M. C. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. **Toxicon** 52(5), 611-8. 2008.
- RATES, B., Verano-Braga T., et al. From de stretcher to the pharmacy's shelf: drug leads from medically important brazilian venomous arachnid species. **Inflamm Allergy Drug Targets** 10(5):411-9. 2011.
- RENNER, I.G., Pantoja, J.L., et al. Effects of sorpion and rattlesnake venoms on the canine pancreas following pancreaticoduodenal arterial injections. **Toxicon** 21 (3), 405-420. 1983.
- REZENDE, N.A., Chávez-olórtegui, C., Amaral, C.F.S. Is the severity of *Tityus serrulatus* scorpion envenoming related to plasma venom concentrations? **Toxicon**. 34, No. 7, pp. 820-823, 1996.
- RIBEIRO, E.L.; Melo, M.M.; Pinto, M.C.L.; Labrrère, C.R; Guimarães, P.T.C.; Paes, P.R.O.; Leme, F.O.P. Hemograma de caes submetidos ao envenenamento experimental por *Tityus serrulatus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.135-143, 2009.
- ROBERTS, M.F., Wink, M. Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications. **New York and London: Plenum Press**; 486 p. 1998.
- RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R.C., Schwartz, E.F., & Possani, L. D. Mining on scorpion venom biodiversity. **Toxicon** 56(7), 1155-61. 2009.
- SANCHEZ, E.F., Santos, C.I., et al. Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** 378, 131-141. 2000.
- SCHWARTZ, E. F.; Camargos, T.S.; et al. Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. **Toxicon** 51(8):1499-508. 2008.
- SCHWEITZ, H. Lethal potency in mice of toxins from scorpion, sea anemone, snake and bee venoms following intraperitoneal and intracisternal injection. **Toxicon** 22(2):308–311. 1984.

- SEYEDIAN, R.; Pipelzadeh, M.H.; *et al.* Enzymatic analysis of Hemiscorpius lepturus scorpion venom using zymography and venom-specific antivenin. **Toxicon** 56(4):521-525. 2010.
- SISSOM, W.D., V. Fet. Family Iuridae Thorell, 1876. In V. Fet, W.D. Sissom, G. Lowe, and M.E. Braunwalder, **Catalog of the Scorpions of the World (1758–1998)**. New York New York Entomological Society. 409–420. 2000.
- SOSA, B.P., Alagon, A.C., *et al.* Comparison of phospholipase activity with direct and indirect lytic effects of animal venoms upon human red cells. **Comp Biochem Physiol B** 64(2): 231-4. 1979.
- SRINIVASAN, K. N.; Gopalakrishnakone, P.; *et al.* SCORPION , a molecular database of scorpion toxins. **Toxicon**, v. 40, p. 23-31. 2001.
- TEIXEIRA JR., A. L.; Fontoura, B.F.; *et al.* Evidence for a direct action of Tityus serrulatus scorpion venom on the cardiac muscle. **Toxicon** 39(5):703-9. 2001.
- TILLEY, L.P., 1992. Essentials of Canine and Feline Electrocardiography Interpretation and Treatment. Lea & Sebiger: Philadelphia. 3rd ed. 470p.
- VALDEZ-CRUZ, N. A.; Batista, C.V.F.; *et al.* Phaiodotoxin , a novel structural class of insect-toxin isolated from the venom of the Mexican scorpion Anuroctonus phaiodactylus. **Eur J Biochem**. 271(23-24):4753-61. 2004.
- VALDEZ-CRUZ, N. A.; Segovia, L.; *et al.* Sequence analysis and phylogenetic relationship of genes encoding heterodimeric phospholipases A2 from the venom of the scorpion Anuroctonus phaiodactylus. **Gene**. 396(1):149-58. 2007.
- VALDIVIA, H. H., Kirby, M. S., Lederer, W. J., and Coronado, R. **Proc. Natl. Acad. Sci.** U. S. A. 89, 12185–12189. 1992
- VELÁSQUEZ, L., Escobar, E. Purificación y caracterización parcial de una toxina (Hm3) del veneno de Hadruidoidea mauryi (Francke y Soleglad , 1980) (Scorpiones , Iuridae) **Revista peruana de biología**. 11 (2): 153-160. 2004
- VENANCIO, E. J.; Portaro, F.C.; *et al.* Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of Tityus genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. **Toxicon**, pii: S0041-0101(13)00082-2. 2013.
- VERANO-BRAGA, T., Rocha-Resende, C., *et al.* Tityus serrulatus Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. **Biochemical and biophysical research communications**, 371(3), 515-20. 2008.
- WITTCOFF, H. The phosphatides. **Ed. Reinhold Publishing Corporation** (New York), p. 99-115; 1951.
- ZAMUDIO, F.Z., Conde, R., *et al.*, The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. **J. Biol. Chem**. 272, 11886–11894. 1997.
- ZAVALETA, A., NAVARRO J., *et al.* Pharmacological effects of a Peruvian scorpion (*Hadruidoidea lunatus*) venom. **Toxicon** 19(6): 906-9. 1981.

## 9. ANEXO