

**DAYANA SAMPAIO CARDOSO**

**MARCAÇÃO DE ANTIVENENO ESCORPIÔNICO  
COM TECNÉCIO-99m E A SUA  
BIODISTRIBUIÇÃO EM RATOS DE 21-22 DIAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
BELO HORIZONTE  
2007**

**DAYANA SAMPAIO CARDOSO**

**MARCAÇÃO DE ANTIVENENO ESCORPIÔNICO COM  
TECNÉCIO-99m E A SUA BIODISTRIBUIÇÃO EM RATOS DE  
21-22 DIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Elzília de Aguiar Nunan

Belo Horizonte  
Faculdade de Farmácia da UFMG  
2007

C268m Cardoso, Dayana Sampaio.  
Marcação de antiveneno escorpiónico com tecnécio-99m e sua biodistribuição em ratos de 21-22 dias / Dayana Sampaio Cardoso. – 2007.  
113 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Elzília de Aguiar Nunan.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia.

1. Escorpiões – Veneno – Teses. 2. Imunoterapia – Teses. 3. Radioisótopos – Teses. 4. Tityus serrulatus – Teses. 5. Toxicologia.  
I. Título. II. Nunan, Elzília de Aguiar. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD: 615.942

## DEDICATÓRIA

À minha Vó Aurita e a minha mãe Darinalva,  
pelos exemplos de luta, coragem e bondade  
que servem de inspiração da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS.

À Prof. Dra. Elzília de Aguiar Nunan pela orientação, amizade, otimismo, paciência, dedicação e confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso, pela colaboração, disponibilização do laboratório e pelas sugestões valiosas.

Ao Prof. Tasso Moraes Santos pela colaboração e otimismo durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo pela colaboração e apoio na realização do trabalho.

À Farmacêutica Raquel Joane Rodrigues, chefe da Divisão de Produção de Imunobiológicos da Fundação Ezequiel Dias (Funed) pela colaboração sempre disponível, disponibilização do soro antiescorpiônico e confiança no trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica Elton Mendonça pela colaboração e à Marina Bicalho Silveira pela inestimável ajuda nos trabalhos experimentais, compartilhando horas de trabalho, principalmente nos finais de semana e feriados.

À Prof. Dra. Lígia, a Prof. Dra. Cristina Viana e a todos os amigos do Laboratório de Controle de Qualidade, Fernando, Zé Antônio, Gisele, Isabela, Paula, Janaína, Manoela, Luciano, Lúcia, Mírian, Renan, Priscila, Bruno.

À Profa. Simone Odília Diniz, a Profa. Vildete e aos colegas de mestrado Luciene, Daniele, Maira, Paulo, Iara e Telma e à técnica Mariza do Laboratório de Radioisótopos pela grande colaboração e pelas agradáveis horas de trabalho compartilhadas.

À Célia de Fátima Barbosa da Funed e aos técnicos do Controle de Qualidade Biológico da Funed pela ajuda inestimável na realização do Teste de Potência.

À amiga Wany Maria Selena, pela amizade, confiança e por ter me incentivado a estudar sobre Imunobiológicos e a todos funcionários da Produção de Imunobiológicos da Funed pela amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtegui pelo fornecimento da fração imunoglobulínica purificada.

A Dr. Karla Lima pela realização das eletroforeses.

À técnica Maria das Graças do Laboratório de Nutrição Experimental e à aluna de Iniciação Científica Melina do Laboratório de Imunologia Clínica pela colaboração nos experimentos.

À Veterinária Adelaide e ao funcionário Batista do Biotério da Faculdade de Farmácia pela valiosa colaboração.

À funcionária Rosi do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por sempre estar disponível para informações.

À FAPEMIG/Ministério da Saúde/Secretaria da Saúde de Minas Gerais pelo apoio financeiro.

Ao Dr. Délio Campolina, chefe do Serviço de Toxicologia do Hospital de Pronto-Socorro João XXIII, pelas valiosas informações prestadas.

Ao Fred, pelo amor, dedicação, carinho, que sempre esteve disponível nas horas que mais precisei durante a realização deste trabalho.

À Dona Matilde por ter me acolhido como filha durante esta caminhada.

Ao meu pai Derneval pelo otimismo, dedicação e incentivo e minhas irmãs Dardânia e Riana Maria pelo carinho e admiração.

À minha Tia Mainã e aos meus tios Jeová e Aimã pelo carinho, apoio, por terem me incentivado e ensinado a busca pelo conhecimento e pela confiança em mim depositada.

Ao meu primo Kinulpe pelo carinho e informações prestadas.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática dos sistemas cromatográficos utilizados para verificação do rendimento de marcação do soro antiescorpiônico (F(ab') <sub>2</sub> ) com <sup>99m</sup> Tecnécio.....	53
<b>Figura 2</b> – Representação esquemática da cromatografia de imunoafinidade com veneno escorpiônico total imobilizado.....	58
<b>Figura 3</b> - Perfil cromatográfico da <sup>99m</sup> Tc-F(ab') <sub>2</sub> em cromatografia ascendente antes e após filtração.....	65
<b>Figura 4</b> - Perfil cromatográfico da <sup>99m</sup> Tc-F(ab') <sub>2</sub> em cromatografia descendente antes e após filtração.....	66
<b>Figura 5</b> – Rendimento de marcação do soro antiescorpiônico com <sup>99m</sup> Tc antes e após filtração.....	68
<b>Figura 6</b> – Perfil do soro antiescorpiônico marcado com <sup>99m</sup> Tc e não marcado em coluna de imunoafinidade.....	71
<b>Figura 7</b> – Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras de soro antiescorpiônico e frações.....	73
<b>Figura 8</b> – Captação de <sup>99m</sup> Tc-F(ab') <sub>2</sub> específica ao antígeno (% dose/g de órgão) em ratos de 21-22 dias após injeção intravenosa.....	76



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Influência da massa de proteína do soro antiescorpiônico sobre o rendimento de marcação com $^{99m}\text{Tc}$ .....	62
<b>Tabela 2</b> – Influência da massa de borohidreto de sódio sobre o rendimento de marcação do soro antiescorpiônico com $^{99m}\text{Tc}$ .....	63
<b>Tabela 3</b> – Influência da massa de cloreto estano sobre o rendimento de marcação do soro antiescorpiônico com $^{99m}\text{Tc}$ .....	63
<b>Tabela 4</b> – Estabilidade do soro antiescorpiônico após marcação com $^{99m}\text{Tc}$ .....	69
<b>Tabela 5</b> – Biodistribuição de $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$ específica ao antígeno.....	74
<b>Tabela 6</b> – Valores de área sob a curva da radioatividade tecidual e sanguínea de 0 - 24 h (AUC <sub>0 - 24 h</sub> ) após injeção intravenosa da $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$ específica.....	77
<b>Tabela 7</b> – Coeficientes de partição tecido-sangue (Kp) para órgãos de ratos 21-22 dias após injeção intravenosa de $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$ específica.....	78
<b>Tabela 8</b> – Valores de $t_{\text{máx}}$ para órgãos de ratos de 21-22 dias após biodistribuição de $^{99m}\text{Tc-TsTX}$ e $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$ antiescorpiônica específica.....	85
<b>Tabela 9</b> – Valores de Kp para órgãos de ratos de 21-22 dias após biodistribuição de $^{99m}\text{Tc-TsTX}$ e $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$ antiescorpiônica específica.....	86

## **LISTA DE ANEXOS**

**ANEXO A** – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal

**ANEXO B** - Cálculos e parâmetros estatísticos para o teste de potência do soro antiescorpiônico não marcado com  $^{99m}\text{Tc}$

**ANEXO C** - Cálculos e parâmetros estatísticos para o teste de potência do soro antiescorpiônico marcado com  $^{99m}\text{Tc}$

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>A<sub>280</sub></b>	absorvância a 280 nanômetros
<b>AUC</b>	área sob a curva
<b>AUC<sub>0-24 h</sub></b>	área sob a curva de 0 a 24 horas
<b>C<sub>máx</sub></b>	concentração máxima
<b>cpm</b>	contagens por minuto
<b>DE<sub>50</sub></b>	dose efetiva 50%
<b>DL<sub>50</sub></b>	dose letal 50%
<b>DP</b>	desvio padrão
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiaminotetracético
<b>ELISA</b>	“enzyme linked immunosorbent assay”
<b>Fab</b>	“fragment antigen binding”
<b>IgG</b>	imunoglobulina G
<b>IM</b>	intramuscular
<b>IP</b>	intraperitoneal
<b>IV</b>	intravenosa
<b>K</b>	constante de velocidade
<b>KDa</b>	kilodáltons
<b>Kp</b>	coeficiente de partição tecido-sangue
<b>KeV</b>	kilo-elétron-volt
<b>M</b>	concentração molar
<b>MM</b>	massa molar
<b>MBq</b>	megabequerel
<b>n</b>	número de determinações
<b>Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	pertecnetato de sódio
<b>p/v</b>	peso por volume
<b>SC</b>	subcutânea
<b>SNC</b>	sistema nervoso central

$^{99m}\text{Tc}$	tecnécio – 99 meta estável
$^{99m}\text{TcO}_2$	dióxido de tecnécio (tecnécio reduzido)
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	pertecnetano
<b>TsTX</b>	tityustoxina
$^{99m}\text{Tc-TsTX}$	tityustoxina marcada com tecnécio – 99m
$^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$	F(ab') <sub>2</sub> marcada com tecnécio – 99m
$t_{\text{máx}}$	tempo para se alcançar a concentração máxima
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>USP</b>	United States Pharmacopoeia
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>vs</b>	versus
$\chi^2$	qui-quadrado

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>26</b>
3.1 Escorpiões e seus venenos.....	26
3.2 Envenenamento escorpiônico e tratamento.....	29
3.3 Estudos de radiomarcção de venenos e anticorpos.....	38
3.4 Estudos farmacocinéticos e de biodistribuição de venenos e antivenenos escorpiônicos.....	41
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
4.1 Material.....	49
4.1.1 Animais.....	49
4.1.2 Veneno e Antiveneno para o <i>Tityus serrulatus</i> .....	49
4.1.3 Reagentes.....	50
4.1.4 Outros.....	50
4.1.5 Equipamentos.....	51
4.2 Métodos.....	51
4.2.1 Marcação do antiveneno escorpiônico com <sup>99m</sup> Tecnécio ( <sup>99m</sup> Tc).....	51
4.2.2 Determinação da eficiência de marcação com <sup>99m</sup> Tc do antiveneno escorpiônico.....	52
4.2.3 Purificação do antiveneno escorpiônico marcado com <sup>99m</sup> Tecnécio.....	54
4.2.4 Avaliação da estabilidade <i>in vitro</i> do antiveneno escorpiônico marcado com <sup>99m</sup> Tc.....	54

4.2.5 Verificação da manutenção da atividade <i>in vivo</i> do antiveneno escorpiano marcado com <sup>99m</sup> Tecnécio.....	55
4.2.6 Verificação da manutenção da imunorreatividade <i>in vitro</i> do antiveneno escorpiano marcado com <sup>99m</sup> Tecnécio.....	57
4.2.7 Eletroforeses.....	59
4.2.8 Biodistribuição das frações específicas do soro antiescorpiano marcado com <sup>99m</sup> Tecnécio em ratos de 21- 22 dias após administração intravenosa (IV)....	59
4.2.9 Análise estatística.....	61
5 RESULTADOS.....	62
5.1 Otimização das condições de marcação do antiveneno escorpiano com <sup>99m</sup> Tecnécio.....	62
5.2 Perfil cromatográfico de <sup>99m</sup> Tc-F(ab') <sub>2</sub> .....	64
5.3 Eficiência da filtração.....	67
5.4 Estabilidade <i>in vitro</i> do antiveneno escorpiano marcado com <sup>99m</sup> Tc.....	68
5.5 Manutenção da atividade <i>in vivo</i> do antiveneno escorpiano marcado com <sup>99m</sup> Tecnécio.....	69
5.6 Teste <i>in vitro</i> da imunorreatividade da <sup>99m</sup> Tc-F(ab') <sub>2</sub> .....	70
5.7 Eletroforeses.....	72
5.8 Biodistribuição das frações específicas do soro antiescorpiano marcado com <sup>99m</sup> Tecnécio em ratos de 21- 22 dias após administração intravenosa (IV)....	73
6 DISCUSSÃO.....	79
7 CONCLUSÕES.....	94
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

## RESUMO

A freqüência com que ocorrem acidentes por escorpiões em algumas regiões do Brasil constitui um problema de saúde pública, principalmente em Minas Gerais e São Paulo. A espécie *Tityus serrulatus*, o escorpião amarelo, é considerada a mais venenosa da América do Sul, devido à alta toxicidade do seu veneno, sendo acidentes com crianças os mais graves. A imunoterapia, considerada o único tratamento realmente específico para o envenenamento, tem sido vista por vários pesquisadores e estudiosos como indispensável, mas ineficiente para outros, principalmente em relação à prevenção e bloqueio das manifestações cardiovasculares induzidas pelo veneno, que acometem crianças. A tityustoxina, uma das proteínas mais tóxicas do veneno do escorpião *T. serrulatus*, se distribuiu diferentemente no organismo de ratos adultos (150-160 dias) e de ratos jovens (21-22 dias). Considerando-se a ausência de informações sobre a biodistribuição do antiveneno escorpiônico em animais jovens, efetuou-se a marcação do antiveneno produzido pela Fundação Ezequiel Dias (Funed) com  $^{99m}\text{Tc}$  e realizou-se estudos de biodistribuição do mesmo em ratos jovens (21-22 dias). A marcação foi feita empregando-se dois agentes redutores, o cloreto estânico e o borohidreto de sódio. A purificação do produto marcado foi feita por filtração usando membrana de éster de celulose. Foi obtido um rendimento de marcação com  $^{99m}\text{Tc}$  de  $98,32 \pm 0,69\%$ , após purificação. O rendimento de marcação permaneceu constante após incubação com PBS pH 7,4 a  $37^\circ\text{C}$  por até 24 h, indicando estabilidade do soro marcado por no mínimo 24 h. A manutenção da atividade do antiveneno após marcação com  $^{99m}\text{Tc}$  foi verificada *in vivo* e *in vitro*. *In vivo* a potência foi determinada e comparada com a do antiveneno não marcado. Não se observou diferença estatística significativa entre as potências do antiveneno não marcado (1,21 mg/mL) e marcado (1,12 mg/mL). *In vitro*, a manutenção da imunorreatividade de  $^{99m}\text{Tc}$ -F(ab')<sub>2</sub> foi verificada usando cromatografia de imunoafinidade, e esta apresentou ligação específica com o veneno. As condições de marcação não promoveram fragmentação do anticorpo como demonstrado por eletroforese SDS-PAGE. O processo de marcação foi eficiente e o antiveneno marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  pôde ser utilizado

com segurança nos estudos de biodistribuição. A captação do antiveneno escorpiônico marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  nos órgãos de ratos de 21-22 dias foi maior no rim, seguido do baço, fígado, coração, pulmão, tireóide e cérebro. Apesar de não esperado, observou-se captação da fração específica pelo cérebro. As  $\text{AUC}_{0-24\text{ h}}$  dos rins e sangue foram bem maiores e a do cérebro bem menor quando comparadas com as dos outros órgãos. O único órgão que apresentou valor de  $K_p$  maior que um foi o rim. Esses resultados indicam que o antiveneno permanece mais tempo no sangue e que sua eliminação deve ser via renal. Foram verificadas diferenças quando foram comparados os perfis de captação de  $\text{F(ab')}_2$  antiescorpiônica e da tityustoxina nos mesmos órgãos de animais jovens. A comparação dos valores de  $t_{\text{máx}}$  e  $K_p$  para  $\text{F(ab')}_2$  e para tityustoxina mostrou que a  $\text{F(ab')}_2$  antiescorpiônica se distribui mais lentamente para os órgãos. Após 24 horas de administração da fração específica, esta ainda está em fase de decaimento, em contraposição com o veneno que já foi quase completamente eliminado. Verificou-se que  $\text{F(ab')}_2$  se distribui do sangue para os órgãos alvos do envenenamento, inclusive o cérebro, porém em quantidades e tempos diferentes do veneno o que poderá comprometer a eficácia da neutralização dependendo da concentração da fração que se liga especificamente ao veneno e o tempo decorrido após a picada.



## ABSTRACT

The frequency that accidents with scorpions occur in some regions of Brazil constitutes a problem of public health, mainly in Minas Gerais and São Paulo. The species *Tityus serrulatus*, the yellow scorpion, is considered the most venomous of South America, due to high toxicity of its venom, showing serious damage in accidents with children. The immunotherapy, considered the only specific treatment for the envenomation, has been considered for some researchers as indispensable, but inefficient for others in relation to the prevention and blockade of venom-induced cardiovascular manifestations, mostly in children. Due to the tityustoxin, the highest venom toxic protein of *T. serrulatus*, shows different body distribution between adult rats (150-160 days-old) and young rats (21-22 days-old), and the absence of information about body distribution of the antivenom in young animals, the antivenom produced by Fundação Ezequiel Dias (Funed) was labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  to study of body distribution in young rats (21-22 days-old). The labeling was made using two reducing agents, the stannous chloride and sodium borohydride. The purification was made by filtration using cellulose ester membrane. A labeling yield of  $98.32 \pm 0.69\%$  was obtained after the purification. The labeling yield after incubation with PBS pH 7.4 at 37 °C remained constant showing that stability of  $^{99m}\text{Tc}$ -F(ab')<sub>2</sub> was preserved. The maintenance of the antivenom activity after labeling with  $^{99m}\text{Tc}$  was verified *in vivo* and *in vitro*. *In vivo*, the potency was determined and compared with unlabeled antivenom. It was not observed any statistical difference between potencies of unlabeled (1.21 mg/mL), and labeled (1.12 mg/mL) antivenom. *In vitro* the immunoreactivity of  $^{99m}\text{Tc}$ -F(ab')<sub>2</sub> was verified using affinity chromatograph.  $^{99m}\text{Tc}$ -F(ab')<sub>2</sub> presented specific bound with venom. The process of labeling did not cause protein fragmentation as demonstrated by SDS-PAGE electrophoresis. The labeling process was efficient and the technetium-99m labeled scorpion antivenom could be safely used for body distribution studies. The labeled scorpion antivenom in 21-22 days-old rats reached a maximum uptake in kidneys, followed by spleen, liver, heart, lung, thyroid and brain. The uptake of the specific fraction was unexpectedly observed in brain. AUC<sub>0-24 h</sub> were larger to kidneys and blood, and smaller to brain when compared

with other organs. Just kidneys showed value of  $K_p$  larger than one. These results indicated that the antivenom stays more time in blood and has a renal elimination. Differences were verified between profiles of uptake of  $F(ab')_2$  and of the tityustoxin in the same organs of young animals. The comparison of the  $t_{max}$  values and  $K_p$  for  $F(ab')_2$  and tityustoxin showed that  $F(ab')_2$  is distributed slower for the organs than the tityustoxin. The decline phase still is happening after 24 hours of specific fraction administration, differently of the venom that was almost completely eliminated. In conclusion,  $F(ab')_2$  was distributed from the blood to target organs of the envenomation, including the brain, however in different amounts and periods than the venom. It may compromise the antivenom effectiveness, depending on the concentration of the fraction that specifically binds to the venom and the time elapsed after the sting.

# 1 INTRODUÇÃO

Envenenamento escorpiônico é um problema de saúde pública e se constitui como uma ameaça real em muitas partes do mundo. Milhares de pessoas são picadas anualmente por escorpiões em várias áreas semi-áridas e áridas de países em desenvolvimento (AL-SADOON; JARRAR, 2003).

São relatados, no Brasil, casos de escorpionismo em quase todos os estados, principalmente em Minas Gerais e São Paulo, onde os escorpiões constituem problema de saúde pública. Os acidentes escorpiônicos em humanos podem variar amplamente quanto à gravidade. Há casos de morte e de seqüelas causadoras de incapacidade temporária para o trabalho e outras atividades habituais. Adultos são as vítimas mais freqüentes de ferroadas de escorpiões, mas a morbidade é maior entre as crianças e idosos (SOARES; AZEVEDO; MARIA, 2002; TORRES et al., 2002).

Em 2003, o Brasil teve 6752 casos de acidentes por escorpião com 19 óbitos (0,28% de letalidade). A região sudeste apresentou o segundo maior número de casos de acidentes (1869 casos), perdendo somente para o nordeste, apresentando porém a maior letalidade de todas as regiões (0,43%) correspondendo a 8 óbitos. Dos 19 óbitos ocorridos no Brasil em 2003, 17 foram de crianças na faixa etária entre 01-14 anos. Os 8 óbitos ocorridos na região sudeste corresponderam também à faixa etária 01-14 anos. Belo Horizonte teve 905 casos em 2003 com 3 óbitos (SINITOX, 2003).

O acidente escorpiônico constitui um sério problema de saúde pública no Município de Belo Horizonte como um todo que, no dizer de Bücherl (1969) foi construído em um solo “escorpionífero”. Além das características ambientais próprias que favorecem o aparecimento de escorpiões, a incidência de casos em áreas urbanas periféricas de baixos níveis sócio-econômicos e de saneamento é maior (SILVA, 1992; LOURENÇO; CUELLAR, 1995; SPIRANDELI-CRUZ et al., 1995).

Segundo Dr. Délio Campolina (chefe do Serviço de Toxicologia no Hospital de Pronto-Socorro (HPS) João XXIII), são em média três atendimentos por dia na Capital, ou aproximadamente 1,1 mil atendimentos por ano, números considerados muito altos pelo especialista (Hoje em Dia - 25/08/2005).

Entre os anos de 2002 a 2005, o Hospital de Pronto-Socorro (HPS) João XXIII atendeu 4560 casos de envenenamento escorpiônico com ocorrência de 11 óbitos. Dez óbitos com crianças na faixa etária de 2 a 7 anos. Só no ano de 2005, foram registrados 1275 casos com ocorrência de 3 óbitos (Serviço de Toxicologia do Hospital de Pronto-Socorro (HPS) João XXIII).

A espécie *Tityus serrulatus*, o escorpião amarelo, é considerada a mais venenosa da América do Sul, devido à alta toxicidade do seu veneno (TORRES et al., 2002). Na região de Belo Horizonte é a espécie mais comum e é citada como o escorpião que melhor se adapta à vida domiciliar urbana, invadindo e colonizando os ambientes modificados pelo homem (BÜCHERL, 1969; SPIRANDELI-CRUZ et al., 1995; LOURENÇO et al., 1996; VONEICKSTEDT et al., 1996).

De acordo com o manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos (FUNASA, 2001), os acidentes escorpiônicos podem ser inicialmente classificados, com base nas manifestações clínicas, como:

- a) Leves:** apresentam apenas dor no local da picada e, às vezes, parestesias.
- b) Moderados:** caracterizam-se por dor intensa no local da picada e manifestações sistêmicas do tipo sudorese discreta, náuseas, vômitos ocasionais, taquicardia, taquipnéia e hipertensão leve.
- c) Graves:** além dos sinais e sintomas já mencionados, apresentam uma ou mais manifestações como sudorese profusa, vômitos incoercíveis, salivação excessiva, alternância de agitação com prostração, bradicardia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar, choque, convulsões e coma.

A toxicidade maior do veneno, observada em crianças foi atribuída a um efeito peso-dependente, ou seja, na criança picada, cuja massa corporal é menor que a do adulto, a concentração do veneno no sangue circulante seria maior (MAGALHÃES, 1938; REZENDE; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI; AMARAL, 1996; REZENDE; AMARAL; FREIRE-MAIA, 1998).

Contudo, além da concentração, outros fatores podem influenciar e modular de maneira diferente o envenenamento em adultos e crianças. Entre estes, os ligados ao processo de maturação do organismo, que devem ser vistos com especial interesse. Sabe-se que a criança não pode ser vista como um indivíduo em miniatura, ao contrário é um ser que desenvolve progressivamente seu organismo e suas funções a fim de alcançar o estado adulto (NUNAN, 2001).

Nesse sentido trabalhos publicados recentemente sobre a toxicidade, a farmacocinética e a biodistribuição da tityustoxina, fração mais tóxica do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* quando injetada por via periférica (KALAPOTHAKIS; CHÁVEZ-OLORTEGUI, 1997), revelaram diferenças em função da idade de ratos utilizados.

Em trabalho de Nunan, Cardoso e Moraes-Santos (2001) utilizando ratos adultos e desmamados, os valores de DL<sub>50</sub> para o veneno do *Tityus serrulatus* variaram em função do processo de maturação do organismo, verificando-se que o efeito peso-dependente não explica a letalidade maior do veneno para ratos desmamados, fato também reportado por Clot-Faybesse et al. (2000) para camundongos utilizando a toxina do veneno do escorpião *Androctonus australis hector*.

Foram observadas diferenças significativas em relação aos parâmetros farmacocinéticos da tityustoxina entre os ratos adultos e desmamados. Nos ratos mais jovens a toxina se distribuiu mais rapidamente para os tecidos (NUNAN et al., 2004).

Em estudos de biodistribuição foi verificado, entre outros aspectos, a presença de pequenas quantidades de toxina marcada no cérebro de ratos de 21-22 dias, o que não

ocorreu nos ratos adultos. Neste caso é plausível pensar que a toxina atravessaria a barreira hematoencefálica podendo desencadear os efeitos cardioencefálicos característicos de envenenamentos mais graves, predominantemente em crianças (NUNAN et al., 2003).

O tratamento do envenenamento escorpiónico consiste na adoção de três tipos de procedimentos: tratamento sintomático, manutenção das funções vitais e soroterapia específica (CAMPOS et al., 1980, AMITAI et al., 1985, FREIRE-MAIA; CAMPOS, 1987, 1989, FREIRE-MAIA; CAMPOS; AMARAL, 1994, BUCARETCHI et al., 1995, AMARAL; REZENDE, 2000).

No caso de crianças picadas, estas devem permanecer em observação em ambiente hospitalar e em casos graves devem ser transferidas para UTI (AMITAI et al., 1985, SOFER; GUERON, 1988).

O tratamento sintomático do envenenamento prevê, entre outros, o uso de vasodilatadores, como hidralazina, prazosina, nifedipina e captopril; anticolinérgicos (atropina); anticonvulsivantes como barbituratos e diazepam; antieméticos (metoclopramida); antipiréticos, analgésicos, anestésicos locais e insulina (BAWASKAR, H.; BAWASKAR, P., 1989; ISMAIL et al., 1992; GUIEU; KOPEYAN; ROCHAT, 1993; ISMAIL, 1995; MURTHY, 2002; MURTHY et al., 2003).

A imunoterapia, considerada o único tratamento realmente específico para o envenenamento, tem sido vista indispensável por alguns pesquisadores e estudiosos (CAMPOS et al., 1980; AMITAI et al., 1985; FREIRE-MAIA; CAMPOS, 1987, 1989; REZENDE et al., 1995; REZENDE; AMARAL; FREIRE-MAIA, 1998; REVELO et al., 1996; KRIFI et al., 1999, 2005; AMARAL; REZENDE, 2000; GHALIM et al., 2000) mas como ineficiente por outros, principalmente quanto à prevenção e bloqueio das manifestações cardiovasculares induzidas pelos venenos escorpiónicos que acometem principalmente crianças (GUERON; OVSYSHCHER, 1987; ISMAIL; ABD-ELSALAM,

1988; GUERON et al., 1992; SOFER; SHAHAK; GUERON, 1994; BELGITH et al., 1999).

Segundo o manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos (FUNASA, 2001), o tratamento com antiveneno específico deve ser realizado, o mais precocemente possível, por via intravenosa (IV) e em dose adequada, de acordo com a gravidade estimada do acidente. Em casos moderados duas a três ampolas IV e em casos graves de quatro a seis ampolas IV.

O uso bem sucedido de anticorpos específicos ou fragmentos para a neutralização de toxinas é baseado na capacidade do anticorpo seqüestrar a toxina e isso depende principalmente da afinidade do anticorpo e da dose. Dependendo do grau de distribuição e do tipo da toxina no momento da administração do anticorpo, pode ocorrer a redistribuição de moléculas de toxina de compartimentos mais profundos para o espaço vascular onde anticorpos estão circulando. Todos esses mecanismos de imunoneutralização contribuem para reverter à toxicidade e são intimamente dependentes das propriedades de ligação do anticorpo e das respectivas cinéticas do anticorpo e toxina (PÉPIN-COVATTA et al., 1996).

Entretanto, a controvérsia em relação à eficácia ou não do antiveneno tem sido baseada em observações clínicas isoladas, influenciadas por fatores como potência do antiveneno, dosagem, via de administração, disponibilidade, tipo de fragmento de imunoglobulina utilizado para seu preparo, entre outros (ISMAIL, 1995). O problema é agravado quando se verifica que antivenenos têm tendência à absorção e distribuição lentas (ISMAIL et al., 1983; ISMAIL; ABD-ELSALAM; AL-AHAIDIB, 1998; ISMAIL; ABD-ELSALAM, 1998) em dissonância com os venenos (*A. amoreuxi*, *L. quinquestriatus* e *Tityus serrulatus*) que apresentaram absorção e distribuição rápidas (ISMAIL et al., 1980, 1983, 1992; ISMAIL; ABD-ELSALAM; MURAD, 1990; NUNAN et al., 2004).

Antivenenos marcados com radioisótopos têm sido utilizados em estudos de biodistribuição e farmacocinética. A maioria dos estudos foi realizada com antivenenos

marcados com  $^{125}\text{I}$  (ISMAIL et al., 1983; BAZIN-REDUREAU et al., 1998; ISMAIL; ABD-ELSALAM; AL-AHAIDIB, 1998; ISMAIL; ABD-ELSALAM, 1998).

A marcação com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  parece ser mais vantajosa que com iodo radioativo. O uso de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  poderia evitar problemas de contaminação radioativa do ambiente (sublimação do iodo) e do pesquisador (meia-vida longa) e também de diminuir a possibilidade de perda de atividade biológica após marcação (NUNAN, 2001).

Tecnécio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), um isótopo largamente disponível, com emissão de radiação gama com energia de 140 keV (kilo elétron-Volts) e meia-vida curta de 6 h, tem sido o radionuclídeo mais utilizado em procedimentos clínicos de medicina nuclear e também em pesquisas básicas (DINIZ et al., 1999; ARAUJO et al., 2002; NUNAN; CARDOSO; MORAES-SANTOS, 2002).



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de inferir sobre a eficácia do antiveneno escorpiônico (fração F(ab')<sub>2</sub>) em crianças, comparando os resultados obtidos em estudos de biodistribuição do antiveneno com estudos semelhante realizados para o veneno, representado pela tityustoxina, em animais jovens (ratos de 21-22 dias).

Para realizar o estudo de biodistribuição do antiveneno escorpiônico, utilizou-se o tecnécio - 99m como radiotraçador.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Estabelecer as condições de marcação do antiveneno escorpiônico com tecnécio-99m.
- Avaliar se o antiveneno antiescorpiônico marcado com tecnécio-99m poderia ser utilizado com segurança nos estudos de biodistribuição.
- Realizar os estudos de biodistribuição do antiveneno marcado com tecnécio-99m em ratos jovens.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Escorpiões e seus venenos

Escorpiões são invertebrados venenosos encontrados desde desertos até florestas tropicais, incluindo todas as zonas de vegetação intermediárias, em altitudes tão altas quanto 5500 m nos Andes, e em cavernas tão profundas quanto 800 m. Eles podem viver dentro ou fora das casas e encontram-se embaixo de pedras, madeiras ou lixo, em fendas no chão ou paredes, sob a madeira ou folhas de palmeira dos telhados e dentro dos domicílios, em sapatos e roupas mantidas em armários (LOURENÇO et al., 1996).

São animais comumente implicados em envenenamentos humanos na América, Ásia e África. Entretanto, a picada de poucas espécies pode produzir envenenamento grave: somente cerca de 25 das quase 1500 espécies descritas no mundo são perigosas para humanos (ROODT et al., 2003).

Espécies capazes de infligir picadas fatais ocorrem no Norte da África e no Oriente Médio (gêneros *Androctonus*, *Buthus* e *Leiurus*); África do Sul (gênero *Parabuthus*); Índia (*Mesobuthus tamulus*); América do Norte, Central e Sul (*Tityus* e *Centruroides*) (LOURENÇO; CUELLAR, 1995; THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003).

Os escorpiões de importância sanitária na América pertencem à família Buthidae, a qual é representada pelo gênero *Centruroides* na América do Norte e pelo gênero *Tityus* na América do Sul (ROODT et al., 2003).

No Brasil, três espécies de escorpião do gênero *Tityus* têm sido responsabilizadas por acidentes humanos: *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo), *Tityus bahiensis* (escorpião marrom) e *Tityus stigmurus*. O *Tityus serrulatus* é encontrado na região Sudeste, Paraná, sul de Goiás, e Bahia; o *Tityus bahiensis* ocorre nas regiões Sul e Sudeste, sul

de Minas Gerais; e o *Tityus stigmurus* predomina no Nordeste. O *T. serrulatus* é responsável pela maioria dos casos mais graves (TORRES et al., 2002).

Em Belo Horizonte, cidade considerada como construída sobre solo “escorpionífero”, a ocorrência de *T. serrulatus* e os acidentes por ele provocados representam uma situação preocupante. A ocorrência tem sido relacionada a fatores inerentes ao solo, como áreas de pedreiras, barrancos, marmorarias e também a construções antigas, serrarias e olarias (BÜCHERL, 1969).

Venenos escorpiônicos são secreções compostas de proteínas e peptídeos de baixo peso molecular os quais exercem seus efeitos em canais iônicos voltagem-dependentes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), causando um aumento na excitabilidade celular e liberação de neurotransmissores (catecolaminas e acetilcolina) na terminação pós-ganglionar simpática e parassimpática. Esses neurotransmissores, atuando em diferentes setores do organismo, são responsáveis pela maior parte dos sintomas e sinais clínicos, observados nos pacientes, sendo muito variados e mutáveis. O quadro clínico estabelecido vai depender da predominância dos efeitos ora colinérgicos ora adrenérgicos (HERING; AZEVEDO-MARQUES; CUPO, 1992; GUERON et al., 1993; CUPO et al., 1994; ISMAIL, 1995; CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 2003).

A composição das toxinas e potência do veneno são diferentes de espécie para espécie. Diferenças dentro da mesma espécie concernentes ao conteúdo protéico e toxicidade dos venenos tem também sido descritas. As diferenças podem ser observadas em diferentes venenos individuais coletados de diferentes espécimes ao mesmo tempo e também no veneno do mesmo espécime seguindo extrações múltiplas durante o tempo (KALAPOTHAKIS; CHÁVEZ-OLORTEGUI, 1997).

As toxinas escorpiônicas podem ser de cadeias longas contendo 60-70 resíduos de aminoácidos e quatro ligações dissulfeto. Neste caso, seus alvos são os canais de  $\text{Na}^+$  voltagem dependentes do tecido nervoso e células musculares excitáveis (CATTERALL, 1979). Se retardarem a inativação dos canais de sódio são denominadas

de alfa toxinas (CATTERALL, 1979, 1986; JOVER; COURAUD; ROCHAT, 1980; JOVER et al., 1980). As toxinas do tipo beta ativam esses canais (COURAUD et al., 1982).

Em 1966, Gomez e Diniz, fracionaram o veneno de *Tityus serrulatus* obtendo quatro frações: duas não tóxicas ( $P_1$  e  $P_2$ ) e duas tóxicas ( $T_1$  e  $T_2$ ). A fração  $T_2$  apresentou toxicidade maior que  $T_1$  e quando purificada originou uma fração eletroforicamente homogênea em papel de acetato de celulose. Esta fração ativa foi denominada de tityustoxina (TsTX).

A TsTX foi caracterizada por Coutinho-Netto (1975) como uma proteína básica com ponto isoelétrico de 8,25 contendo 61 resíduos de aminoácidos (N-terminal: lisina) estabilizada por quatro ligações dissulfeto e peso molecular de aproximadamente 7.000 daltons.

Em estudo subsequente, Toledo e Neves (1976) isolaram e purificaram duas toxinas a partir da fração  $T_2$  de Gomez e Diniz (1966): TsTX-I e TsTX-II. Segundo Sampaio, Laure e Giglio (1983) e Arantes et al. (1989), Toledo e Neves (1976) obtiveram duas novas toxinas.

Atualmente sabe-se que TsTX-II corresponde a toxina gama e que TsTX-I é uma das toxinas que compõe a fração  $T_2$  de Gomez e Diniz (1966).

Porém, a tityustoxina (TsTX) parece ser a mais tóxica visto pelos resultados de Gomez e Diniz (1966), Martin-Eauclaire et al. (1994) e Kalapothakis e Chávez-Olórtegui (1997). A situação pode se inverter se injeções intracerebrais forem utilizadas, já que beta toxinas, como a gama, induzem efeito mais pronunciado por esta via em camundongos (KALAPOTHAKIS; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, 1997).

As toxinas escorpiônicas apresentam polimorfismo estrutural e antigênico. A comparação de homologias de seqüências de neurotoxinas permitiu uma classificação

em cinco grupos estruturais (ROCHAT; BERNARD; COURAUD, 1979). Esta classificação está de acordo com a classificação imunológica que é baseada na ausência de antigenicidade cruzada entre as toxinas pertencentes a grupos diferentes.

Em trabalho de De Lima et al. (1993), as propriedades antigênicas de toxinas do tipo alfa e beta purificadas do veneno do *Tityus serrulatus* foram analisadas por radioimunoensaio, usando anticorpos de coelho contra Ts VII (toxina gama), a principal toxina do tipo beta presente no veneno, e contra Ts IV (tityustoxina), uma toxina do tipo alfa. O soro anti-Ts VII não reconheceu nenhuma outra toxina do tipo beta (Ts I e Ts II) ou a toxina do tipo alfa Ts IV. O soro anti-Ts IV não se ligou a nenhuma das três beta toxinas (Ts I, Ts II e Ts VII), parecendo existir pelo menos três grupos antigênicos diferentes no veneno do *Tityus serrulatus*.

O polimorfismo estrutural das toxinas escorpiônicas não afeta seus efeitos farmacológicos. Ao curso da evolução, o sítio farmacológico destas proteínas foram relativamente bem conservados, ao contrário dos determinantes antigênicos que estão localizados dentro das regiões cuja seqüência é variável (DE LIMA, 1988).

### **3.2 Envenenamento escorpiônico e tratamento**

Os sinais e sintomas observados após o envenenamento escorpiônico, o diagnóstico e tratamento e o mecanismo de ação do veneno e de toxinas escorpiônicas foram objeto de estudo de inúmeros pesquisadores, principalmente após ter sido verificada a semelhança da síndrome escorpiônica independente do escorpião causador do acidente, sugerindo mecanismo de ação comum (ISMAIL, 1995).

A síndrome escorpiônica é complexa e apresenta sinais locais, sintomas cardiovasculares, gastrointestinais e neuromusculares (HERING; AZEVEDO-MARQUES; CUPO, 1992).

As manifestações no local da picada são muito significativas: dor intensa em todos os casos e, às vezes, parestesia (dormência) no membro acometido. Os sintomas gerais se iniciam com vômitos, sudorese, náuseas, dor abdominal, diarreia e taquicardia, podendo evoluir com bradicardia, insuficiência cardíaca, edema agudo dos pulmões e choque, bem como sinais e sintomas neurológicos: agitação, sonolência, confusão mental, convulsões e coma (FUNASA, 2001).

Para efeitos de classificação quanto à gravidade, as manifestações são divididas em locais e sistêmicas, que vão definir o escorpionismo como leve, moderado ou grave. As manifestações locais são caracterizadas principalmente por dor local, que ocorre praticamente em todos os pacientes, que é de intensidade variável, até insuportável, sendo o motivo maior da busca rápida de atendimento médico. Freqüentemente há parestesias. O ponto de inoculação do veneno pode não ser visível, entretanto podem ser encontrados halo eritematoso e edema discretos, sudorese e piloereção. Nos envenenamentos mais graves, a dor é mascarada pelas manifestações sistêmicas, surgindo após melhora das condições gerais do paciente. Nas manifestações sistêmicas, a liberação de acetilcolina causa aumento das secreções das glândulas lacrimais, nasais, sudoríparas, da mucosa gástrica e do pâncreas, provocando lacrimejamento, rinorréia, sudorese e vômitos. Podem ser observados tremores, espasmos musculares, miose, bradicardia, hipotensão, priapismo e hipotermia. Como consequência da liberação de catecolaminas, pode haver midríase, arritmias respiratórias e cardíacas, taquicardia, hipertensão arterial, podendo evoluir para falência cardiocirculatória e edema agudo. Cefaléia e convulsões causadas por encefalopatia hipertensiva, e hemiplegias, relacionadas com infarto cerebral, têm sido descritas mais raramente (CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 2003).

Conseqüentemente, envenenamento escorpiônico sistêmico caracterizado por manifestações cardiovasculares, pulmonar, e neurológicas, podem ameaçar a vida, particularmente em crianças menores que 11 anos de idade, devido a complicações tais como, disfunção do miocárdio, choque, síndrome da insuficiência aguda respiratória, edema pulmonar ou encefalopatia hipertensiva com edema cerebral (HERING;

AZEVEDO-MARQUES; CUPO, 1992; GUERON et al., 1993; CUPO et al., 1994; ISMAIL, 1995; CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 2003). Crianças e pessoas idosas são mais susceptíveis e, em geral, as que sofrem alguma condição de risco, tais como diabetes, hipertensão ou doença cardíaca (FREIRE-MAIA; CAMPOS; AMARAL, 1994).

Estudos epidemiológicos, como o realizado por Otero et al. (2004) na Colômbia, demonstram que envenenamento moderado e grave ao contrário do leve, é mais freqüente em crianças do que em adultos. Entre os anos de 1994 e 1998 no sudoeste do Marrocos, foram relatadas 35 mortes (3,84% dos casos estudados) devido ao envenenamento escorpiônico (TOULOUN; SLIMANI; BOUMEZZOUGH, 2001). As mortes aconteceram com indivíduos de 2 a 17 anos de idade sendo que 82,86% tinham menos que 15 anos, e 42% menos que 5 anos de idade. Na Arábia Saudita durante 5 anos de estudo, relatou-se 72.678 picadas por escorpião com uma morte. A vítima foi um garoto de 12 anos de idade que morreu de edema pulmonar, neurotoxicidade severa, hematêmese, e insuficiência circulatória (AL-SADOON; JARRAR, 2003).

O tratamento visa neutralizar o mais rápido possível a toxina circulante, combater os sintomas do envenenamento e dar suporte às condições vitais do paciente (CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 2003). O tratamento sintomático consiste no combate à dor utilizando analgésicos e/ou anestésicos sem vasoconstritor. Nos casos de vômitos profusos, além da hidratação parenteral, pode-se utilizar bromopride ou metoclopramida intravenosa. O combate à dor, como medida única adotada, é geralmente suficiente para todos os casos leves e, em adultos, para a maioria dos acidentes moderados. Todos os casos graves de escorpionismo devem ser monitorizados continuamente quanto à freqüência cardíaca e respiratória, pressão arterial, oxigenação, equilíbrio ácido-base e estado de hidratação. Traçado eletrocardiográfico, contínuo ou de forma seriada, é necessário para detecção de arritmias e outras alterações cardíacas. O tratamento farmacológico dos casos graves, com bloqueadores adrenérgicos e colinérgicos, é bastante controverso nos acidentes

humanos devido à grande instabilidade do paciente, com mudanças rápidas nas manifestações clínicas, predominando ora os efeitos adrenérgicos ora os efeitos colinérgicos. O prognóstico geralmente é bom, principalmente nos casos leves e moderados. Nos casos graves, as primeiras 24 h são críticas, período no qual podem surgir as temidas complicações cardiocirculatórias e pulmonares, que podem levar o paciente à morte (FUNASA, 2001; CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 2003).

O soro antiescorpiônico é indicado para os casos de acidente por picada de escorpião, de acordo com a gravidade da sintomatologia apresentada pela pessoa acidentada. As crianças com menos de sete anos e pessoas idosas devem ser rigorosamente observadas, durante seis a 12 horas. No caso do aparecimento de sinais e sintomas (mesmo leves) administra-se o soro antiescorpiônico. As crianças com idade entre sete e 14 anos também devem ser observadas durante seis horas, no mínimo. Os acidentes em adultos jovens raramente apresentam gravidade. O sintoma se limita à dor local, não havendo necessidade de tratamento específico com o soro. Nesses casos usam-se apenas analgésicos. Na falta do soro antiescorpiônico usa-se o soro antiaracnídico. O soro antiaracnídico é um soro polivalente porque neutraliza o veneno das aranhas dos gêneros *Phoneutria*, *Loxosceles* e *Lycosa*, bem como dos escorpiões do gênero *Tityus*. A gravidade do quadro já se manifesta dentro da primeira ou da segunda hora após o acidente. A dose é a mesma para crianças e adultos (FUNASA, 2001; CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 2003).

Os soros empregados em tratamentos podem ser de origem homóloga ou heteróloga. Os de origem homóloga são obtidos a partir de doador da mesma espécie do receptor. Os de origem heteróloga são obtidos a partir de doador de espécie diferente do receptor. No caso dos soros heterólogos, as imunoglobulinas são obtidas a partir do sangue de animais cujo organismo foi previamente estimulado com antígenos. Estes são constituídos por pequenas quantidades de toxinas (ou de toxinas modificadas, denominados toxóides) ou de venenos. As antitoxinas, os soros contra infecções por agentes infecciosos e os antivenenos constituem os soros heterólogos ou simplesmente soros (FUNASA, 2001).



No Brasil, cavalos são os animais de escolha para a produção de soros, devido a sua considerável capacidade de produção de plasma e resposta imune apropriada. Para obtenção do produto final são realizadas concentração e purificação dos anticorpos, a partir do plasma eqüino. O método de purificação mais comumente utilizado para a produção do soro heterólogo imune é a purificação da fração gama do soro por precipitação com sulfato de amônio. Digestão enzimática com pepsina produz o fragmento  $F(ab')_2$  a partir da IgG, o que diminui a frequência das reações adversas causadas pelo soro heterólogo no receptor. Este procedimento permite a produção de um soro relativamente puro, o qual mantém suas propriedades neutralizantes (AYRES; BARRAVIERA, 1999; FUNASA, 2001).

Ausência ou baixa incidência de reações adversas (1,7-8,0%) têm sido relatadas para soros antiescorpiônicos compostos por  $F(ab')_2$  e Fab. Isto pode estar relacionado ao baixo teor de proteínas e ausência do fragmento Fc nestes produtos, como bem o efeito protetor da liberação maciça de catecolaminas induzida pelo veneno escorpiônico (FREIRE-MAIA; CAMPOS; AMARAL, 1994; ISMAIL, 1994; OSNAYA-ROMERO et al., 2001).

Estudo histopatológico e enzimático após envenenamento experimental em camundongos pelo veneno do escorpião *Androctonus australis hector* mostrou alterações no fígado, coração, pulmões e rins. O fígado apresentou mudanças degenerativas, onde a maioria dos hepatócitos estava aumentada e necrótica e os núcleos estavam irregulares. O miocárdio mostrou miocitólise com edema intersticial e hemorragia. Nos pulmões, foram relatados hemorragia e espessamento do septo interalveolar. A estrutura dos glomérulos e túbulos renais estava desorganizada. As atividades das enzimas transaminases, fosfatase alcalina, creatino quinase e lactato desidrogenase estavam significativamente aumentadas no plasma e diminuídas nos órgãos, após envenenamento. Neutralização por antiveneno (fragmento  $F(ab')_2$ ), administrado 30 minutos após o envenenamento, levou a uma normalização das taxas enzimáticas, além de uma restauração total das estruturas teciduais do coração e

fígado e restauração parcial dos pulmões e rins (BESSALEM; HAMMOUDI-TRIKI; LARABA-DJEBARI, 2003).

A administração de antiveneno escorpiónico espécie-específico em cachorros e coelhos envenenados experimentalmente por injeção subcutânea do veneno de *Mesobuthus tamulus concanesis* resultou em reversão de mudanças eletrocardiográficas e redução dos níveis séricos de enzimas cardíacas (MURTHY; ZARE; HAGHNAZARI, 1999).

Vários estudos foram realizados para avaliar mais claramente o papel do antiveneno escorpiónico em pacientes vítimas de acidentes. Na Arábia Saudita, Ismail (1995) analisou mais de 24.000 casos de envenenamento e a razão total de mortalidade foi reduzida de 4-6% para menos que 0,05% quando foi empregado antiveneno, em adição a cuidados ativos de suporte. Gajre e Dammas (1999) avaliaram durante um período de cinco anos (1991-1995) crianças envenenadas por escorpião e relataram que as crianças sintomáticas que receberam antiveneno tiveram poucas complicações, menor permanência no hospital, além de nenhuma morte quando comparadas com o grupo sintomático que não recebeu antiveneno. Benefício terapêutico significativo também foi demonstrado em termos de permanência hospitalar em resposta ao antiveneno espécie-específico por Bergman (1997) num estudo clínico e epidemiológico de escorpionismo por *Parabuthus transvaalicus* conduzido na África do Sul com 17 pacientes com envenenamento grave.

Krifi et al. (1999) realizaram medida da concentração do veneno no sangue por ELISA antes e até 6 horas após a terapia com antiveneno na Tunísia em crianças com até 15 anos de idade que apresentavam envenenamento escorpiónico moderado ou grave. A administração IM do antiveneno não mostrou significantes efeitos na curva toxicocinética do veneno e no tempo de recuperação dos pacientes. Entretanto, a mesma quantidade de antiveneno, administrado IV, removeu rapidamente do sangue toxinas livres do veneno, além de encurtar significativamente o tempo de recuperação dos pacientes.

Ensaio de ELISA para detecção de antígenos do veneno e anticorpos de eqüinos contra o veneno do *Tityus serrulatus* foram também realizados por Rezende et al. (1995) antes e após 1, 6, 12 e 24 horas da terapia com antiveneno por via IV em 18 pacientes com manifestações sistêmicas após picada do escorpião *T. serrulatus*. Níveis aumentados de antígenos do veneno circulante foram detectados nos pacientes antes da terapia, mas não mais detectados 1 hora após o uso do antiveneno. A evolução das manifestações clínicas e laboratoriais do envenenamento mostrou que vômito e dor local diminuíram dentro de 1 hora e hiperglicemia não foi mais detectada 12 horas após a terapia com antiveneno. As manifestações cardiorespiratórias desapareceram 6-24 horas após a administração do antiveneno e todos os pacientes recuperaram completamente.

Os estudos que demonstraram benefícios com o uso do antiveneno enfatizam a necessidade do uso rápido do antiveneno (dentro de 2 horas) e também apontam para a importância da administração por via IV, e não IM ou SC do antiveneno, bem como a necessidade de doses muito altas (ISMAIL, 1995; REZENDE et al., 1995; KRIFI et al., 1999). Em 1985, Amitai et al. verificaram correlação entre gravidade do acidente e o tempo decorrido entre a picada do escorpião e o início do tratamento em crianças picadas pelos escorpiões *Buthus quinquestriatus* e *Buthus judaicus*.

Em 1995, Bucarechi et al. publicaram os resultados de um estudo clínico comparativo, envolvendo crianças de até 15 anos picadas pelo *Tityus serrulatus* ou *Tityus bahiensis*, que apresentaram quadro grave de envenenamento. O envenenamento grave causado pelo *Tityus serrulatus* foi 26,2 vezes mais freqüente que o do *Tityus bahiensis*. Todos os pacientes foram tratados com antiveneno específico via IV sem nenhuma medicação prévia no intervalo de tempo de 45 minutos a 5 h após o acidente. Todos os parâmetros laboratoriais como glicemia, potassemia e contagem de leucócitos tenderam a retornar aos valores normais dentro de 6 a 18 h após o acidente. Uma criança de dois anos morreu 65 h após o acidente, ela tinha recebido antiveneno 90 minutos após a picada.

Outros estudos também demonstraram que o antiveneno escorpiônico foi administrado sem sucesso em alguns casos de crianças envenenadas. Duas garotas (6 e 10 anos de idade) e uma garota de 16 meses de idade que receberam cuidados médicos e antiveneno várias horas após a picada pelo escorpião *Tityus trivittatus* na Argentina (ROODT et al., 2003) e em quatro crianças quando foi administrado dentro de 1,5 h após picada por escorpião em área rural da Índia, onde o antiveneno não preveniu o desenvolvimento de manifestações cardíacas graves, sendo que duas dessas crianças morreram de massivo edema pulmonar (BAWASKAR, H.; BAWASKAR P., 2003).

Estudo clínico realizado por Belghith et al. (1999) avaliou a eficácia do antiveneno escorpiônico comparando-se um grupo de pacientes que receberam altas doses de hidrocortisona e antiveneno escorpiônico com outro grupo que recebeu somente altas doses de hidrocortisona após envenenamento escorpiônico. Os dois grupos não apresentaram diferenças no curso clínico do envenenamento.

Abdoon et al. (2006) demonstraram em camundongos injetados com veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* que inibidores de diferentes passos do processo inflamatório exerceram papel importante prolongando o tempo de sobrevivência, bem como aumentando a porcentagem de animais sobreviventes.

Uma variedade de sintomas do SNC foi descrita no escorpionismo humano, incluindo irritabilidade, desmaios focais e generalizados, hemiplegia, hipertermia e hipotermia e coma (EFRATI, 1978, ELITSUR et al., 1984, SOFER; GUERON, 1988, ISMAIL; ABD-ELSALAM; MURAD, 1990). Poucos estudos foram publicados descrevendo alterações anatômicas no SNC, em casos fatais, incluindo congestão cerebral, hemorragias e trombose cerebrovascular (REDDY et al., 1972, SOFER; GUERON, 1988). Porém, nenhum estudo explica os distúrbios do SNC observados nos envenenamentos escorpiônicos. Segundo Ismail (1995) é difícil acreditar que os efeitos sobre o SNC sejam devidos à ação periférica do veneno, já que a maioria desses efeitos ocorre várias horas após a picada, em um momento em que, grande parte do veneno e das substâncias autofarmacológicas, por ele liberadas, já foram provavelmente eliminadas.

Existe a possibilidade de o veneno atravessar a barreira hematoencefálica em crianças, em consequência da barreira não estar totalmente desenvolvida como observado para tetraciclina, analgésicos narcóticos, anestésicos gerais (DONE, 1964).

Fernández-Bouzas et al. (2000) relataram dois casos de crianças (uma garota de 8 anos e um garoto de 7 anos de idade) que apresentaram complicações neurológicas graves, sugerindo infarto cerebral, após terem sido picadas por escorpião no México. Antiveneno escorpiônico foi administrado nos dois casos, sendo que no garoto duas horas após o acidente juntamente com diazepam. Dois casos pediátricos com a associação de envenenamento por picada de escorpião (*Centruroides limpidus limpidus*) e edema cerebral também foram relatados por Romero e Hernández (2005). A primeira paciente (3 anos de idade) foi atendida 11 horas após o acidente, enquanto no segundo caso (6 anos de idade), embora a paciente tivesse sintomatologia sistêmica, a criança foi atendida 30 minutos após o acidente. Ambas pacientes apresentaram dados de intoxicação grave. Tratamento sintomático foi administrado. Também foi administrado tratamento específico com antiveneno. O primeiro caso progrediu para um resultado fatal e o outro caso desenvolveu edema cerebral moderado com uma evolução satisfatória.

Estudos de distribuição tecidual de venenos escorpiônicos realizados até o momento, em animais adultos, mostraram que a captação cerebral é insignificante e que provavelmente, nesses animais, o veneno não atravessa a barreira hematoencefálica. Porém, Clot-Faybesse et al. (2000) demonstraram que em camundongos mais jovens (3 e 7 dias) a toxina do veneno do *Androctonus australis* atravessou a barreira hematoencefálica. Pequena quantidade da toxina foi detectada no cérebro dos neonatos, mas não no dos adultos.

Nunan et al. (2003) verificaram em estudo de biodistribuição por via subcutânea utilizando ratos adultos e de 21-22 dias, presença de pequena quantidade de  $^{99m}\text{Tc}$ -TsTX no cérebro dos mais jovens, indicando a possibilidade da toxina atravessar a barreira hematoencefálica.

Mesquita, Moraes-Santos e Moraes (2003) verificaram que pequena quantidade de TsTX injetada diretamente no Sistema Nervoso Central de ratos adultos é capaz de produzir sintomas de envenenamento escorpiônico severo (ex: edema pulmonar e arritmias cardíacas). Este trabalho levanta a hipótese do cérebro, ao invés de outros órgãos, ser a chave para explicar o pior prognóstico de crianças e idosos após acidentes escorpiônicos. De fato, um agente neuroprotetor tem se mostrado capaz de bloquear completamente o edema pulmonar induzido pela injeção no SNC da TsTX em ratos adultos (MESQUITA; MORAES-SANTOS; MORAES, 2002).

Sandoval e Dorce (1993) verificaram a influência da idade e sexo sobre a toxicidade do veneno do *Tityus serrulatus*, utilizando a via IV e ratos adultos (dois ou três meses) e desmamados (sem definição exata da idade). Os autores não encontraram diferença entre machos e fêmeas quanto à indução de edema pulmonar pelo veneno e não observaram diferença na letalidade do veneno para adultos e desmamados. Os autores argumentaram a favor do efeito peso-dependente do veneno em crianças. Em 1994, Queiroz et al. demonstraram que a liberação de acetilcolina em fatias de córtex cerebral, induzida pela tityustoxina é idade-dependente, utilizando ratos de 2, 12 e 23 meses; verificaram que a liberação de acetilcolina foi reduzida em 60% nos animais mais velhos (23 meses) sugerindo que a idade reduz a resposta dos terminais nervosos cortico-cerebrais à estimulação pela tityustoxina.

### **3.3 Estudos de radiomarcção de venenos e anticorpos**

Radiofármacos são utilizados em medicina nuclear com fins diagnósticos e terapêuticos. Como a distribuição dos radiofármacos *in vivo* é determinada por características fisiológicas do organismo, eles podem fornecer importantes informações a respeito do seu funcionamento de uma maneira não invasiva. Além do  $^{99m}\text{Tc}$  ter proporcionado um grande avanço nos métodos de diagnóstico, ele tem sido largamente

empregado em linhas de pesquisa, tais como na marcação de anticorpos e proteínas (PAUWELS et al., 1993).

Há dois métodos gerais para marcação de um anticorpo com  $^{99m}\text{Tc}$ . No método direto, o anticorpo reduzido reage com  $^{99m}\text{Tc}$  e no método indireto um agente quelante bifuncional é usado para conjugar o anticorpo ao  $^{99m}\text{Tc}$  (SALOUTI et al., 2006). Marcação direta é conseguida após fraca redução das moléculas do anticorpo, criando grupos sulfidrilas de alta afinidade pela quebra das ligações S-S de resíduos de cistina das cadeias leve e pesada (SAPIENZA et al., 2002). A vantagem de um método de marcação direto, é sua simplicidade experimental e seu potencial desenvolvimento em um formato de kit (PAUWELS et al., 1993).

Antivenenos e toxinas escorpiônicas marcadas têm sido usadas em estudos farmacocinéticos e de distribuição tecidual. Os estudos foram feitos, na sua maioria, com antivenenos, venenos ou toxinas marcadas com  $^{125}\text{I}$  (CATTERALL, 1980; ISMAIL et al., 1983; VALDIVIA et al., 1994; ISMAIL, 1995; ISMAIL; ABD-ELSALAM, 1998; BAZIN-REDUREAU et al., 1998). O  $^{99m}\text{Tc}$  pode substituir o iodo com a vantagem de manuseio seguro, o uso de  $^{99m}\text{Tc}$  poderia evitar problemas de contaminação radioativa do ambiente (sublimação do iodo) e do pesquisador (meia-vida longa), além de disponibilidade em maior extensão.  $^{99m}\text{Tc}$  tem uma meia-vida curta ( $T_{1/2} = 6$  h), emissão de radiação gama, energia de radiação de 140 keV. Devido a essas características, tem sido selecionado como radiomarcador em vários estudos experimentais (DEWANJEE, 1990; DINIZ et al., 1999; ARAUJO et al., 2002; NUNAN; CARDOSO; MORAES-SANTOS, 2002).

Numerosos métodos têm sido reportados na última década para a radiomarcagem de proteínas em geral e anticorpos em particular com  $^{99m}\text{Tc}$  ambos diretamente (sem a prévia ligação de um quelante exógeno) e indiretamente (após ligação de um quelante exógeno). Um dos métodos diretos, emprega altas concentrações de íon estano para reduzir grupos dissulfeto para grupos sulfidrilas para subsequente ligação de  $^{99m}\text{Tc}$  (RHODES et al., 1986) e tem sido bastante utilizado para radiomarcagem anticorpos

antitumor para imagem clínica. Entretanto, esses métodos diretos foram considerados como geradores de um anticorpo marcado instável para a dissociação do  $^{99m}\text{Tc}$  pertecnetato e para a formação de  $^{99m}\text{Tc}$ -colóides (MARDIROSSIAN et al., 1992).

Pauwels et al. (1993) desenvolveram um método direto de marcação de proteínas com o tecnécio-99m. Este método utiliza o borohidreto e o cloreto estanoso como agentes redutores. Uma das finalidades destes experimentos foi padronizar um método para a marcação de imunoglobulinas policlonais humanas. Este método demonstrou ser confiável e reproduzível. Os experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a atividade biológica das proteínas foi mantida.

F(ab')<sub>2</sub> anti-hepatoma, monoclonal, foi marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  pelo método direto via redução pelo íon estanoso. Estudos *in vitro* demonstraram que o fragmento radiomarcado reteve sua imunorreatividade. Estudos desafio indicaram que  $^{99m}\text{Tc}$ -F(ab')<sub>2</sub> é mais estável em EDTA que em L-cisteína. Eficiência de marcação de 2% no experimento controle usando F(ab')<sub>2</sub>, não reduzida, indicou que não há troca com sítios de baixa afinidade e também demonstra que a redução das ligações dissulfeto é um passo inicial necessário na marcação direta com  $^{99m}\text{Tc}$  de anticorpos. A ligação entre SH e Tc é mais forte que de N-Tc ou O-Tc o qual foi verificada pelo ensaio desafio de  $^{99m}\text{Tc}$ -F(ab')<sub>2</sub> na presença de EDTA. Radioimagem e biodistribuição em camundongos com carcinoma hepatocelular mostraram uma significativa captação no tumor 24 h após a injeção IV. O sangue, rins, fígado e tumor após 24 h apresentaram as seguintes captações em % Dose/g:  $0,56 \pm 0,09$ ;  $56,45 \pm 11,36$ ;  $1,43 \pm 0,27$  e  $6,57 \pm 3,01$ , respectivamente. A eficiência de marcação foi de no máximo 84,2%. (BIAN; CHEN; DENG, 2000).

Anticorpo policlonal anti-amastigota (IgG) foi incubado com soluções de cloreto estanoso e borohidreto de sódio. Após que, 3.7 MBq de tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) foi adicionado. Um rendimento de marcação do anticorpo cerca de 84% foi obtido. Após filtração de  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG, a pureza radioquímica aumentou de 84% para 95%. A marcação de IgG com  $^{99m}\text{Tc}$  não modificou a imunorreatividade do anticorpo, desde que ele foi



capaz de identificar *in vitro* e *in vivo* o antígeno específico *Leishmania amazonensis* (ARAUJO et al., 2002).

Atividades biológicas da TsTX e veneno total do escorpião *Tityus serrulatus* marcado e não marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  foram comparadas (NUNAN, 2001). O rendimento de marcação foi de 60-70% para o veneno e de 75-85% para a TsTX. A manutenção da atividade biológica foi avaliada pela determinação da  $\text{DL}_{50}$  do veneno marcado e não marcado usando ratos de 21-22 dias de idade. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o veneno não marcado ( $\text{DL}_{50} = 3,0 \pm 0,4 \text{ mg/Kg}$ ), e o marcado ( $\text{DL}_{50} = 2,8 \pm 0,1 \text{ mg/Kg}$ ). Considerando que a TsTX é a principal proteína tóxica do veneno do *Tityus serrulatus* quando injetada por via periférica (KALAPOTHAKIS; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, 1997), é provável que esta fração não tenha sido alterada pela marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ . Além disso,  $^{99m}\text{Tc}$ -TsTX foi capaz de promover efeitos tóxicos característicos em camundongos. Os sinais seguintes foram observados: piloereção, salivação, taquicardia, dispnéia, contração muscular e convulsão, após injeção intraperitoneal de frações coletadas em cromatografia de exclusão Sephadex G-10.

### **3.4 Estudos farmacocinéticos e de biodistribuição de venenos e antivenenos escorpiônicos**

Devido às dúvidas sobre a eficácia do antiveneno e esperando contribuir para reduzi-las, Ismail et al. (1980) realizaram o primeiro estudo sobre a farmacocinética de um veneno escorpiônico. O veneno do escorpião *Androctonus amoreuxi*, marcado com  $^{125}\text{I}$  e injetado por via IV em coelhos adultos serviu de modelo. Os autores observaram uma distribuição rápida do sangue para os tecidos e uma eliminação lenta pelo organismo. Estudos subseqüentes de farmacocinética e biodistribuição para outros venenos escorpiônicos comprovaram estas propriedades do veneno (ISMAIL et al., 1992;

PÉPIN-COVATTA et al., 1996; SANTANA et al., 1996; REVELO et al., 1996; CLOT-FAYBESSE et al., 2000; NUNAN et al., 2003).

Em estudos de biodistribuição, o rim foi o órgão que apresentou, em geral, a maior concentração de veneno seguido do fígado, pulmão e coração. Não se detectou veneno no cérebro de animais adultos (REVELO et al., 1996; CLOT-FAYBESSE et al., 2000; NUNAN, et al. 2003).

Em 2000, Clot-Faybesse et al. detectaram veneno, ainda que em quantidades pequenas, no cérebro de camundongos de três e sete dias. Este estudo apontou para a possibilidade de toxinas escorpiônicas atravessarem a barreira hematoencefálica em animais mais jovens.

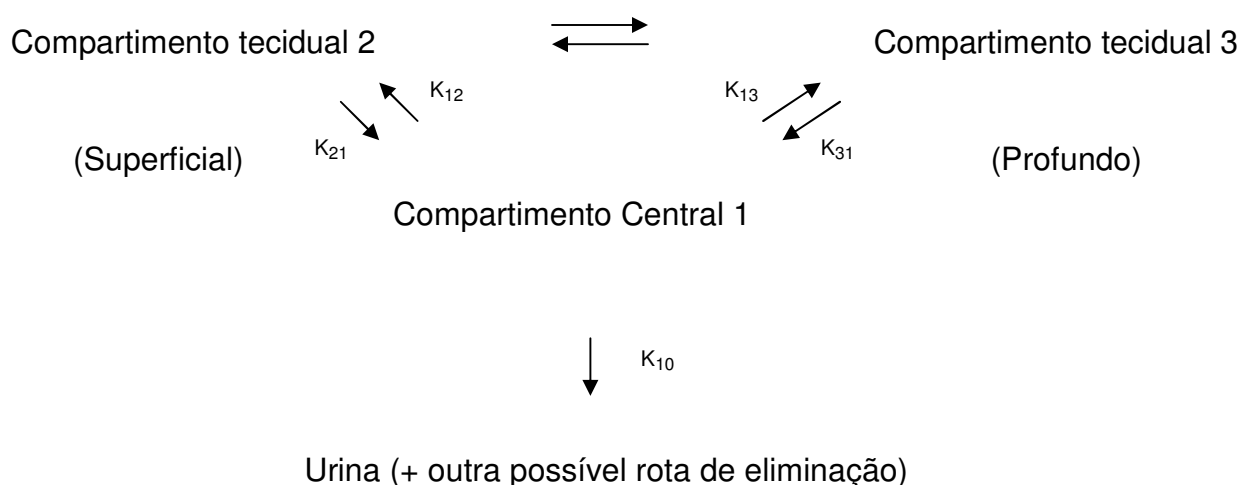
Em estudo realizado por Nunan et al. (2003),  $^{99m}\text{Tc}$ -TsTX foi injetada subcutaneamente em ratos adultos (150-160 dias) e jovens (21-22 dias). Observou-se distribuição mais rápida da toxina nos órgãos de ratos jovens. Detectou-se também, maior acúmulo da toxina no cérebro de animais jovens, o que é sugestivo de maior permeabilidade para a toxina ao longo da barreira hematoencefálica e ajuda elucidar as manifestações clínicas freqüentemente observadas em crianças no envenenamento escorpiônico.

Em 1983, Ismail et al. investigaram a farmacocinética do antiveneno marcado com  $^{125}\text{I}$ , tendo em vista que o veneno se distribuía rapidamente e suspeitava-se que o antiveneno pudesse ter distribuição mais lenta. A comparação dos parâmetros farmacocinéticos para o veneno (ISMAIL et al., 1980) e para imunoglobulina preparada contra o veneno permitiu a verificação de que a distribuição e eliminação do antiveneno são muito mais lentas que a do veneno. Quando o antiveneno foi injetado uma hora após o veneno (ISMAIL et al., 1992), os parâmetros farmacocinéticos do veneno não se modificaram com a injeção do antiveneno.

Em estudos utilizando IgG e as frações Fab e  $\text{F(ab}')_2$  (ISMAIL; ABD-ELSALAM, 1998), observou-se que a fração  $\text{F(ab}')_2$  se distribuiu mais rapidamente que a IgG e a Fab e

sua eliminação foi praticamente idêntica ao veneno. Já a Fab e a IgG apresentaram eliminação e distribuição mais lentas que o veneno. Os autores observaram ainda, que as frações imunoglobulínicas permanecem mais no sangue que nos tecidos, ao contrário do veneno, e que um tempo mínimo é necessário para que o antiveneno se distribua nos tecidos e consiga alcançar um nível suficiente para neutralizar o veneno ou retirá-lo dos sítios de ligação.

As curvas de log da concentração no sangue para IgG e  $F(ab')_2$  versus tempo obtidas foram trifásicas, caracterizadas por uma rápida fase de declínio ( $\rho$ ) seguida por uma fase mais lenta intermediária ( $\alpha$ ), então, uma fase de declínio terminal muito mais lenta ( $\beta$ ). O modelo farmacocinético para o antiveneno escorpiónico é representado a seguir (ISMAIL et al., 1983; ISMAIL; ABD-ELSALAM, 1998).



É assumido que a eliminação é primariamente do compartimento central seguindo uma aparente taxa constante de eliminação de primeira ordem. As razões constantes de transferência intercompartimental,  $K_{12}$ ,  $K_{21}$ ,  $K_{13}$  e  $K_{31}$ , refletem a taxa de distribuição dentro e fora dos compartimentos teciduais, superficial e profundo, respectivamente. Os valores para o veneno e toxina foram várias vezes maiores que aqueles para as frações imunoglobulínicas, indicando mais rápido equilíbrio e livre transferência do veneno e toxina entre sangue e tecidos do que as frações imunoglobulínicas. A razão  $K_{13}/K_{31}$

para o veneno e toxina foi alta, indicando a alta afinidade do veneno e toxina para o compartimento tecidual profundo do que para o sangue. A razão  $K_{12}/K_{21}$  foi menor que 1, o que indica a mais alta afinidade do veneno e toxina para o sangue do que para os compartimentos superficiais. Em contraste, as razões  $K_{12}/K_{21}$  e  $K_{13}/K_{31}$  para as frações imunoglobulínicas foram sempre menores que 1, indicando sua baixa afinidade pelos tecidos e tendência de permanecerem no compartimento central (ISMAIL et al., 1983; ISMAIL; ABD-ELSALAM, 1998).

O veneno e toxina foram eliminados do corpo mais rapidamente que as frações imunoglobulínicas (ISMAIL; ABD-ELSALAM; AL-AHAIDIB, 1998).

Ao administrar a fração  $F(ab')_2$  específica após o veneno do escorpião *Centruroides limpidus limpidus*, Calderón-Aranda et al. (1999) observaram uma redistribuição do veneno do compartimento extravascular para o espaço vascular através do aumento da área sob a curva (AUC). Este fenômeno, segundo os autores, foi bem documentado para intoxicações com colchicina (SABOURAUD et al., 1992), com digoxina (JOHNSTON; STEVENSON; HEWICK, 1987), com dexpramina (PENTEL; KEYLER; BRUNN, 1991) e no envenenamento por serpente, tratado com fragmentos específicos de imunoglobulina.

As farmacocinéticas do veneno do escorpião *Tityus discrepans* e de  $F(ab')_2$  equina anti-*Tityus* covalentemente ligada a fluoresceína ou fluorescamina foram determinadas por ELISA. Apesar de a massa molecular de  $F(ab')_2$  ser cerca de 10 vezes maior que as toxinas, a taxa de fluxo de  $F(ab')_2$  do sangue para os tecidos foi cerca de 4 vezes mais rápida que o fluxo do veneno, sugerindo que o antiveneno é ativamente transportado do sangue para os tecidos. O compartimento plasmático seria caminho do sítio de envenenamento para os órgãos alvos, portanto, a venenemia subestima a quantidade de veneno recebida; esta subestimação aumenta com o tempo do envenenamento, o que reforça a importância do uso precoce do antiveneno, idealmente na primeira hora do envenenamento. Quando  $F(ab')_2$  é injetada após o veneno, a concentração do mesmo livre no plasma cai à zero imediatamente, ao passo que a

quantidade nos tecidos diminui muito lentamente. O antiveneno remove prontamente o veneno do plasma e dos compartimentos extracelulares; a remoção do compartimento extracelular é mais rápida quando 3 ampolas de antiveneno são administradas ao invés de 1 ampola. Quando insuficiente quantidade de antiveneno é administrada, o veneno plasmático é inicialmente neutralizado completamente, mas aumenta novamente ao passo que o veneno continua se difundindo a partir do sítio de inoculação para o plasma (SEVCIK et al., 2004).

Estudos farmacocinéticos utilizando veneno e antivenenos escorpiônicos em animais experimentais demonstraram que os parâmetros farmacocinéticos do veneno e antiveneno são totalmente diferentes. Os efeitos da dose, da via e do tempo de injeção do antiveneno nos parâmetros farmacocinéticos do veneno e na eficácia da imunoterapia também foram estudados. Estes estudos indicam que a injeção IV precoce de uma dose mínima neutralizante de antiveneno é necessária para requerer uma completa e permanente neutralização dos antígenos do veneno circulante. Estes dados poderiam ser levados em consideração na produção do antiveneno (título do antiveneno) como bem nos protocolos terapêuticos (dose, via de administração) para melhorar a soroterapia (PÉPIN-COVATTA et al., 1996; GHALIM et al., 2000; KRIFI et al., 2001, 2005).

Bazin-Redureau et al. (1998) calcularam parâmetros farmacocinéticos preditos para um indivíduo humano de 70 Kg para um antiveneno eqüino  $F(ab')_2$  através da disposição plasmática do  $F(ab')_2$  marcada com  $^{125}I$  administrada IV em camundongos, ratos e coelhos. Um modelo bicompartimental com eliminação somente do compartimento central foi assumido ser adequado para descrever a disposição de  $F(ab')_2$  a qual corresponde a um decaimento biexponencial. Resultados mostraram que a menor espécie tem o maior clearance total corporal. A eliminação de  $F(ab')_2$  foi mais rápida em camundongos que em ratos e coelhos. Os valores preditos para humanos foram: volume de distribuição de 4,78 litros, o clearance total de 19,07 mL/L e a meia-vida de eliminação de 7,2 dias.

O primeiro estudo da farmacocinética em oito humanos voluntários sadios de um antiveneno escorpiônico  $F(ab')_2$  (anti-*Centruroides*) usando ELISA foi realizado por Vásquez et al. (2005). A faboterapia foi administrada como 47,5 mg IV bolus na ausência de envenenamento. Amostras de sangue foram recolhidas nos tempos 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 360 min após administração do antiveneno. Subseqüentemente, os voluntários fizeram quatro visitas no intervalo de 24 horas, uma no dia 10 e uma no dia 21 ao hospital. O tempo de curso da  $F(ab')_2$  no plasma de sete voluntários foi descrita com uma combinação linear de três componentes exponenciais; um modelo com quatro componentes exponenciais foi necessário para ajustar o oitavo voluntário. Todos voluntários apresentaram uma fase inicial rápida de decaimento de  $F(ab')_2$  no plasma de 15 min. O tempo médio que a  $F(ab')_2$  permaneceu no corpo foi de 10,4 dias.

Marcação do veneno escorpiônico *Mesobuthus tamulus concanesis* com  $^{99m}\text{Tc}$  foi realizado utilizando redução direta com estanho. Estudos de biodistribuição foram realizados em ratos Wistar a diferentes intervalos de tempo após administração IV do veneno marcado. Após 5 minutos da administração, o veneno marcado foi encontrado no sangue (27,7%), músculo (30,11%), ossos (13,3%), rins (11,5%), fígado (10,4%). Um estudo de imunorreatividade foi realizado em coelhos após injeção IV do veneno marcado seguido por injeção do antiveneno espécie-específico. Um aumento três vezes na captação renal foi observado quando comparada com o veneno administrado sozinho. Quando o antiveneno foi administrado, a captação do veneno nos rins foi maior do que todos os outros órgãos (MURUGESAN et al., 1999).

Em 1996, REVELO et al. estudaram a distribuição tecidual do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e do antiveneno em camundongos adultos injetados via SC com o veneno e via IV com o antiveneno e utilizando ELISA para determinação das concentrações. Os níveis máximos do veneno no soro, pulmão, coração e baço foram observados 30 minutos após a injeção. Os rins e fígado apresentaram as maiores concentrações do veneno, com pico aos 15 minutos. Duas horas após a injeção, a concentração do veneno no sangue e nos tecidos decresceu rapidamente até que após

8 horas não foi mais detectável. Não se detectou veneno no cérebro dos camundongos adultos, em nenhum dos tempos estudados. No coração, a concentração foi tão baixa que os autores não acreditam em uma ação direta.

Quanto ao antiveneno, administrado imediatamente após o veneno, reduziu significativamente a concentração do veneno no sangue e nos tecidos. Quando foi injetado uma hora após o veneno, a redução foi menos intensa, sendo detectado veneno nos pulmões e rins até quatro horas após a administração do antiveneno. REVELO et al. (1996) concluíram, ainda, que a soroterapia foi menos eficaz quando administrada horas após o veneno.

O veneno e toxina de serpente alcançaram a concentração máxima nos tecidos muito mais rapidamente quando comparado com IgG, F(ab')<sub>2</sub> ou Fab. Com exceção do fígado e coração para IgG e rins para F(ab')<sub>2</sub>, as frações imunoglobulínicas requerem várias vezes o tempo requerido pelo veneno e toxina para alcançar a concentração máxima nos tecidos. Em órgãos altamente perfundidos (coração, pulmão, fígado e rins), o veneno e toxina foram eliminados muito mais rapidamente que as frações imunoglobulínicas. Isto foi refletido na diminuição significativa das AUCs e nos tempos residuais médios mais curtos, quando comparado com as frações imunoglobulínicas. Com exceção da glândula tireóide, a ordem de acumulação das frações imunoglobulínicas foi fígado > conteúdo estomacal > rins > duodeno > pulmão > estômago > coração. A mais alta captação foi no conteúdo estomacal no caso do veneno e nos rins no caso da toxina. Quando a correção para o peso relativo dos órgãos foi feita, a ordem de acumulação do veneno e da toxina foi rins > conteúdo estomacal > estômago > duodeno > pulmão > coração > fígado e para as frações imunoglobulínicas foi pulmão > conteúdo estomacal > rins > estômago > duodeno > coração > fígado (ISMAIL; ABD-ELSALAM; AL-AHAIDIB, 1998).

Em relação à distribuição, parâmetros como as constantes de velocidade de distribuição, com suas respectivas meias-vidas, e volume aparente de distribuição podem caracterizar a distribuição de uma substância no organismo. Porém, a sua

extensão verdadeira, só é verificada por experimentos específicos, medindo a concentração ou registrando a radioatividade presente nos diversos tecidos e órgãos após administração da substância marcada, utilizando modelos experimentais (NUNAN, 2001).

Estudos de distribuição de veneno e antiveneno escorpiónico permitem um melhor entendimento da patofisiologia do envenenamento, especialmente pela determinação dos seus níveis nos tecidos (ISMAIL et al., 1980, 1983; ISMAIL; ABD-ELSALAM, 1988; DASGUPTA; GOMES; LAHIRI, 1991).

A distribuição maior e mais rápida do veneno no rato mais jovem, pode levar a uma redução de sua disponibilidade no sangue, limitando assim, a eficiência do soro imune o qual apresenta absorção e distribuição bem mais lentas que os venenos (ISMAIL et al., 1983; CALDÉRON-ARANDA et al., 1999).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Animais

Para realização do teste de Potência foram utilizados camundongos albinos suíços da linhagem Swiss Webster pesando 18 - 22 g do Biotério da Fundação Ezequiel Dias (Funed). Nos estudos de biodistribuição foram utilizados ratos Wistar machos recém desmamados com idade de 21-22 dias pesando  $44 \pm 7$  g do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram alimentados com ração comercial e água “ad libitum”. O protocolo dos estudos com animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), estando de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (Anexo A).

#### 4.1.2 Veneno e Antiveneno para o *Tityus serrulatus*

Os experimentos foram realizados com padrão interno de referência do veneno da Seção de Animais Peçonhentos da Funed e com o antiveneno escorpiônico (fração  $F(ab')_2$ ) obtida de plasma eqüino hiperimunizado produzido pela Divisão de Produção de Imunobiológicos da Funed. A  $DL_{50}$  do lote de veneno escorpiônico utilizado foi determinada pela equipe do Controle Biológico da Funed e apresentou o valor de 19,5  $\mu$ g/20 g de camundongo. O antiveneno escorpiônico utilizado foi o produto final do lote n° 040629-31 A com teor de proteína de 5,19 g%.

### 4.1.3 Reagentes

Acetona – Merck (Alemanha)

Ácido clorídrico – Vetec (Brasil)

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) - Sigma (EUA)

Albumina sérica bovina (BSA) – Sigma (EUA)

Borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) – Merck (Alemanha)

Cloreto estanoso ( $\text{SnCl}_2$ ) – Sigma (EUA)

Cloreto de sódio – Química (Brasil)

Glicina (Ácido aminoacético) – Sigma (EUA)

Hidróxido de sódio – Vetec (Brasil)

Marcador de Peso molecular (LMW-SDS Marker Kit) - GE Health Care (EUA)

Pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ) – IPEN/CNEN-SP (Brasil)

Sepharose® 4B – Pharmacia (Suécia)

Uretana - Sigma (EUA)

### 4.1.4 Outros

Indicador universal pH 0-14 – Merck (Alemanha)

Membranas de éster de celulose de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosidade – Millipore (Brasil)

Papel Whatman nº 1 – Whatman (Inglaterra)

Placas de sílica gel 60 para cromatografia – Merck (Alemanha)

#### 4.1.5 Equipamentos

Balança Semi-Analítica Digital – OHAUS (EUA)

Balança para pesagem de animais OHAUS – Modelo GT – 2100 (EUA)

Banho-maria – Yamato (Japão)

Cintilador automático ANSR – Abbot (EUA)

Espectrofotômetro - Shimadzu UV 106 A (Japão)

Potenciômetro - pH Analyser 300 (EUA)

#### 4.2 Métodos

##### 4.2.1 Marcação do antiveneno escorpiônico com $^{99m}\text{Tc}$ Tecnécio ( $^{99m}\text{Tc}$ )

A marcação do soro antiescorpiônico com  $^{99m}\text{Tc}$  foi realizada por método direto de acordo com Pauwels et al. (1993), Araujo et al. (2002) e Nunan, Cardoso e Moraes-Santos (2002), utilizando dois agentes redutores: cloreto estanoso e borohidreto de sódio.

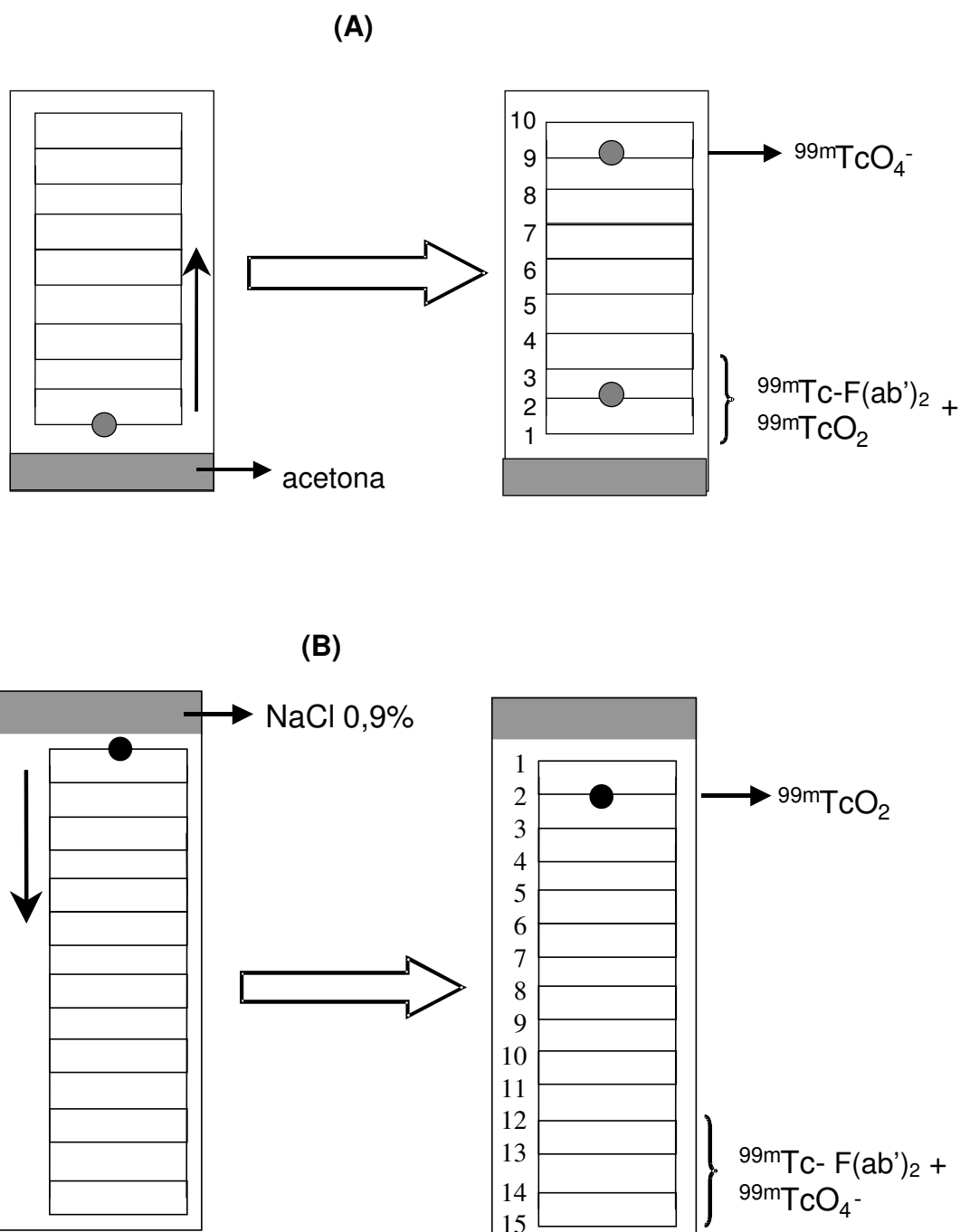
As condições de marcação foram estudadas em relação à influência da massa de proteínas do soro antiescorpiônico e massa dos agentes redutores, tendo em vista a eficiência de marcação. Alíquotas de 300 a 700  $\mu\text{L}$  de soro antiescorpiônico (15,57 a 36,33 mg de proteína), foram incubadas à temperatura ambiente, durante 20 minutos, com 0 a 40  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{SnCl}_2$  (2,0 mg/mL) em HCl 0,25 N e 0 a 40  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{NaBH}_4$  (10,0 mg/mL) em NaOH 0,1 N após o pH ser ajustado para 7,0 e ter sido adicionado uma quantidade de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ) capaz de gerar uma atividade final de 18,5 Mega Becquerel (MBq).

#### 4.2.2 Determinação da eficiência de marcação com $^{99m}\text{Tc}$ do antiveneno escorpiónico

A eficiência de marcação foi verificada por método adaptado da Farmacopéia Americana – USP 28 (UNITED ..., 2000) por Nunan, Cardoso e Moraes-Santos (2002), que utiliza dois sistemas cromatográficos: cromatografia ascendente em fita de sílica gel 60 e cromatografia descendente em papel Whatman nº 1. A Figura 1 ilustra, esquematicamente, os dois sistemas utilizados.

Pelo primeiro sistema (cromatografia ascendente), aplicou-se 5  $\mu\text{L}$  do produto marcado a uma tira de sílica gel (1,0 x 10,0 cm) que foi eluída com acetona. Após eluição subdividiu-se a tira em 10 segmentos de 1 cm que foram levados ao cintilador automático para leitura da radioatividade. Nesse sistema o tecnécio hidrolizado ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ) e a  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  permanecem no ponto de aplicação (RF 0 A 0,1) e o não reduzido ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) migra para a parte superior da fita. Pode-se então determinar o percentual de radioatividade correspondente ao tecnécio livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) que não foi reduzido pelos agentes redutores.

No segundo sistema (cromatografia descendente) foram aplicados 5  $\mu\text{L}$  do produto marcado em tira de papel Whatman nº 1 (5 x 36 cm) previamente saturada com solução de soro albumina bovina (BSA) a 1% p/v. A eluição foi feita com salina fisiológica até que o solvente se movesse 15 cm a partir da origem. A tira foi cortada em 15 segmentos de 1 cm e a radioatividade de cada um foi medida. Nesse sistema o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  e  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  migram com o solvente (RF 0,7 a 1,0) e o tecnécio hidrolizado ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ) permanece na origem. Determina-se assim o percentual de radioatividade correspondente ao tecnécio hidrolizado ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ) que não se incorporou na estrutura da proteína.



**Figura 1** – Representação esquemática dos sistemas cromatográficos utilizados para verificação do rendimento de marcação do soro antiescorpiônico ( $F(ab')_2$ ) com  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio. A – cromatografia ascendente utilizando placa de sílica gel 60 (10 x 1,0 cm) e acetona como eluente; B – cromatografia descendente utilizando papel Whatman nº1 (5 x 36 cm) e salina (NaCl 0,9% p/v) como eluente.

Com os resultados obtidos nos dois sistemas cromatográficos, determina-se a radioatividade incorporada às moléculas de  $F(ab')_2$  pela seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento de Marcação (\%)} = \frac{\text{cpm } ^{99m}\text{Tc} - F(ab')_2}{\text{Total cpm } (^{99m}\text{Tc} - F(ab')_2 + ^{99m}\text{TcO}_4^- + ^{99m}\text{TcO}_2)} \times 100$$

Onde: cpm = contagem por minuto

#### 4.2.3 Purificação do antiveneno escorpiónico marcado com $^{99m}\text{Tc}$

Para a utilização do soro marcado nos experimentos de biodistribuição fez-se necessária a retirada, ainda que parcial, dos contaminantes radioquímicos presentes no produto final após marcação. Para a retirada do tecnécio hidrolizado ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ), utilizou-se filtração em membrana de éster de celulose de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosidade (ARAUJO et al., 2002). Determinou-se o rendimento de marcação antes e após filtração para avaliação da eficiência da filtração.

#### 4.2.4 Avaliação da estabilidade *in vitro* do antiveneno escorpiónico marcado com $^{99m}\text{Tc}$

Para avaliar a estabilidade *in vitro*, após a marcação (ou seja verificar se o tecnécio não estava se desligando do fragmento  $F(ab')_2$ ), amostras de 500  $\mu\text{L}$  de soro marcado filtrado (n=6) foram incubadas em condições semelhantes às do sangue, em PBS pH 7,4 a 37  $^\circ\text{C}$ . Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  foram então retiradas nos tempos de 1, 4 e 24 h para determinação da porcentagem de marcação.

#### 4.2.5 Verificação da manutenção da atividade *in vivo* do antiveneno escorpiônico marcado com $^{99m}\text{Tc}$ Tecnécio

Para verificar se o processo de marcação com tecnécio afetou a atividade do antiveneno *in vivo*, utilizou-se teste de Potência, método descrito na Farmacopéia Brasileira – F. BRAS. IV (FARMACOPÉIA ..., 2003). O teste de potência objetiva determinar a dose neutralizante necessária (Dose Efetiva 50%) para proteger animais suscetíveis contra os efeitos letais de uma dose fixa de veneno de referência, neste caso, cinco vezes a Dose Letal 50% ( $DL_{50}$ ).

Diluições progressivas da amostra (soro marcado) em solução salina fisiológica a 0,85% p/v foram efetuadas utilizando fator de diluição constante de 1,25 de maneira que o volume final após a mistura com a dose desafio de veneno (5  $DL_{50}$ ) fosse idêntico em todos os tubos de ensaio e igual a 5 mL. Utilizou-se as mesmas doses (n=5) do teste de potência do mesmo lote de soro não marcado (38, 47, 59, 74, 93  $\mu\text{L}$ ). Considerou-se para o cálculo do volume de soro marcado que continham essas doses, a diluição anterior devido à adição dos agentes redutores, HCl 0,25 N para acerto do pH e de pertecnetato de sódio.

O veneno de referência foi reconstituído e diluído com solução salina fisiológica 0,85% p/v para a concentração de 1,0 mg/mL e adicionado em cada tubo mantendo seu volume constante, de modo que cada dose a ser inoculada por animal contivesse 5  $DL_{50}$ . A mistura foi homogeneizada e incubada a 37 °C por 30 minutos.

Inoculou-se por via intraperitoneal 0,5 mL de cada mistura, em cada camundongo em grupos de oito. Observou-se os animais até 48 horas após a inoculação e registrou-se o número de vivos em cada mistura. Calculou-se a Dose Efetiva 50% ( $DE_{50}$ ) por meio da análise de probitos (FINNEY, 1978), e as equações das retas (log dose vs probito) foram calculadas pelo método dos quadrados mínimos. Calculou-se a potência em miligramas por mililitro, utilizando a equação:

$$\text{Potência (mg/mL)} = \frac{T_v - 1}{DE_{50}} \times DL_{50}$$

Onde:  $T_v$  = número de  $DL_{50}$  utilizadas por camundongo

O título da potência é expresso em miligramas de veneno neutralizados por 1 mL da amostra. Todos os cálculos foram realizados utilizando software desenvolvido pela Funed.

Um grupo de camundongos ( $n = 8$ ) foi injetado com a mistura de reagentes utilizados na marcação no mesmo volume administrado aos camundongos que receberam o veneno e o antiveneno marcado (0,5 mL) por via intraperitoneal.

Camundongos ( $n = 5$ ) também foram injetados por via intraperitoneal com veneno escorpiónico referência, utilizado nos testes de potência como controle do veneno.



#### 4.2.6 Verificação da manutenção da imunorreatividade *in vitro* do antiveneno escorpiónico marcado com $^{99m}\text{Tc}$

Para verificar *in vitro*, se o processo de marcação com tecnécio afetou a imunorreatividade do antiveneno, utilizou-se cromatografia de imunoafinidade. Verificou-se a capacidade da  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  de se ligar ao antígeno imobilizado (veneno escorpiónico total).

Uma coluna de Sepharose® 4B acoplada a 10 mg de veneno escorpiónico total foi utilizada. Acoplou-se o veneno, após ter sido dissolvido em tampão carbonato-bicarbonato pH 8,5, à 1 g de Sepharose® 4B sob agitação de 2 horas. Etanolamina 1,0 M pH 9,0 foi utilizada para bloquear os sítios da Sepharose® 4B que não acoplaram-se ao veneno e para evitar que o antiveneno se ligasse aos sítios inespecíficos.

Após aplicação de 2 mL de soro antiescorpiónico marcado com  $^{99m}\text{Tc}$ , a coluna foi incubada por 1 h sob refrigeração em repouso. Aplicou-se também na coluna, nas mesmas condições do soro marcado, o soro não marcado, para verificar se a marcação alterava o perfil de eluição do soro na coluna.

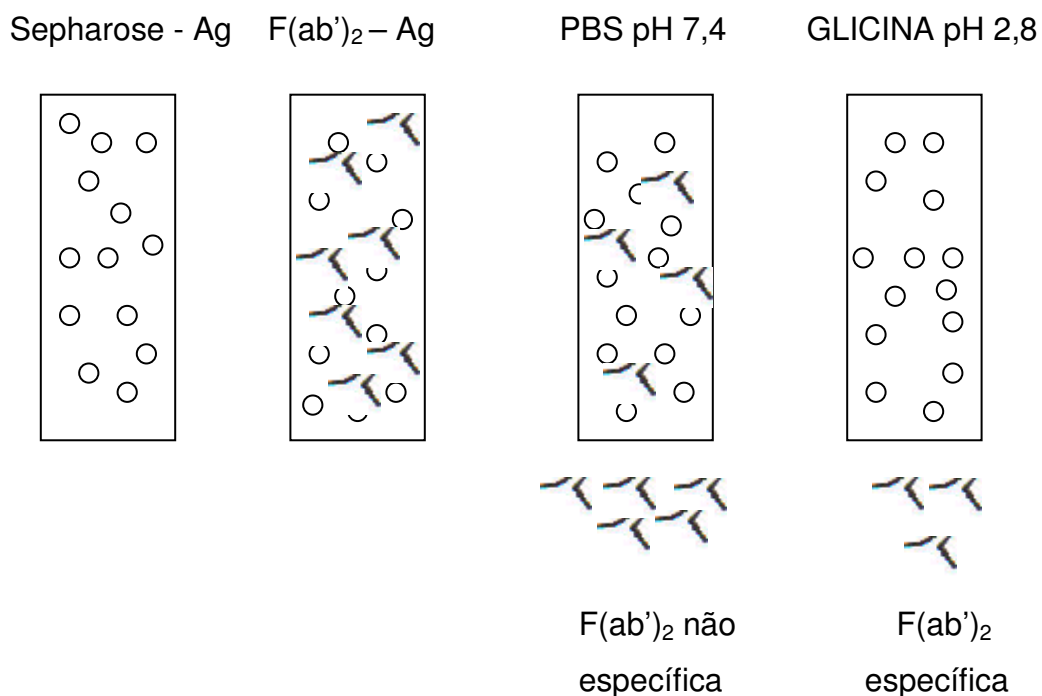
Após incubação, a coluna foi eluída com tampão fosfato (PBS) isotônico pH 7,4, com o objetivo de retirar a  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  que não se ligou (não específica) ao veneno. Em seguida, as moléculas que se ligaram especificamente aos antígenos imobilizados na coluna, foram removidas com tampão glicina 0,2 M pH 2,8 (Figura 2) e o pH foi neutralizado imediatamente com NaOH 1,0 M. Foram recolhidas da coluna, frações de 1 mL (15 frações com PBS e 15 frações com glicina) e foram medidas a radioatividade e a absorvância a 280 nm de cada uma para o soro marcado e a absorvância a 280 nm para o soro não marcado.

A concentração de proteína total nas frações foi estimada por meio dos valores obtidos de absorvância a 280 nm, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Proteína (mg/mL)} = \frac{A_{280}}{1,13}$$

Onde:  $A_{280}$  = a leitura de absorvância a 280 nm; 1,13 = fator de correspondência da proteína em unidades de absorvância por mg/mL

O fator de correspondência da proteína foi obtido pela lei de Beer por meio da correlação da absorvância a 280 nm e a determinação pelo método de Lowry modificado (HARTREE, 1972) do teor de proteína das frações, tendo como padrão a albumina sérica bovina.



**Figura 2** – Representação esquemática da cromatografia de imunoafinidade com uma coluna de Sepharose® acoplada a veneno escorpionic total (Ag) utilizada para verificar se a marcação com  $^{99m}Tc$  não afetou a imunorreatividade da  $F(ab')_2$ .

#### 4.2.7 Eletroforeses

Para avaliação da pureza do soro antiescorpiônico utilizado na marcação e determinação da integridade do anticorpo marcado e das frações recolhidas da coluna de imunoafinidade foi realizado ensaio de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) sob condições não redutoras e sob condições redutoras.

Comparou-se o perfil eletroforético das amostras, com  $F(ab')_2$  antiescorpiônica purificada por coluna Proteína A-Sepharose CL-4B, utilizada como padrão, fornecida pelo Laboratório de Bioquímica e Imunologia do ICB, anticorpo padrão inteiro (IgG) fornecido por Nanocore Biotecnologia Ltda e padrão de peso molecular (14,4-97,0 KDa).

Alíquotas das amostras contendo cerca de 50  $\mu$ g de proteína total foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10 % sob condições redutoras e a 7,5% sob condições não redutoras. A corrida foi realizada a 60-80 V durante cerca de 4 horas e os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue.

#### 4.2.8 Biodistribuição das frações específicas do soro antiescorpiônico marcado com $^{99m}\text{Tc}$ em ratos de 21- 22 dias após administração intravenosa (IV)

Após a passagem do soro antiescorpiônico marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  pela coluna de imunoafinidade, o “pool” das frações de interesse, eluídas com glicina, foram injetadas nos animais. Foram utilizados de quatro a oito animais por grupo e cada animal recebeu por via IV, na veia da cauda, aproximadamente 0,27 mg de proteína com atividade específica de 0,06 MBq.

Os ratos foram anestesiados com uretana (140 mg por 100 g de peso, por via intraperitoneal) antes de serem sacrificados. Aos 5, 60, 180, 360, 720 e 1440 minutos, após a injeção do soro, os animais foram sacrificados coletando-se o sangue do plexo braquial. Utilizou-se como anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na concentração de 0,05 M. Os seguintes órgãos foram retirados: cérebro, coração, tireóide, pulmão, baço, rins e fígado.

Os órgãos foram lavados com água e secos entre dois papéis de filtro. Em seguida foram pesados. A radioatividade presente nos órgãos e no sangue foi medida em cintilador automático e os resultados foram expressos como um percentual da dose injetada por g de tecido ou mL de sangue. A radioatividade presente na dose exata injetada foi considerada como sendo 100% (padrão de dose). A cada tempo de leitura, além da radioatividade das amostras biológicas, também a do padrão de dose foi obtida. Corrigiu-se, assim, diferenças devido ao decaimento da radioatividade, tendo em vista a meia vida relativamente curta do  $^{99m}\text{Tecnécio}$  ( $T_{1/2} = 6$  horas).

As médias das % da dose por g e por mL de sangue foram obtidas e foram calculados os desvios padrão (DP).

Os resultados foram expressos por meio dos parâmetros AUC, Kp e  $t_{\text{máx}}$  (tempo onde ocorre a concentração máxima). O coeficiente de partição tecido-sangue (Kp) foi calculado utilizando a relação entre a área sob a curva (AUC) da concentração tecidual vs tempo (0 - 24 h) para cada órgão e a área sob a curva da concentração sangüínea vs tempo (0 - 24 h).

#### 4.2.9 Análise estatística

Utilizou-se o programa GraphPad Prism (Versão 4.03) para realização do teste t de Student, ANOVA de uma classificação (com pós teste de Tukey) e para obter os valores de área sob a curva da radioatividade tecidual e no sangue de 0 - 24 h ( $AUC_{0-24h}$ ).

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ . Utilizou-se o teste ANOVA para escolha da condição de marcação que apresentou maior rendimento, para avaliação da estabilidade do soro marcado e para comparação dos valores de % da dose por g ou por mL entre os tempos de cada órgão no ensaio de biodistribuição. O teste t foi utilizado para verificar a eficiência da filtração em membrana de éster de celulose, após marcação.

Para comparação dos valores de potência do antiveneno marcado e não marcado, utilizou-se teste de  $\chi^2$  ( $p = 0,05$ ) da F. BRAS. IV (FARMACOPÉIA ..., 2003).

Verificou-se a presença de valores aberrantes nos dados de rendimento de marcação e de biodistribuição utilizando o teste de valores aberrantes da F. BRAS. IV (FARMACOPÉIA ..., 2003).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Otimização das condições de marcação do antiveneno escorpiônico com $^{99m}\text{Tc}$

A otimização da marcação do antiveneno escorpiônico (fração  $\text{F(ab')}_2$ ) produzido pela Funed com  $^{99m}\text{Tc}$  foi realizada mantendo o pH em 7,0, a atividade do  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  em 18,5 MBq e o tempo de incubação em 20 minutos. Variou-se as massas de proteína do soro antiescorpiônico (15,57 a 36,33 mg de proteína), de  $\text{SnCl}_2$  ( 0 a 80  $\mu\text{g}$ ) e de  $\text{NaBH}_4$  (0 a 400  $\mu\text{g}$ ). As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam os rendimentos de marcação do antiveneno escorpiônico com  $^{99m}\text{Tc}$  após filtração sob influência das variações das massas de proteína do soro e dos agentes redutores.

**Tabela 1** – Influência da massa de proteína do soro antiescorpiônico sobre o rendimento de marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ . Os valores de % marcação são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão, (n=3) para cada valor de massa estudado (p>0,05).

Proteína (mg)	$\text{SnCl}_2$ ( $\mu\text{g}$ )	$\text{NaBH}_4$ ( $\mu\text{g}$ )	% Marcação
15,57	40	300	93,65 $\pm$ 3,07 <sup>a</sup>
20,76	40	300	96,16 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>
25,95	40	300	98,32 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>
31,14	40	300	94,75 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>
36,33	40	300	95,82 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>

**Tabela 2** – Influência da massa de borohidreto de sódio sobre o rendimento de marcação do soro antiescorpiônico com  $^{99m}\text{Tc}$ . Os valores de % marcação são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão, (n=3) para cada valor de massa estudado ( $p < 0,05$ ). Letras distintas indicam diferenças estatísticas significantes.

Proteína (mg)	SnCl <sub>2</sub> (μg)	NaBH <sub>4</sub> (μg)	% Marcação
25,95	40	200	95,96 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
25,95	40	300	98,32 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>
25,95	40	400	87,10 $\pm$ 2,39 <sup>b</sup>
25,95	40	-	72,42 $\pm$ 5,17 <sup>c</sup>

**Tabela 3** – Influência da massa de cloreto estanoso sobre o rendimento de marcação do soro antiescorpiônico com  $^{99m}\text{Tc}$ . Os valores de % marcação são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão, (n=3) para cada valor de massa estudado ( $p > 0,05$ ).

Proteína (mg)	SnCl <sub>2</sub> (μg)	NaBH <sub>4</sub> (μg)	% Marcação
25,95	20	300	91,60 $\pm$ 5,51 <sup>a</sup>
25,95	40	300	98,32 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>
25,95	80	300	89,64 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup>
25,95	-	300	90,97 $\pm$ 3,39 <sup>a</sup>

Os rendimentos de marcação do soro antiescorpiônico não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) para massas de proteína variando entre 15,57 a 36,33 mg na presença de quantidades fixas dos agentes redutores (40  $\mu\text{g}$  de  $\text{SnCl}_2$  e 300  $\mu\text{g}$  de  $\text{NaBH}_4$ ).

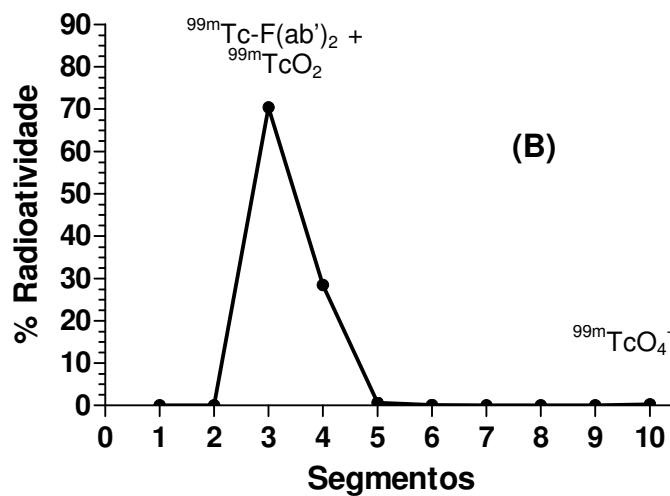
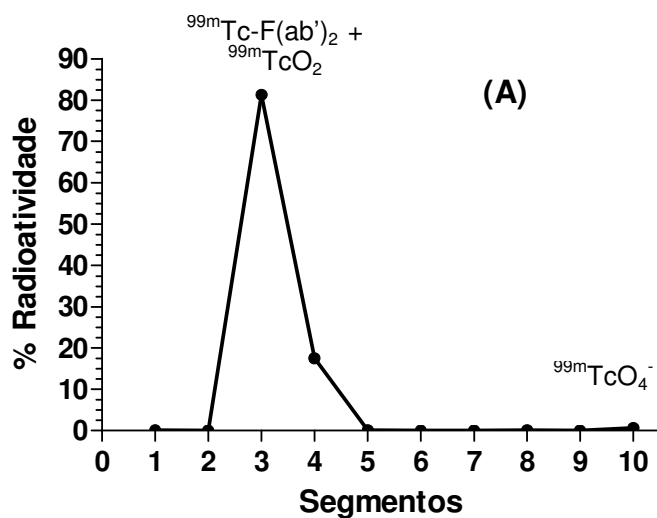
Massas de  $\text{SnCl}_2$  variando entre 0 a 80  $\mu\text{g}$  na presença de 300  $\mu\text{g}$  de  $\text{NaBH}_4$  ou massas de 200 ou 300  $\mu\text{g}$  de  $\text{NaBH}_4$  na presença de 40  $\mu\text{g}$  de  $\text{SnCl}_2$  não alteraram significativamente ( $p>0,05$ ) o rendimento de marcação do soro antiescorpiônico. Entretanto, houve diminuição estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) no rendimento de marcação quando aumentou-se a massa de  $\text{NaBH}_4$  para 400  $\mu\text{g}$  ou quando somente o  $\text{SnCl}_2$  e nada de  $\text{NaBH}_4$ , estava presente como agente redutor na mistura de reação.

Porém, apesar de não haver significância estatística, verificou-se uma tendência de maior rendimento de marcação sob as condições que se seguem: 25,95 mg de proteína do soro antiescorpiônico, 40  $\mu\text{g}$  de  $\text{SnCl}_2$  e 300  $\mu\text{g}$  de  $\text{NaBH}_4$ , para uma atividade fixa de 18,5 MBq de  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ , pH 7,0 e o tempo de incubação da reação de 20 minutos. Nessas condições, foi obtido um rendimento de marcação do soro antiescorpiônico com  $^{99\text{m}}\text{Tecnécio}$  de  $98,32\pm 0,69\%$  ( $n=3$ ) após purificação.

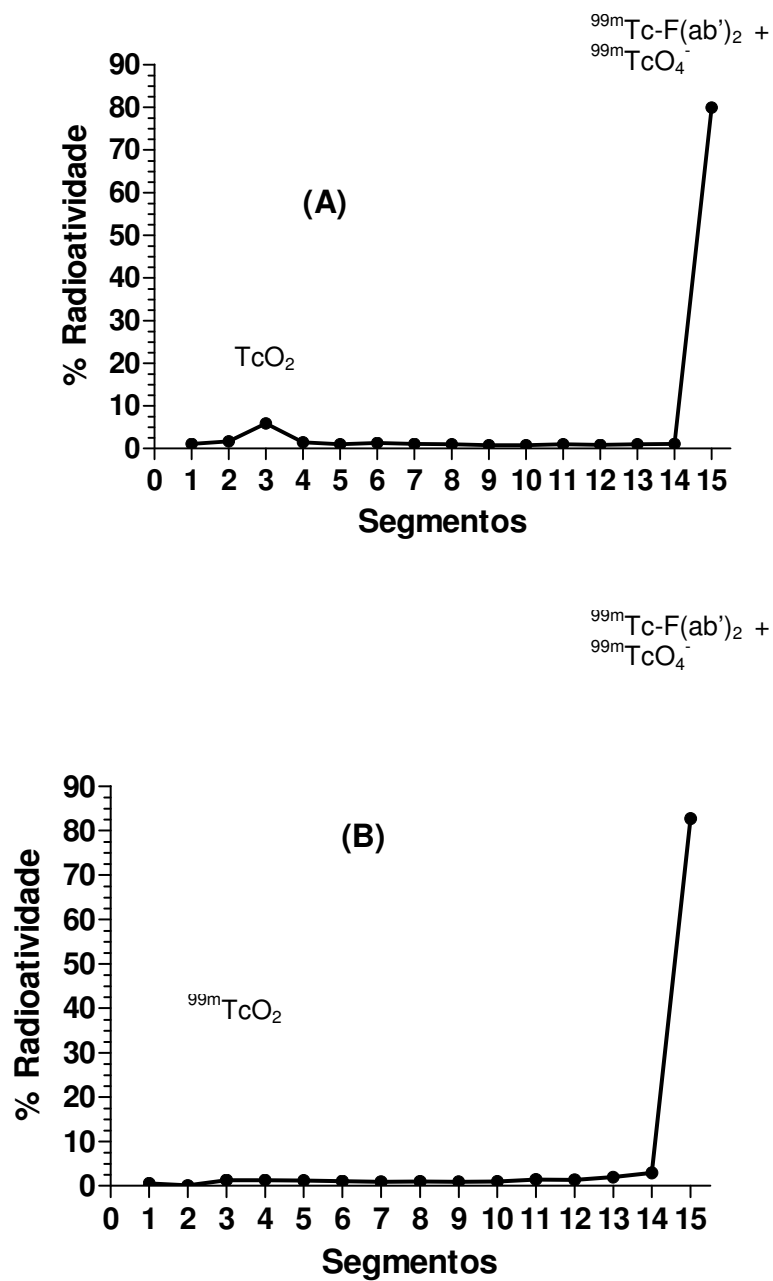
## 5.2 Perfil cromatográfico da $^{99\text{m}}\text{Tc-F(ab')}_2$

A cromatografia ascendente teve como finalidade determinar o percentual de tecnécio livre ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) que não foi reduzido pelos agentes redutores e a descendente determinar o percentual de tecnécio que foi reduzido, mas não se incorporou na molécula de proteína e foi hidrolizado ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ ) (Figura 1). As Figuras 3 e 4 apresentam o perfil cromatográfico de  $^{99\text{m}}\text{Tc-F(ab')}_2$  em sílica-gel 60 (cromatografia ascendente) e em papel Whatman n°1 (cromatografia descendente) antes e após filtração em membrana de éster de celulose.





**Figura 3** - Perfil cromatográfico de  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  antiescorpiônico em sílica-gel 60 (cromatografia ascendente) antes (A) e após filtração (B) em membrana de éster de celulose.



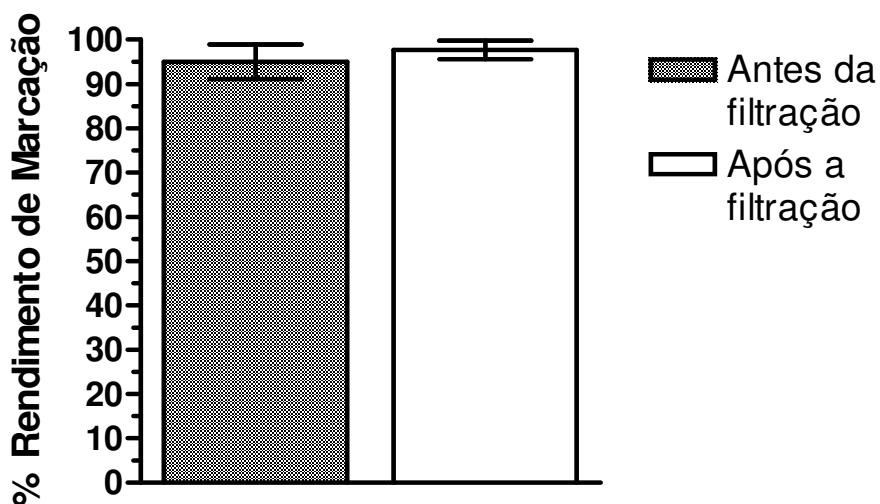
**Figura 4** - Perfil cromatográfico de  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  antiescorpiônico em papel Whatman nº1 (cromatografia descendente) antes (A) e após filtração (B) em membrana de éster de celulose.

No método da cromatografia ascendente em sílica-gel 60, utilizando a acetona como eluente, o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  migrou na sílica juntamente com o solvente. Observa-se pela Figura 3 que o percentual de radioatividade no pico formado entre os segmentos 2 a 5 corresponde à  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  e ao tecnécio hidrolizado ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ). O insignificante pico formado no segmento 10 corresponde ao tecnécio livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ). O percentual de radioatividade dos segmentos 2 ao 5 antes da filtração corresponde a 99,0% e depois da filtração a 99,5% de toda a radioatividade presente na fita de sílica. O segmento 10 apresenta 0,6% e 0,2% do percentual total de radioatividade na fita antes e depois da filtração respectivamente. A filtração não alterou o perfil cromatográfico da  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  em sílica-gel 60.

Com o procedimento da cromatografia descendente, foi possível determinar o percentual de tecnécio hidrolizado ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ), já que o mesmo permaneceu no ponto de aplicação enquanto a  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  e o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  migravam na fita de papel Whatman. A Figura 4 A mostra que o pico formado entre os segmentos 2 a 5 corresponde a aproximadamente 10,0% de toda a radioatividade presente na fita de papel Whatman, enquanto que no segmento 15, tem-se 80,0% do percentual da radioatividade. Após filtração (Figura 4 B) o percentual de radioatividade do pico formado entre os segmentos 2 a 5, correspondente ao  $^{99m}\text{TcO}_2$  diminuiu para 4,0% e o percentual de radioatividade devido somente a  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  praticamente (segmento 15), já que o percentual de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  foi insignificante como visto na Figura 3, aumentou para 85,0%.

### **5.3 Eficiência da filtração do antiveneno escorpionico marcado com $^{99m}\text{Tc}$ em membrana de éster de celulose**

Observa-se pela Figura 5 que o processo de filtração da  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  em membrana de éster de celulose de 0,22  $\mu\text{m}$  se mostrou eficaz, aumentando significativamente o rendimento de marcação de  $94,95 \pm 3,86\%$  para  $97,65 \pm 2,12\%$ , devido à retirada de parte do  $^{99m}\text{TcO}_2$ .



**Figura 5** – Rendimento de marcação do soro antiescorpiônico com  $^{99m}\text{Tc}$  antes e após filtração. Cada coluna representa a média  $\pm$  desvio padrão,  $n=28$  ( $p<0,0001$ ).

#### 5.4 Estabilidade *in vitro* do antiveneno escorpiano marcado com $^{99m}\text{Tc}$

Com o objetivo de avaliar a estabilidade do soro após a marcação em condições semelhantes às do sangue, amostras de soro marcado filtrado foram incubadas com PBS pH 7,4 a 37°C. Depois de realizadas cromatografias nos tempos de 1, 4 e 24 h após incubação, o rendimento de marcação não apresentou diferenças estatisticamente significativas nesses tempos (Tabela 4), mostrando que a estabilidade de  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  foi preservada dentro do período observado.

**Tabela 4** – Estabilidade do soro após marcação em PBS pH 7,4 a 37°C. Os valores de % marcação são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão, n=6 ( $p>0,05$ ).

Tempo (h)	% Marcação
0	92,61 $\pm$ 5,33 <sup>a</sup>
1	93,56 $\pm$ 2,46 <sup>a</sup>
4	96,15 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup>
24	95,61 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup>

### 5.5 Manutenção da atividade *in vivo* do antiveneno escorpionico marcado com <sup>99m</sup>Tecnécio

Para verificar se a marcação com <sup>99m</sup>Tc não afetou a atividade biológica do antiveneno escorpionico, realizou-se estudo *in vivo*, (teste de potência). Comparou-se o valor obtido no teste de potência para o soro marcado com o valor do teste de potência realizado pelo Controle Biológico da Funed para o mesmo lote de soro não marcado.

Não foi observada diferença entre o valor de potência encontrado para o soro marcado (1,12 mg/mL), e o valor para o soro não marcado (1,21 mg/mL), utilizando teste de  $\chi^2$  ( $p=0,05$ ).

Os cálculos e os parâmetros estatísticos para o teste de potência do soro marcado, como para o teste de potência do soro não marcado, se encontram descritos nos Anexos B e C.

Não se observou morte no grupo de camundongos (n = 8) que foi injetado com a mistura de reagentes utilizados na marcação, indicando a não influência dos mesmos na morte dos animais utilizados no teste de potência.

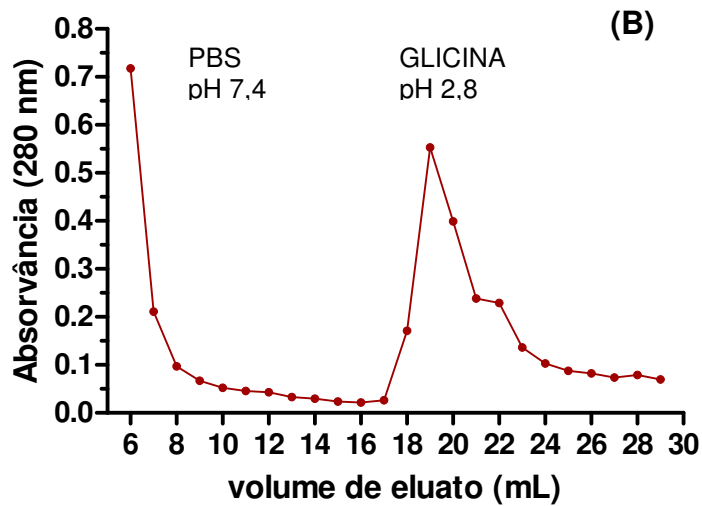
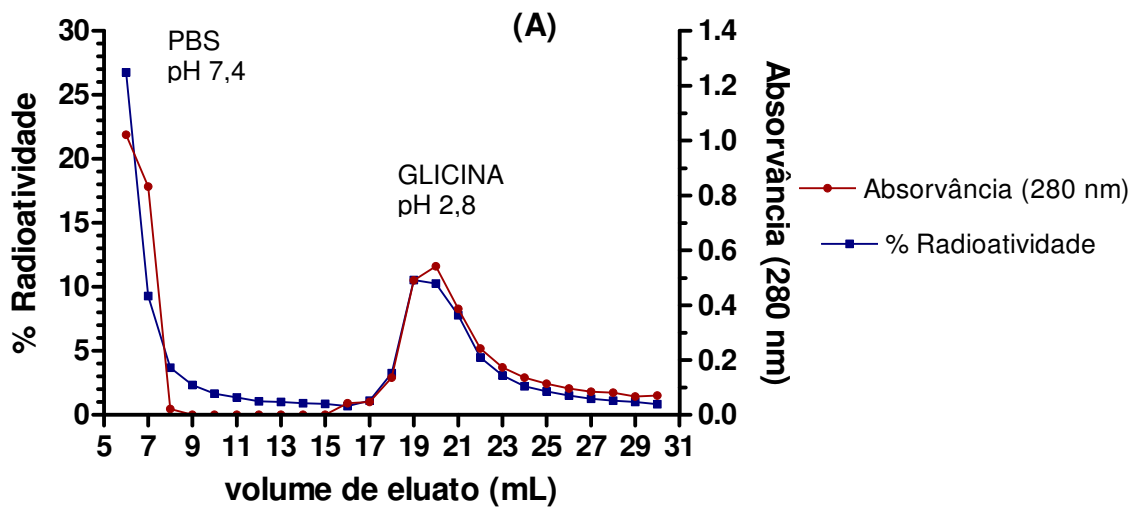
O grupo de camundongos (n = 5) que foram injetados por via intraperitoneal com o veneno escorpiônico referência utilizado nos testes de potência, apresentaram sinais de intoxicação escorpiônica aguda e morte.

### 5.6 Teste *in vitro* da imunorreatividade da $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$

Para verificar se a marcação com  $^{99m}\text{Tc}$  não afetou a imunorreatividade do antiveneno escorpiônico, a mesma foi verificada *in vitro* por meio de cromatografia de imunoafinidade, com veneno escorpiônico total imobilizado.

Foram plotadas no gráfico as frações que apresentavam valores de radioatividade e absorvância a 280nm (Figura 6). Com PBS foram eluídas as proteínas do antiveneno não específicas ao antígeno e as impurezas radioquímicas ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$  e  $^{99m}\text{TcO}_2$ ) e com glicina as proteínas específicas ao antígeno (veneno escorpiônico total). Observou-se que houve maior coincidência dos picos de radioatividade e de absorvância nas frações eluídas com glicina, quando comparadas com as eluídas com PBS, o que indica que toda a radioatividade dessas frações está associada à proteína (F(ab')<sub>2</sub>). Ficou demonstrado que a  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  é capaz de se ligar ao antígeno específico e que após marcação o perfil do soro na coluna de imunoafinidade não foi modificado (Figura 6 B).

As frações específicas 17 a 25 apresentaram 45% do total de radioatividade eluída e 2,0 mg de proteína (estimada pelos valores de absorvância) para o soro marcado e 1,7 mg de proteína para o soro não marcado.



**Figura 6** – Perfil do soro antiescorpiônico marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  (A) e não marcado (B) em coluna de imunoafinidade (Sephacrose® acoplada a veneno escorpiônico total).

## 5.7 Eletroforeses

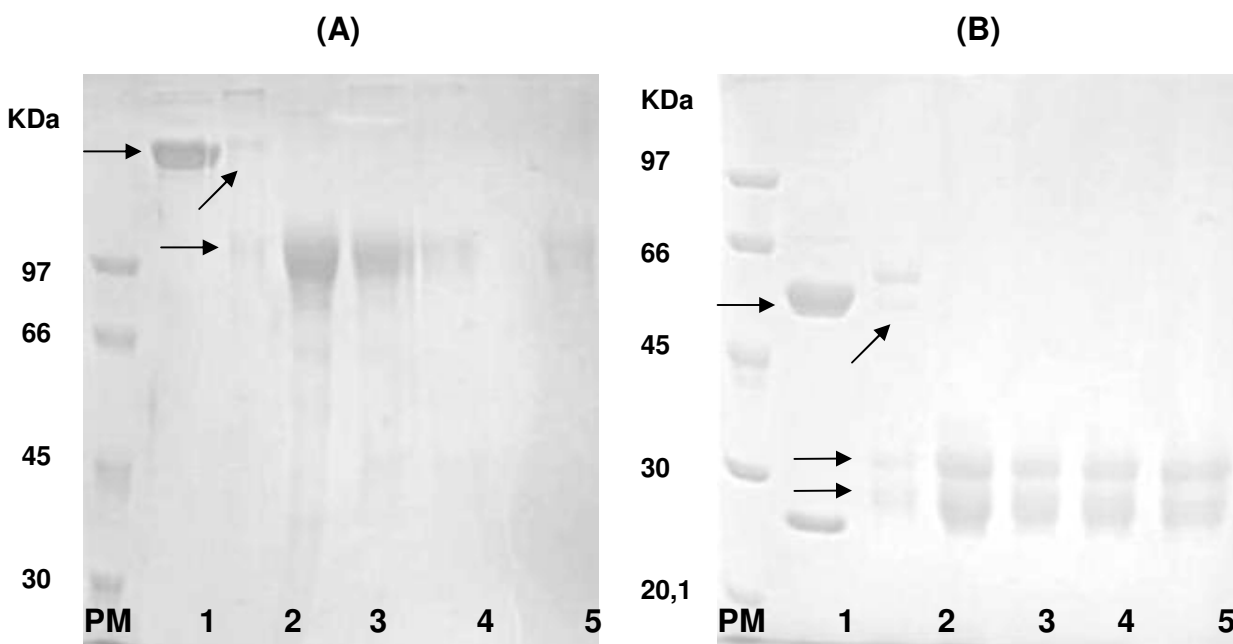
Na Figura 7 estão apresentados os perfis eletroforéticos em SDS-PAGE sob condições não redutoras e sob condições redutoras das amostras seguintes: soro antiescorpiônico marcado com  $^{99m}\text{Tc}$ , soro antiescorpiônico do mesmo lote não marcado,  $\text{F(ab')}_2$  purificada, frações coletadas da coluna de imunoafinidade com PBS e glicina após aplicação do soro marcado, anticorpo íntegro (IgG) e padrão de peso molecular (14,4-97,0 KDa).

As amostras de soro antiescorpiônico da Funed apresentaram uma única banda (seta) que corresponde a porção  $\text{F(ab')}_2$  com  $\text{MM} \cong 90\text{-}100$  KDa sob condições não redutoras e duas bandas (setas), ambas ao redor de 30 KDa, sob condições redutoras. Não se detectou outras bandas de proteína, o que indica eficiência do processo de digestão péptica e alta pureza do produto, sem contaminação com outros componentes séricos.

O soro marcado, assim como as frações retiradas da coluna de imunoafinidade, apresentaram perfis eletroforéticos iguais a do soro não marcado e da  $\text{F(ab')}_2$  purificada, o que demonstra que a marcação não afetou a integridade da  $\text{F(ab')}_2$ . Também não houve diferença na mobilidade relativa entre as amostras marcadas e não marcadas, o que sugere que o processo de marcação não alterou a conformação molecular da  $\text{F(ab')}_2$ .

A  $\text{F(ab')}_2$  purificada, na eletroforese sob condições redutoras, apresentou além das duas bandas correspondentes à  $\text{F(ab')}_2$ , duas bandas fracas de proteína entre 45 e 66 KDa, e na eletroforese sob condições não redutoras, duas bandas acima de 97 KDa, além daquela que corresponde à  $\text{F(ab')}_2$ , o que indica que a mesma não estava totalmente pura. Duas dessas bandas (setas) têm correspondência no perfil eletroforético do anticorpo íntegro (IgG).





**Figura 7** - Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras (A) e sob condições redutoras (B). Canaletas: **1**: anticorpo íntegro (IgG); **2**: F(ab')<sub>2</sub> purificada; **3**: soro antiescorpiônico não marcado; **4**: soro antiescorpiônico do mesmo lote marcado com <sup>99m</sup>Tc; **5**: frações coletadas da coluna de imunoafinidade com PBS; **6**: frações coletadas da coluna de imunoafinidade com glicina e **PM**: padrão de peso molecular (14,4-97,0 KDa).

### 5.8 Biodistribuição das frações específicas do soro antiescorpiônico marcado com <sup>99m</sup>Tecnécio em ratos de 21- 22 dias após administração intravenosa (IV)

Os estudos de biodistribuição foram realizados utilizando as frações 19-21 (“pool”) eluídas com glicina da coluna de imunoafinidade (proteínas específicas ao antígeno). Cada animal recebeu por via IV, aproximadamente 0,27 mg de proteína com atividade específica de 0,06 MBq. A distribuição da <sup>99m</sup>Tc-F(ab')<sub>2</sub> nos órgãos de ratos de 21-22 dias em função do tempo pode ser vista na Tabela 5.

**Tabela 5** – Biodistribuição da  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  específica (% da dose injetada por g de órgão) em ratos de 21-22 dias após injeção IV. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP. Letras distintas indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ).

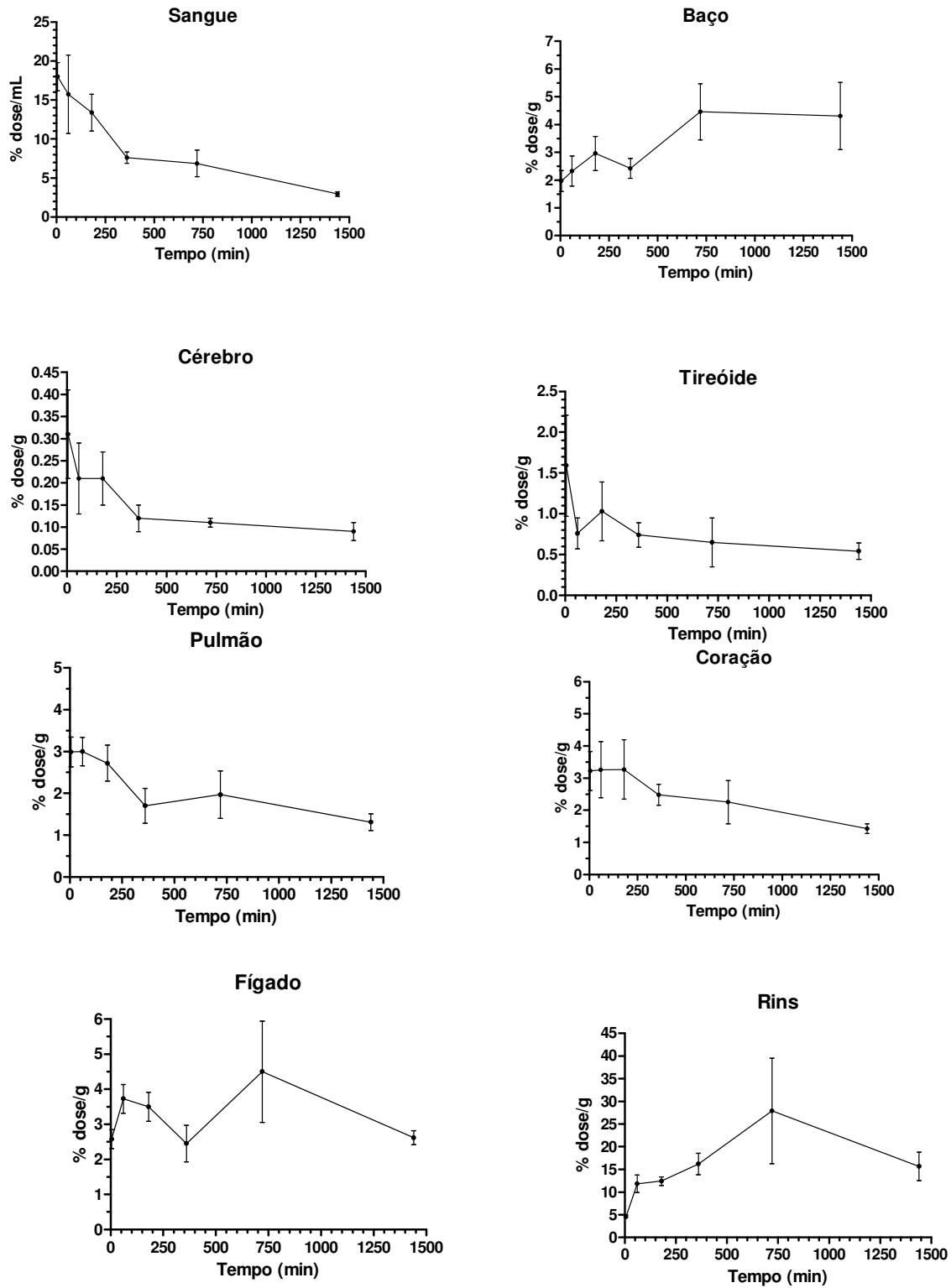
Órgão	Tempo (minutos)					
	5	60	180	360	720	1440
Sangue (% dose/mL)	18,00 <sup>a</sup>	15,74 <sup>a, b</sup>	13,38 <sup>b</sup>	7,61 <sup>c</sup>	6,87 <sup>c</sup>	2,96 <sup>c</sup>
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	1,80	5,02	2,36	0,71	1,70	0,31
Baço	1,97 <sup>a</sup>	2,32 <sup>a</sup>	2,96 <sup>a, b</sup>	2,42 <sup>a</sup>	4,46 <sup>c</sup>	4,31 <sup>b, c</sup>
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0,38	0,54	0,61	0,36	1,01	1,21
Cérebro	0,31 <sup>a</sup>	0,21 <sup>a, b, c</sup>	0,21 <sup>a, b</sup>	0,12 <sup>b, c</sup>	0,11 <sup>b, c</sup>	0,09 <sup>c</sup>
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0,10	0,08	0,06	0,03	0,01	0,02
Tireóide	1,59 <sup>a</sup>	0,76 <sup>b</sup>	1,03 <sup>a, b</sup>	0,74 <sup>b</sup>	0,65 <sup>b</sup>	0,54 <sup>b</sup>
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0,62	0,19	0,36	0,15	0,30	0,10
Coração	3,22 <sup>a</sup>	3,26 <sup>a</sup>	3,27 <sup>a</sup>	2,48 <sup>a, b</sup>	2,25 <sup>a, b</sup>	1,43 <sup>b</sup>
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0,61	0,87	0,92	0,33	0,67	0,15
Pulmão	2,99 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup>	1,70 <sup>b</sup>	1,97 <sup>b</sup>	1,31 <sup>b</sup>
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0,36	0,34	0,43	0,42	0,57	0,20
Fígado	2,58 <sup>a</sup>	3,73 <sup>a, b</sup>	3,50 <sup>a, b</sup>	2,45 <sup>a</sup>	4,50 <sup>b</sup>	2,62 <sup>a</sup>
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0,27	0,41	0,41	0,52	1,44	0,20
Rins	4,53 <sup>a</sup>	11,82 <sup>a, b</sup>	12,42 <sup>a, b</sup>	16,18 <sup>b</sup>	27,87 <sup>c</sup>	15,65 <sup>b</sup>
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0,43	1,95	0,96	2,37	11,64	3,13
<b>n</b>	5	4	8	4	5	4

A maior captação foi observada nos rins aos 720 minutos (12h) após a injeção. As segundas maiores captações foram no fígado e baço que também apresentaram captação máxima aos 720 minutos. Seguem-se a essas, as captações observadas no pulmão e coração com captação máxima aos 5 minutos e as captações na tireóide e cérebro, também com captação máxima aos 5 minutos.

Observou-se que no período de 5 a 180 minutos o sangue apresentou concentrações maiores de  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  que todos os órgãos e que somente os rins apresentaram concentração maior que a do sangue nos tempos de 360 e 720 minutos. No tempo de 1440 minutos, além dos rins, também o baço apresentou concentração maior que a do sangue. Nenhum outro órgão, além dos rins e baço, apresentou concentrações de  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  maiores que a do sangue nos tempos estudados.

No sangue, coração e pulmão, a concentração de  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  permaneceu constante de 5 minutos a 3 horas, apresentando um decaimento entre 3 e 6 horas e continuando constante de 6 a 24 horas. No baço, a concentração foi constante durante 5 minutos a 6 horas, aumentando após esse tempo e não apresentando decaimento até 24 horas. O cérebro apresentou concentração de  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  praticamente constante durante os tempos estudados, com decaimento estatisticamente significativo somente após 12 horas. Na tireóide, houve um decaimento estatisticamente significativo após 5 minutos e a concentração permaneceu constante até às 24 horas. O fígado e os rins apresentaram perfil de captação de  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  parecidos, com concentração praticamente constante até 6 horas com captação máxima estatisticamente significativa no tempo de 12 horas e voltando a decair após esse tempo.

A Figura 8 apresenta o perfil de captação de cada órgão em relação ao tempo (minutos). Os resultados foram expressos como % da dose injetada (radioatividade)/g de órgão. Na Tabela 6 estão os valores de área sob a curva da radioatividade tecidual e no sangue de 0 - 24 h ( $\text{AUC}_{0-24\text{ h}}$ ).



**Figura 8** – Captação da  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  específica ao antígeno (% dose/g de órgão) em ratos de 21-22 dias após injeção intravenosa. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

**Tabela 6** – Valores de área sob a curva da radioatividade tecidual e no sangue de 0 - 24 h ( $AUC_{0-24\text{ h}}$ ) após injeção intravenosa da  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  específica ao antígeno.

Órgão	$AUC_{0-24\text{ h}}$ (% dose/g.min)
Sangue (%dose/mL.min)	10709
Baço	5315
Cérebro	182,6
Tireóide	1010
Coração	3264
Pulmão	2747
Fígado	4957
Rins	28074

Os rins apresentaram o maior valor de  $AUC_{0-24\text{ h}}$ , seguidos do sangue, baço, fígado, coração, pulmão, tireóide e cérebro. As  $AUC_{0-24\text{ h}}$  dos rins e sangue foram bem maiores e a do cérebro bem menor quando comparadas com as dos outros órgãos. O fígado e o baço apresentaram valores parecidos de  $AUC_{0-24\text{ h}}$ , assim como o coração e o pulmão.

Os coeficientes de partição tecido-sangue ( $K_p$ ), calculados pela relação entre as áreas sob as curvas tecidos e sangue, estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7** – Coeficientes de partição tecido-sangue (Kp) para órgãos de ratos 21-22 dias após injeção intravenosa da  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  específica ao antígeno.

<b>Órgão</b>	<b>Kp</b>
Baço	0,49
Cérebro	0,02
Tireóide	0,09
Coração	0,30
Pulmão	0,26
Fígado	0,46
Rins	2,62

O único órgão que apresentou valor de Kp maior que 1 foi o rim. Para todos os outros órgãos, os valores de Kp encontrados foram menores que 1.

## 6 DISCUSSÃO

Acidentes escorpiônicos são freqüentes no Brasil e constituem problema de saúde pública. O *Tityus serrulatus* é a principal espécie escorpiônica responsável pela maioria dos acidentes graves, ocorridos especialmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo (LUCAS; SILVA-JÚNIOR, 1992). Seu veneno é constituído por várias proteínas básicas de baixo peso molecular. Dentre elas destaca-se a tityustoxina, considerada a mais tóxica presente no veneno quando injetada por via periférica (KALAPOTHAKIS; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, 1997).

Veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, bem como veneno de outras espécies escorpiônicas, têm mostrado ser mais deletério para crianças que para adultos (AMITAI et al., 1985; SOFER; GUERON, 1988; ISMAIL; ABD-ELSALAM; MURAD, 1990; AMARAL; REZENDE; FREIRE-MAIA, 1993; AMARAL et al., 1994; CUPO et al., 1994; BUCARETCHI et al., 1995; REZENDE et al., 1995; REZENDE; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI; AMARAL, 1996; REZENDE; AMARAL; FREIRE-MAIA, 1998).

O tratamento do envenenamento escorpiônico consiste na utilização de terapia com o soro imune, de suporte sintomático e monitoramento das funções vitais. Existem controvérsias a respeito da eficácia do soro antiescorpiônico e não são raros os relatos de casos de crianças que, mesmo recebendo o tratamento recomendado pelos órgãos de saúde, acabam falecendo.

Estudos têm demonstrado diferenças nos parâmetros farmacocinéticos e de biodistribuição entre antivenenos e venenos escorpiônicos. Absorção do antiveneno é menor, como também sua distribuição do sangue para os tecidos comparado com o veneno. Os estudos de farmacocinética e biodistribuição do antiveneno escorpiônico têm sido realizados em modelos experimentais usando animais adultos, apesar de acidentes escorpiônicos graves estarem associados mais freqüentemente com crianças (ISMAIL et al., 1983; SANTANA et al., 1996; ISMAIL; ABD-ELSALAM, 1998).

Considerando que em ratos jovens a distribuição da toxina escorpiônica (tityustoxina) é modificada comparada a ratos adultos (NUNAN et al., 2003) e a ausência de informações sobre a biodistribuição do antiveneno escorpiônico em animais jovens, investigou-se a biodistribuição do soro antiescorpiônico em ratos de 21-22 dias. Utilizou-se o antiveneno escorpiônico (fragmento  $F(ab')_2$ ) marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  para quantificar, por meio da radioatividade, sua concentração no organismo.

Inicialmente, foi necessário estabelecer as melhores condições de marcação do soro antiescorpiônico com o  $^{99m}\text{Tc}$ . No procedimento de marcação utilizado no presente trabalho, foram empregados dois agentes redutores, o cloreto estânico ( $\text{SnCl}_2$ ) e o borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) (PAUWELS et al., 1993). Nesse sentido, foram avaliados os efeitos das massas de proteína do soro antiescorpiônico e dos agentes redutores sobre o rendimento de marcação.

Nenhuma influência significativa no rendimento de marcação foi observada usando diferentes quantidades de proteína (15,57; 20,76; 25,95; 31,14 e 36,33 mg) e de  $\text{SnCl}_2$  (0; 20; 40 e 80  $\mu\text{g}$ ) com uma massa constante de  $\text{NaBH}_4$  (300  $\mu\text{g}$ ). Porém, um decréscimo significativo no rendimento de marcação foi observado, quando foi usada alta concentração (400  $\mu\text{g}$ ) ou sem adição de  $\text{NaBH}_4$  com concentração constante de  $\text{SnCl}_2$  (20  $\mu\text{g}$ ).

Apesar de nenhuma diferença estatisticamente significativa ter sido observada no rendimento de marcação de  $F(ab')_2$  com as diferentes quantidades de proteína e  $\text{SnCl}_2$  testadas, observou-se uma tendência de maior rendimento de marcação usando as condições que se seguem: 25,95 mg de proteína, 40  $\mu\text{g}$  de  $\text{SnCl}_2$  e 300  $\mu\text{g}$  de  $\text{NaBH}_4$ , para uma atividade fixa de 18.5 MBq de  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ , pH 7,0 e tempo de incubação da reação de 20 minutos. Nessas condições, um alto rendimento de marcação (cerca de 98%), após purificação, foi obtido. Esse rendimento de marcação se encontra de acordo com a pureza radioquímica preconizada para radiofármacos na Farmacopéia Americana - USP 28 (UNITED ..., 2000), devendo estar acima de 90%. As condições de marcação referidas então foram escolhidas para realização dos estudos posteriores.



Mesmo com nenhuma diferença significativa observada no rendimento de marcação, independente das quantidades utilizadas de cloreto estanoso, fato também demonstrado em outros estudos (DINIZ et al., 1999; ARAUJO et al., 2002), parece que a adição de traços de  $\text{Sn}^{2+}$  ao  $\text{NaBH}_4$  melhoram o rendimento de marcação como relatado por Pauwels et al. (1993). A concentração dos agentes redutores parece ser importante para a eficiência de marcação. A variação na quantidade de cloreto estanoso utilizada não influenciou o rendimento da marcação. Quantidades acima de 300  $\mu\text{g}$  de  $\text{NaBH}_4$  levaram a um decréscimo significativo no rendimento de marcação de  $\text{F(ab')}_2$  com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Com o uso de cloreto estanoso sem a adição do borohidreto de sódio, teve-se um rendimento de marcação menor que com o uso de quantidades de 200 e 300  $\mu\text{g}$  de  $\text{NaBH}_4$ .

$^{99\text{m}}\text{Tc-F(ab')}_2$  como outras preparações marcadas com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  provavelmente contém  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  livre ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ , +7) e reduzido  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ , +4). No processo de marcação, aqui relatado, a quantidade de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  foi desprezível e a de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$  foi de cerca de 10%. Então para a remoção do  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$  foi utilizada filtração em membrana de éster de celulose. Observou-se que após a filtração, o rendimento de marcação de  $^{99\text{m}}\text{Tc-F(ab')}_2$  aumentou significativamente de  $94,95 \pm 3,86\%$  para  $97,65 \pm 2,12\%$ , devido à retirada de parte do  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ . O procedimento de filtração para retirada do  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$  foi também utilizado por Araujo et al. (2002) com aumento da pureza radioquímica.

A redução das ligações dissulfeto na molécula de imunoglobulina, embora necessária, deve ser cuidadosamente controlada no sentido de se evitar a fragmentação do anticorpo (RHODES et al., 1986). Para verificar se a integridade da  $\text{F(ab')}_2$  estava preservada após marcação e também para verificar a natureza protéica do antiveneno utilizado no processo de marcação, realizou-se o ensaio eletroforético com SDS-PAGE sob condições redutoras e não redutoras. Ficou demonstrado que as condições de marcação não promoveram fragmentação da  $\text{F(ab')}_2$  e que o antiveneno escorpiônico produzido pela Funed estava constituído somente da fração imunoglobulínica  $\text{F(ab')}_2$ . Nas duas eletroforeses verificou-se somente a presença de bandas correspondentes a  $\text{F(ab')}_2$ . Não foram observadas outras bandas, como por exemplo, as correspondentes

a IgG e nem bandas correspondentes a proteínas de baixo peso molecular. Esses resultados estão de acordo com os resultados de Bian, Chen e Deng (2000) e Sapienza et al. (2002), que trabalharam com anticorpos monoclonais anti-tumor marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ .

Para ser utilizado em estudos de biodistribuição, o composto radiomarcado além de alta pureza radioquímica, deve apresentar estabilidade e manutenção da sua atividade.

Para avaliar a estabilidade *in vitro*, após a marcação (ou seja verificar se o tecnécio não estava se desligando do fragmento  $\text{F(ab')}_2$ ), amostras de soro marcado filtrado foram incubadas em condições semelhantes às fisiológicas. Os resultados mostraram que as ligações de átomos de  $^{99m}\text{Tc}$  com moléculas de  $\text{F(ab')}_2$  são estáveis após 1, 4 e 24 h de incubação. Isto foi confirmado posteriormente *in vivo* com o perfil de captação da tireóide. Não houve evidência de liberação de pertecnetato *in vivo*, pois a % dose/g na tireóide não aumentou com o tempo (Figura 8).

A manutenção da atividade de  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  foi avaliada *in vivo* e *in vitro*. Para o estudo *in vivo*, utilizou-se o teste de Potência, (FARMACOPÉIA ..., 2003) preconizado para o controle da qualidade de soros hiperimunes. O antiveneno marcado foi capaz de proteger camundongos da ação letal de uma dose do veneno escorpiônico igual a cinco vezes a  $\text{DL}_{50}$ . Quando a potência do soro marcado foi comparada com a potência do mesmo lote de soro não marcado, não houve diferença estatística entre as mesmas. Porém, essa atividade *in vivo* poderia ser devida também às moléculas não marcadas, já que o rendimento de marcação de 98% pode não significar que essa porcentagem de moléculas estejam marcadas, mas sim, que 98% das moléculas de tecnécio - $^{99m}$  foram incorporadas à fração imune, nas condições de marcação utilizadas. Tendo em vista esse fato, foi realizado também um estudo *in vitro* em relação à imunorreatividade da molécula marcada.

A imunorreatividade de  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  *in vitro* foi avaliada frente ao veneno escorpiônico total por meio de cromatografia de imunoafinidade utilizando uma coluna de

Sepharose® acoplada ao veneno. Com o tampão PBS pH 7,4 foram eluídas as frações não específicas ao antígeno e com o tampão glicina pH 2,8 foram eluídas as frações específicas ao antígeno. O pH ácido permite o desligamento da imunoglobulina ligada ao antígeno da coluna por alterar a conformação molecular da  $F(ab')_2$ . Essa alteração na conformação molecular é reversível quando o pH é neutralizado rapidamente. A coincidência nos picos de radioatividade e de absorvância nas frações eluídas com glicina, indicam que toda a radioatividade dessas frações está associada à proteína ( $F(ab')_2$ ) e demonstra que a  $^{99m}\text{Tc-F}(ab')_2$  é capaz de se ligar ao antígeno específico. O soro marcado e não marcado apresentaram o mesmo perfil na coluna de imunoafinidade. A maior parte das proteínas do soro antiescorpiônico, é não específica ao antígeno, pois o pico das frações eluídas com PBS foi maior do que o pico das frações eluídas com glicina, o que é esperado por se tratar de soro obtido de plasma animal, onde estão presentes imunoglobulinas contra vários tipos de antígenos. A análise por SDS-PAGE confirmou que tanto as frações eluídas com PBS, quanto às frações eluídas com glicina são  $F(ab')_2$ .

O teste de potência indicou que a  $^{99m}\text{Tc-F}(ab')_2$  foi capaz de reconhecer *in vivo* o antígeno escorpiônico, o que foi confirmado posteriormente com os resultados obtidos *in vitro* na coluna de imunoafinidade. Esses resultados indicaram que não houve alterações na estrutura molecular destes anticorpos e também demonstrou a associação da radioatividade com a proteína, o que confirma que a atividade imunológica está associada à molécula marcada.

Uma vez comprovada a estabilidade e as integridades molecular e biológica da  $F(ab')_2$  antiescorpiônica marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ , iniciou-se os estudos de distribuição biológica da mesma. Foram utilizadas as frações específicas ao antígeno eluídas com glicina na coluna de imunoafinidade injetadas IV em ratos de 21-22 dias de idade com o objetivo de verificar a sua biodistribuição em animais jovens.

O perfil de captação do antiveneno escorpiônico marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  em órgãos de ratos de 21-22 dias apresentou diferenças quando comparado ao perfil de captação da

tityustoxina nos mesmos órgãos desses animais em estudo realizado por Nunan et al. (2003).

A comparação de dados de  $t_{m\acute{a}x}$  (tempo onde ocorre a concentração máxima) e  $K_p$  (coeficiente de partição tecido-sangue) para o antiveneno e tityustoxina para cada órgão dos ratos de 21-22 dias pôde ser feita a partir dos dados das tabelas 8 e 9.

Informações mais precisas sobre o perfil de distribuição tecidual de uma substância são obtidas em experimentos animais com medidas das captações dos vários órgãos e tecidos.

A partir dos valores de captação pode-se estimar a extensão da distribuição, calculando-se o coeficiente de partição tecido-sangue ( $K_p$ ). Este coeficiente expressa a relação entre concentração tissular e concentração sanguínea, no equilíbrio (ROWLAND; TOZER, 1995). No equilíbrio, a concentração tissular da substância não ligada é igual a sua concentração plasmática. Apesar de uma boa estimativa de  $K_p$  ser conseguida quando o tempo da última medida for igual ou superior a 3,3 meias-vidas biológicas (LABAUNE, 1984), o que não foi conseguido com a leitura até 24 h após injeção intravenosa da  $F(ab')_2$ , os valores calculados fornecem estimativas importantes para comparação da biodistribuição da tityustoxina e antiveneno. Os valores de  $K_p$  refletem melhor a extensão da captação de uma substância pelos tecidos do que os valores absolutos, uma vez que permitem comparações entre tratamentos diferentes e independem do modelo farmacocinético de distribuição (MCINTOSH et al., 1997).

**Tabela 8** – Valores do tempo onde ocorre a concentração máxima ( $t_{\text{máx}}$ ) para órgãos de ratos de 21-22 dias após biodistribuição da tityustoxina (TsTX) marcada com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  injetada SC e  $\text{F(ab')}_2$  antiescorpiônica marcada com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  injetada IV.

Órgão	$t_{\text{máx}}$ (min)	
	TsTX*	$\text{F(ab')}_2$
Baço	180	720
Cérebro	60	5
Tireóide	60	5
Coração	60	5
Pulmão	60	5
Fígado	180	720
Rins	360	720

\* fonte: Nunan et al. (2003)

Observa-se que a  $\text{F(ab')}_2$  alcançou a concentração máxima no cérebro, tireóide, pulmão e coração com cinco minutos após a administração em contraste com a tityustoxina que alcançou a concentração máxima aos 60 minutos.

No baço, fígado e rins o antiveneno alcançou a concentração máxima no tempo de 12 h, enquanto a tityustoxina alcançou a concentração máxima no baço e fígado com 3 h e nos rins com 6 h, o que indica que a eliminação do antiveneno é mais lenta que a do veneno e que ambos possivelmente apresentam a mesma via de eliminação.

**Tabela 9** – Valores de Kp (área sob a curva da radioatividade tecidual de 0-24 h/área sob a curva da radioatividade no sangue de 0-24 h) para órgãos de ratos de 21-22 dias após biodistribuição da tityustoxina (TsTX) marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  injetada SC e  $\text{F(ab}')_2$  antiescorpiônica marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  injetada IV.

Órgão	Kp	
	TsTX*	$\text{F(ab}')_2$
Baço	1,60	0,49
Cérebro	0,08	0,02
Tireóide	0,94	0,09
Coração	0,70	0,30
Pulmão	1,06	0,26
Fígado	4,05	0,46
Rins	235,7	2,62

\* fonte: Nunan et al. (2003)

Os valores de Kp do antiveneno para todos os órgãos foram menores que os da tityustoxina. O antiveneno apresentou também valores de Kp menores que a unidade praticamente em todos os órgãos, exceto para os rins. A tityustoxina, ao contrário, apresentou valores de Kp maiores que a unidade para maioria dos órgãos, com exceção da tireóide, cérebro e coração.

É importante apontar que valores de Kp menores que a unidade são sugestivos de uma captação não extensiva do conteúdo plasmático. Em outra mão, valores de Kp acima da unidade indicam extensiva captação, por essa razão, sugerindo acumulação no órgão.

Apesar de não esperado, o antiveneno  $\text{F(ab}')_2$  foi capaz de atravessar a barreira hematoencefálica nos ratos jovens e atingir uma concentração máxima no cérebro aos cinco minutos, enquanto a tityustoxina o foi em uma hora, porém o antiveneno apresentou uma captação bem menor que a da tityustoxina.

Crianças envenenadas em acidentes escorpiônicos mostram freqüente associação de manifestações cardiovasculares e do SNC, o mesmo não acontecendo com adultos (SOFER; GUERON, 1988; ISMAIL; ABD-ELSALAM; MURAD, 1990; ISMAIL et al., 1992; ISMAIL, 1995; MESQUITA; MORAES-SANTOS; MORAES, 2003).

Manifestações cardiorespiratórias, principalmente choque cardiogênico e edema pulmonar, são geralmente as causas que levam a morte após envenenamento escorpiônico (GUERON; ILIA; SOFER, 1992).

Esses sintomas do envenenamento escorpiônico indicam que a captação do antiveneno no coração, pulmão e SNC seria importante para reverter a ação do veneno nesses órgãos.

Então de maneira semelhante ao veneno, a  $F(ab')_2$  é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica em “ratos crianças”, podendo-se supor que em crianças isso também possa ocorrer.

A concentração máxima do antiveneno no cérebro, coração e pulmão foi alcançada em tempo 12 vezes menor que a da tityustoxina. Porém o que ocorre nos acidentes escorpiônicos é que o antiveneno é administrado algum tempo após o envenenamento, o que poderia explicar a pouca ou quase nula eficiência do tratamento com antiveneno para reverter os sintomas cardiovasculares e do SNC em crianças vítimas de envenenamento devido à falta de oportunidade de neutralização do veneno pelo antiveneno no compartimento tecidual.

Segundo alguns autores (TARASIUK; KHVATSKIN; SOFER, 1998) apesar de o antiveneno neutralizar as toxinas livres no sangue, ele não tem efeito na ejeção cardíaca e na acidose metabólica, pelo fato de que as toxinas já terem se distribuído rapidamente para os tecidos e também pela ativação rápida da cascata inflamatória, causando falência do órgão, mudanças hemodinâmicas, não respondendo mais às imunoglobulinas do antiveneno.

O antiveneno também apresentou uma alta captação nos rins como a tityustoxina, mas menor em relação à toxina. Essa alta captação demonstrada pelo alto valor de  $AUC_{0-24h}$  sugere a que a sua eliminação possa ser renal.

A eliminação de fragmentos de anticorpos monoclonais pode ocorrer por filtração glomerular. Entretanto, o peso molecular da  $F(ab')_2$  está acima do limite para filtração renal que é cerca de 60 KDa, portanto a atividade renal, provavelmente é dos catabólitos de  $F(ab')_2$ , possivelmente fragmentos Fab, pois  $F(ab')_2$  pode ser processada e clivada primeiramente para posterior excreção renal (BOSKOVITZ et al., 2004).

A cinética e metabolismo de IgG,  $F(ab')_2$  e Fab marcadas com  $^{99m}Tc$  foram investigados em pacientes com câncer colorretal metastático. A meia-vida sérica foi: IgG, 36 h (captação predominante no fígado);  $F(ab')_2$ , 16 h; e Fab, 4 h (captação renal predominante) (BEHR et al., 1995).

A comparação dos valores de  $t_{máx}$  e  $K_p$  para a tityustoxina e  $F(ab')_2$  permitiu observar que o veneno se distribui muito mais rapidamente para os tecidos que a  $F(ab')_2$ . Os baixos valores de  $K_p$  encontrados para o antiveneno, assim como o valor encontrado de  $AUC_{0-24h}$  para o sangue (que foi maior do que para os outros órgãos) indicaram uma baixa captação de  $F(ab')_2$  pelos órgãos, e que a mesma permanece mais tempo no sangue.

Essas diferenças entre os perfis farmacocinéticos do veneno escorpionico e o específico antiveneno  $F(ab')_2$  para as espécies *Buthus occitanus*, *Leiurus quinquestriatus*, *Centruroides limpidus limpidus* e *Androctonus australis garzonii*, também foram relatadas por outros autores (PÉPIN-COVATTA et al., 1996; ISMAIL; ABD-ELSALAM, 1998; CALDERON-ARANDA et al., 1999; KRIFI et al., 2001; SEVCIK et al., 2004). Avaliação na biodistribuição do veneno de *Tityus serrulatus* injetado SC após injeção do antiveneno IV, em camundongos adultos, revelou que quando o mesmo foi injetado imediatamente após o veneno ocorreu completo desaparecimento dos níveis do veneno no coração, baço e fígado e uma redução significativa no plasma,



pulmão e rins. Porém, quando o antiveneno foi injetado 1 h após o veneno, ocorreu diminuição nos níveis do veneno menos intensa principalmente nos pulmões e rins (REVELO et al., 1996). Em todos os estudos descritos, até o momento, para antivenenos escorpiônicos foram utilizados animais experimentais adultos. Nenhum estudo investigou a biodistribuição da  $F(ab')_2$  antiescorpiônica em ratos jovens e não envenenados.

A maioria desses estudos foi realizada medindo somente a concentração sanguínea do veneno ou antiveneno para calcular os parâmetros farmacocinéticos. O antiveneno escorpiônico induziu importante diminuição na concentração do veneno no plasma e tecidos de camundongos injetados subcutaneamente com o veneno escorpiônico (REVELO et al., 1996). Por esta razão, parece que a reversão dos efeitos da toxina escorpiônica por anticorpos específicos poderia ser explicada pela remoção da toxina não somente no sangue como nos tecidos. Então a diminuição dos sintomas induzidos pelo veneno escorpiônico em humanos seria devido à neutralização do veneno circulante pelo antiveneno e também pela remoção do veneno ligado aos tecidos (REZENDE; AMARAL; FREIRE-MAIA, 1998), o que demonstra a importância da análise da biodistribuição do antiveneno nos tecidos para um melhor entendimento do mecanismo de reversão do envenenamento escorpiônico.

Farmacocinética pode ser definida como a caracterização e predição do tempo de curso de uma droga no corpo. Isto inclui as características de absorção, distribuição e eliminação. Modelos farmacocinéticos podem ser usados para prever o tempo de curso da concentração de tal droga. A maioria das drogas deixa o plasma, se distribui e se liga a outros tecidos. A distribuição da droga através do corpo depende enormemente do fluxo sanguíneo no órgão e das propriedades físico-químicas da droga, tais como a solubilidade lipídica e ligação a proteínas. Mudanças na medida da concentração da droga em relação ao tempo são usadas para se obter as constantes farmacocinéticas que descrevem o comportamento da droga no corpo. O perfil plasmático pode ser caracterizado em termos de níveis máximos de concentração plasmática ( $C_{máx}$ ), tempo ao nível máximo ( $t_{máx}$ ) e área sob a curva plasmática (AUC).

Esses parâmetros podem ser obtidos por simples inspeção da concentração sangüínea ou plasmática da droga versus tempo. No modelo farmacocinético compartimental, o corpo é assumido ter um ou mais compartimentos. As drogas são injetadas dentro e eliminadas ou por metabolismo ou excreção renal do compartimento central (STRUYS; KAMAR; PAEPE, 2006).

Estudos farmacocinéticos do veneno *T. serrulatus* mostraram quatro características importantes: a absorção do tecido SC para o compartimento central é rápida, a distribuição para os tecidos é rápida e alta, a afinidade pelos tecidos é alta, e a eliminação é lenta (REVELO et al., 1996; NUNAN et al., 2004), indicando que o tratamento do envenenamento escorpiônico com antiveneno IV deve ser iniciado o mais breve possível. Além disso, é postulado que o veneno produz seus efeitos farmacológicos no compartimento tecidual profundo (ISMAIL et al., 1980).

A curva do nível sangüíneo do antiveneno marcado versus tempo se apresentou como uma curva trifásica característica de modelo farmacocinético de três compartimentos. Este dado foi visualizado e não calculado já que com o intervalo de tempo estudado (de 24 horas) não se verificou todo decaimento da concentração sangüínea. Estudos farmacocinéticos de antivenenos escorpiônicos  $F(ab')_2$  realizados por Ismail e Abd-Elsalam (1998) em coelhos adultos e por Vásquez et al. (2005) em voluntários humanos adultos sadios, não envenenados, mostraram que a fração se distribui segundo um modelo tricompartmental.

Há uma rápida fase de distribuição que se inicia imediatamente após uma injeção *in bolus*. Esta fase é caracterizada por um equilíbrio muito rápido nos tecidos. Há uma segunda fase de distribuição mais lenta que é caracterizada por um movimento do antiveneno para dentro dos tecidos equilibrando-se mais lentamente e o retorno para os tecidos que se equilibram mais rapidamente. A fase terminal, ou seja, de decaimento, é uma reta quando plotada em um gráfico semi-logarítmico. A fase terminal é freqüentemente chamada fase de eliminação devido ao mecanismo primário de

diminuição da concentração da droga durante a fase terminal e sua eliminação do corpo (STRUYS; KAMAR; PAEPE, 2006).

Estudos farmacocinéticos do antiveneno  $F(ab')_2$  contra a espécie do escorpião *Centruroides limpidus limpidus* realizados por Sevick et al. (2004) e Vásquez et al. (2005) em carneiros e humanos respectivamente, demonstraram que a primeira fase de decaimento é rápida com  $t_{1/2}$  de cerca de 15 minutos. Devido ao alto peso molecular da  $F(ab')_2$  (100 KDa), eles relataram existir um tipo de mecanismo ativo de extrusão de  $F(ab')_2$  através do endotélio vascular, o que poderia explicar os curtos tempos de captação máxima do antiveneno encontrados para o cérebro, tireóide, coração e pulmão neste estudo. Os autores utilizaram protocolos experimentais nos quais se determinavam a concentração do antiveneno em tempos mais curtos, como no presente estudo, o que não foi feito por outros autores que não descreveram este fenômeno (PÉPIN et al., 1995; PÉPIN-COVATA et al., 1996; RIVIÈRE et al., 1997).

O antiveneno usado na soroterapia deve possuir características farmacocinéticas que permitam distribuição rápida o suficiente para neutralizar a fração do veneno distribuída para os tecidos, pois as ações toxicológicas do veneno são exercidas principalmente no compartimento tecidual (ISMAIL et al., 1980, 1983, 1992; ISMAIL; ABD-ELSALAM, 1988).

Estudos da cinética do veneno em presença do antiveneno, demonstraram que o antiveneno afeta a farmacocinética do veneno. Para toxinas que atuam em sítios fora do sangue, a ligação do antiveneno com a toxina no sangue efetivamente neutraliza a ação do veneno imediatamente por mudança na disponibilidade do veneno. O inverso também parece verdadeiro: o veneno com meia vida de eliminação muito mais curta que o antiveneno, altera a farmacocinética do antiveneno. As moléculas de antiveneno se ligam ao veneno sendo eliminados do corpo como imunocomplexos que são mais rapidamente eliminados. A IgG percorre no corpo caminhos mais longos para encontrar o antígeno, após a sua ligação o organismo elimina o complexo antígeno-anticorpo (VÁSQUEZ et al., 2005).

O uso de altas doses de antiveneno, pela via intravenosa, é a base dos protocolos de tratamento para picadas de escorpião em vários países tais como Arábia Saudita (ISMAIL, 1994), México (CALDERÓN-ARANDA et al., 1999) e também no Brasil (FUNASA, 2001). A pré-administração (via IV) de dose alta de antiveneno mostrou induzir uma imediata, completa e durável neutralização das toxinas, bem como a sua rápida redistribuição do compartimento periférico para o vascular. A injeção intravenosa de doses menores do antiveneno induziu decréscimo passageiro das toxinas circulantes, indicando que uma dose mínima de antiveneno tem que ser administrada para permitir uma neutralização eficiente e durável do veneno (KRIFI et al., 2005). Essa alta dose de antiveneno necessária para neutralização do veneno poderia ser explicada pelo fato da maioria das frações imunoglobulínicas presentes no antiveneno não serem específicas ao veneno escorpiônico, como foi demonstrado neste trabalho utilizando coluna de imunoafinidade. Este passo de separação das frações específicas não faz parte da maioria dos processos de produção de antivenenos obtidos de plasma animal.

A maioria dos protocolos de tratamento para picada de escorpião é baseada em informações isoladas, e algumas vezes em observações controversas e não são resultados de estudos clínicos controlados (MAHADEVAN, 2000).

A efetividade da soroterapia depende não só da dose do antiveneno, mas também do tempo decorrido entre a picada e a administração do antiveneno (ISMAIL, 1995; REVELO et al., 1996; GHALIM et al., 2000). Entretanto, a seleção da dose do antiveneno e protocolo de administração continuam sendo feitos empiricamente (FREIRE-MAIA; CAMPOS; AMARAL, 1994; ISMAIL, 1994, 1995).

O antiveneno ideal poderia alcançar adequadamente os diferentes tecidos nos quais o veneno produz seus efeitos tóxicos e, uma vez ligado a toxina, o complexo poderia ser rapidamente eliminado (ISMAIL; ABD-ELSALAM, 1998).

Nossos resultados indicaram que o antiveneno permanece mais tempo no sangue que a tityustoxina, como demonstrado pelo alto valor de  $AUC_{0-24h}$  do sangue e pela baixa

captação do mesmo nos órgãos. Com 24 horas não se tem mais veneno no sangue enquanto que o antiveneno ainda está na fase de decaimento.

As captações no cérebro e no coração foram muito baixas para o antiveneno quando comparadas com a da tityustoxina, o que poderia explicar as complicações cardiorespiratórias e do SNC no envenenamento em crianças, mesmo após injeção do antiveneno.

No fígado e rins, o antiveneno atinge sua concentração máxima somente 12 horas após injeção, enquanto a tityustoxina após 3 horas no fígado e 6 horas nos rins, o que indica a eliminação mais lenta do antiveneno.

A eficácia da soroterapia em crianças estaria então associada à distribuição e farmacocinética do antiveneno em relação ao veneno, a concentração de fração específica ao veneno presente no antiveneno e ao tempo decorrido do envenenamento.

Nossos estudos podem prover dados para um tratamento do envenenamento escorpiónico mais objetivo que pode resultar em uso mais eficiente do antiveneno escorpiónico em crianças.

## 7 CONCLUSÕES

- Um alto rendimento de marcação do soro antiescorpiônico com o  $^{99m}\text{Tc}$  foi obtido, com o uso de dois agentes redutores, o cloreto estânico e o borohidreto de sódio, e a purificação por filtração em membrana de éster de celulose ( $98,90 \pm 0,25\%$ ).
- O rendimento de marcação de  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  permaneceu constante após incubação em PBS pH 7,4 a  $37^\circ\text{C}$  demonstrando estabilidade da  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  por até 24 horas.
- A marcação de  $\text{F(ab')}_2$  com o  $^{99m}\text{Tc}$  não alterou sua potência (ensaio *in vivo*) e nem a sua imunorreatividade (ensaio *in vitro*); sendo verificado também no ensaio *in vitro*, a associação da radioatividade com a proteína ( $\text{F(ab')}_2$ ) na fração específica ao veneno escorpiônico.
- A maior captação de  $^{99m}\text{Tc-F(ab')}_2$  foi observada nos rins aos 720 minutos (12h), seguida do fígado e baço que também apresentaram captação máxima nesse tempo. Em seguida, no pulmão e coração com captação máxima aos 5 minutos e as captações na tireóide e cérebro com concentração máxima também aos 5 minutos.
- O perfil de captação do antiveneno escorpiônico marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  em órgãos de ratos de 21-22 dias apresentou diferenças quando comparado ao perfil de captação da tityustoxina nos mesmos órgãos desses animais.
- No cérebro, tireóide, coração e pulmão, a  $\text{F(ab')}_2$  alcançou a concentração máxima com cinco minutos após a administração em contraste com a tityustoxina que alcançou a concentração máxima aos 60 minutos.

- No baço, fígado e rins o antiveneno alcançou a concentração máxima no tempo de 12 h, enquanto a tityustoxina alcançou a concentração máxima no baço e fígado com 3 h e nos rins com 6 h, o que pode indicar a eliminação do antiveneno mais lenta que a do veneno e que ambos apresentam a mesma via de eliminação: a renal.
- O antiveneno apresentou valores de  $K_p$  menores que a unidade praticamente em todos os órgãos, exceto para os rins. A tityustoxina, ao contrário, apresentou valores de  $K_p$  maiores que a unidade para maioria dos órgãos, com exceção da tireóide, cérebro e coração, demonstrando a baixa captação do antiveneno pelos órgãos.
- O antiveneno permanece mais tempo no sangue que a tityustoxina, como demonstrado pelo alto valor de  $AUC_{0-24h}$  do sangue e pela baixa captação do mesmo nos órgãos. Com 24 horas não se tem mais veneno no sangue enquanto que o antiveneno ainda está na fase de decaimento.
- Verificou-se que a  $F(ab')_2$  se distribui do sangue para os órgãos alvos do envenenamento, inclusive o cérebro, porém em quantidades e tempos diferentes do veneno o que poderá comprometer a sua eficácia dependendo da concentração da fração que se liga especificamente ao veneno e o tempo decorrido após a picada.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOON, N. A.; ALI, A. A.; ALNEMA, A. A.; HAG-ALI, M.; FATANI, A. J. Effect of selected anti-inflammatory drugs on the lethal actions of *Leiurus quinquestriatus* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.12, n.3, p.374-389, 2006.

AL-SADOON, M. K.; JARRAR, B. M. Epidemiological study of scorpion stings in Saudi Arabia between 1993 and 1997. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.9, n.1, 2003.

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; FREIRE-MAIA, L. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. **American Journal of Cardiology**, New York, v.71, p.242-245, 1993.

AMARAL, C. F. S.; DIAS, M. B.; CAMPOLINA, D.; POIETTI, F. A.; REZENDE, N. A. Children with adrenergic manifestations of envenomation after *Tityus serrulatus* scorpion sting are protected from early anaphylactic antivenom reactions. **Toxicon**, Oxford, v.32, n.2, p. 211-215, 1994.

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A. Treatment of scorpion envenoming should include both a potent specific antivenom and support of vital functions. **Toxicon**, Oxford, v.38, n.8, p.1005-1007, 2000.

AMINN, E. E.; BERAIR, R. Piqures de scorpion chez l'enfant. Experience saoudienne. A review. **Archives de Pédiatrie**, Paris, v.2, n.8, p.766-773, 1995.

AMITAI, Y.; MINES, Y.; AKER, M.; GOITEN, K. Scorpion sting in children. **Clinical Pediatrics**. Philadelphia, v.24, n.3, p.136-139, 1985.

ARANTES, E. C.; PRADO, W. A.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. **Toxicon**, Oxford, v. 27, p. 907-916, 1989.



ARAUJO, J. G. V. C.; TOLEDO, V. P. C. P.; GUIMARÃES, T. M. P. D.; BERNARDO-FILHO, M.; SIMAL, C. J. R.; MOTA, L. G.; DINIZ, S. O. F.; CARDOSO, V. N. Technetium-99m labeling anti-amastigote polyclonal antibodies of *Leishmania amazonensis*. **Nuclear Medicine and Biology**, Oxford, v.29, p.405-411, 2002.

AYRES, J. A.; BARRAVIERA, B. Evaluation of the intradermal sensitivity test in patients submitted to heterologous serotherapy. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v.5, n.2, 1999.

BAWASKAR, H. S.; BAWASKAR, P. H. Stings by red scorpions (*Buthotus tamulus*) in Maharashtra State, India: a clinical study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.83, p.858-860, 1989.

BAWASKAR, H. S.; BAWASKAR P. H. Clinical profile of severe scorpion envenomation in children at rural setting. Brief Reports. **Indian Pediatrics**, New Delhi, v.40, p.1072-1081, 2003.

BAZIN-REDUREAU, M.; PEPIN, S.; HONG, G.; DEBRAY, M.; SCHERRMANN, J. M. Interspecies scaling of clearance and volume of distribution for horse antivenom F(ab')<sub>2</sub>. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.150, p.295-300, 1998.

BELGITH, M.; BOUSSARSAR, M.; HAGUIA, H.; BESBES, L.; ELATROUS, S.; TOUZI, N.; BOUJDARIA, R.; BCHIR, A.; NOVIRA, S.; BOUCHOUCHA, S.; ABROUGH, F. Efficacy of serotherapy in scorpion sting: a matched-pair study. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, New York, v.37, p.51-57, 1999.

BERGMAN, N. J. Clinical description of *Parabuthus transvaalicus* scorpionism in Zimbabwe. **Toxicon**, Oxford, v.35, n.5, p.759-771, 1997.

BEHR, T.; BECKER, W.; HANNAPPEL, E.; GOLDENBERG, D. M.; WOLF, F. Targeting of liver metastases of colorectal cancer with IgG, F(ab')<sub>2</sub>, and Fab' anti-carcinoembryonic antigen antibodies labeled with 99mTc: The role of metabolism and kinetics. A review. **Cancer Research**, Baltimore, v.55, n.23, p.5777-5785, 1995.

BESSALEM, S.; HAMMOUDI-TRIKI, D.; LARABA-DJEBARI, F. Effet de l'immunothérapie sur les modifications métaboliques et histopathologiques après envenimation scorpionique expérimentale. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, Paris, v.96, n.2, p.110-114, 2003.

BIAN, H. J.; CHEN, Z. N.; DENG, J. L. Direct technetium-99m labeling of anti-hepatoma monoclonal antibody fragment: a radioimmunoconjugate for hepatocellular carcinoma imaging. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v.6, n.3, p.348-352, 2000.

BOSKOVITZ, A.; WIKSTRAND, C. J.; KUAN, C. T.; ZALUTSKY, M. R.; REARDON, D. A.; BIGNER, D. D. Monoclonal antibodies for brain tumour treatment. A Review. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v.4, n.9, p.1453-1471, 2004.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde, **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BUCARETCHI, F.; BACARAT, E. C. E.; NOGUEIRA, R. J. N.; CHAVE, A.; ZAMBRONE, F. A. D.; FONSECA, M. R. C. C.; TOURINHO, F. S. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.37, n.4, p.331-336, 1995.

BÜCHERL, W. Escorpionismo no Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v.34, p.9-24, 1969.

CALDÉRON-ARANDA, E. S.; RIVIÈRE, G.; CHOUMET, V.; POSSANI, L. D.; BOM, C. Pharmacokinetics of toxic fraction of *Centruroides limpidus limpidus* venom in experimentally envenomed rabbits and effects of immunotherapy with specific F(ab')<sub>2</sub>. **Toxicon**, Oxford, v.37, n.5, p.771-782, 1999.

CAMPOS, J. A.; SILVA, O. A.; LOPEZ, M.; FREIRE-MAIA, L. Signs symptoms and treatment of seizure scorpion sting in children. In: EARK, D.; WADSTRAM, T.(ED.) **Natural Toxins**, Oxford: Pergamon, 1980. p. 61-68.

CATTERALL, W. A. Neurotoxins as allosteric modifiers of voltage-sensitive sodium channels. **Advances in Cytopharmacology**, New York, v.3, p.305-316, 1979.

CATTERALL, W. A. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v.20, p.15-43, 1980.

CATTERALL, W. A. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.55, p.953-985, 1986.

CLOT-FAYBESSE, O.; GUIEU, R.; ROCHAT, H.; DEVAUX, C. Toxicity during early development of the mouse nervous system of a scorpion neurotoxin active on sodium channels. **Life Sciences**, Oxford, v.66, n.3, p.185-192, 2000.

COUTINHO NETTO, J. **Purificação e caracterização parcial da tityustoxina**. 1975. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo.

COURAUD, F.; JOVER, E.; DUBOIS, J. M.; ROCHAT, H. Two types of scorpion receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. **Toxicon**, Oxford, v.20, n.1, p.9-16, 1982.

CUPO, P.; JURCA, M.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; OLIVEIRA, M. J. S.; HERING, S. E. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.36, n.1, p.67-76, 1994.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: Escorpiões e aranhas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.36, p.490-497, 2003.

DASGUPTA, S. C.; GOMES, A.; LAHIRI, S. C. Detection and distribution of scorpion (*Heterometrus bengalensis*) venom in rabbit tissues by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.29, p.691-692, 1991.

DE LIMA, M. E. **Étude de l'interaction des toxines de scorpions avec le système nerveux des insectes: contribution à la caractérisation de leur récepteur**. 1988. 147f. Tese (Doutorado) Faculté des Sciences de Luminy.

DE LIMA, M. E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; DINIZ, C. R.; GRANIER, C. *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins display a complex pattern of antigenic reactivity. **Toxicon**, Oxford, v.31, n.2, p.223-227, 1993.

DEWANJEE, M. K. The chemistry of <sup>99m</sup>Tc labeled radiopharmaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**, New York, v.20, p.5-27, 1990.

DINIZ, S. O. F.; RESENDE, B. M.; NUNAN, E. A.; SIMAL, C. J. R.; CARDOSO, V. N. <sup>99m</sup>Techneium labelled *Escherichia coli*. **Applied Radiation and Isotopes**, Oxford, v.51, p.33-36, 1999.

DONE, A. K. Developmental pharmacology. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v.5, n.4, p.432-479, 1964.

EFRATI, P. Epidemiology, symptomatology and treatment of Buthidae stings. In: \_\_\_\_\_. **Handbooks of Experimental Pharmacology. Arthropod Venoms**. 9.ed. Berlin: Springer, 1978. v. 48, p. 312-317.

ELITSUR, Y.; HERSHKOVICH, Y.; URBACH, J.; MOSES, S. W. Localized cerebral involvement caused by a yellow scorpion sting on the face: two case reports. **Israel Journal of Medical Sciences**, Jerusalem, v.20, p.160-162, 1984.

Escorpião vira caso de saúde pública. Clipping de notícias atualização. **Hoje em Dia**, Belo Horizonte, 25 ago. 2005. Disponível em: <<http://www.smp.org.br/atualizacao/clipping.php>> Acesso em: 20 set. 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4.ed. São Paulo: Organização Andrei Editora, 2003. Partes I e II, 1213 p.

FERNÁNDEZ-BOUZAS, A.; MORALES-RESENDIZ, M. L.; LLAMAS-IBARRA, F.; MARTINEZ-LOPEZ, M.; BALLESTEROS-MARESMA, A. Brain infarcts due to scorpion stings in children: MRI. **Neuroradiology**, Berlin, v.42, n.2, p.118-120, 2000.

FINNEY, D. J. **Statistical Method in Biological Assay**, 3.ed. London: Charles Griffin, 1978. P.349-369.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A. Response to the letter to the Editor by Gueron and Ovsyshcher – on the treatment of the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. **Toxicon**, Oxford, v.25, p.125-130, 1987.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: OWNBY, C. L.; ODELL, G. U. (ED.). **Natural Toxins – Characterization, Pharmacology and Therapeutics**, Oxford: Pergamon Press, 1989. p.139-159.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A.; AMARAL, C. F. S. Approach to the treatment of scorpion envenoming. **Toxicon**, Oxford, v.32, p.1009-1014, 1994.

GAJRE, G.; DAMMAS, A. S. Scorpion envenomation in children: should all stings be given antivenom? Brief Reports. **Annals of Saudi Medicine**, Riyadh, v.19, n.5, 1999.

GHALIM, N.; EL-HAFNY, B.; SEBTI, F.; HEIKEL, J.; LAZAR, N.; MOUSTANIR, R.; BENSLIMANE, A. Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.62, n.2, p. 277–283, 2000.

GOMEZ, M. V.; DINIZ, C. R. Separation of toxic components from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v.33, p.899-902, 1966.

GUERON, M.; OVSYSHCHER, J. What is the treatment for the cardiovascular manifestations on scorpion venom? **Toxicon**, Oxford, v.25, p.101-124, 1987.

GUERON, M.; ILIA, R.; SOFER, S. The cardiovascular system after scorpion envenomation. A review. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, New York, v.30, p.245-258, 1992.

GUERON M.; ILIA R.; SHAHAK E.; SOFER S. Renin and aldosterone levels following envenomation by *Leiurus quinquestriatus*. **Toxicon**, Oxford, v.30, p.765-767, 1992.

GUERON, M.; MARGULIS, G.; ILIA, R.; SOFER, S. The management of scorpion envenomation . **Toxicon**, Oxford, v.31, n.9, p.1071–1083, 1993.

GUIEU, R.; KOPEYAN, C.; ROCHAT, H. Utilization of aspirinquinine and verapamil in the prevention and treatment of scorpion venom intoxication. **Life Sciences**, Oxford, v.53, p.1935-1946, 1993.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v.48, p.422-427, 1972.

HERING, S. E.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P. Acidentes por escorpiões II. In: SCHVARTSWAN, S. (ED.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, 1992. Cap.15, p.216-227.

ISMAIL, M.; ABDULAH, M. E.; MURAD, A. M.; AGEEL, A. M. Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-labelled venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi*. **Toxicon**, Oxford, v.18, p.301-308, 1980.

ISMAIL, M.; SHIBL, A. M.; MORAD, A. M.; ABDULLAH, M. E. Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-labelled antivenom to the venom from scorpion *Androctonus amoreuxi*. **Toxicon**, Oxford, v.91, p.47-56, 1983.

ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, A. Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration? **Toxicon**, Oxford, v.26, p.233-236, 1988.

ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, A.; MURAD, A. M. Do changes in body temperature following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus* influence the course of toxicity? **Toxicon**, Oxford, v.32, p.1265-1284, 1990.

ISMAIL, M.; AMAL, J.; FATANI, Y.; DA BEES, T. T. Experimental treatment protocols for scorpion envenomation: a review of common therapies and effect of kallikrein-kinin inhibitors. **Toxicon**, Oxford, v.30, p.1257-1279, 1992.

ISMAIL, M. The treatment of the scorpion envenoming syndrome: the Saudi experience with serotherapy. **Toxicon**, Oxford, v.32, p.1019-1026, 1994.

ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon**, Oxford, v.33, p.825-858, 1995.

ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, A. Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-labelled IgG, F(ab')<sub>2</sub> and Fab fractions of scorpion and snake antivenins: merits and potential for therapeutic use. **Toxicon**, Oxford, v.36, n.11, p.1523-1528, 1998.

ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, M. A.; AL-AHAIDIB, M. S. Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-labelled *Walterinnesia aegyptia* venom and its specific antivenins: flash absorption and distribution of the venom and its toxin versus slow absorption and distribution of IgG, F(ab')<sub>2</sub> and Fab of the antivenin 1998. **Toxicon**, Oxford, v.36, n.1, p. 93-114, 1998.

JOHNSTON, P.; STEVENSON, I.; HEWICK, D. The influence of digoxin disposition in the rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.36, p.2215-2220, 1987.

JOVER, E.; COURAUD, F.; ROCHAT, H. Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** New York, v.95, n.4, p.1607-1614, 1980.

JOVER, E.; MARTIN-MOUTOT, N.; COURAUD, F.; ROCHAT, H. Binding of scorpion toxins to rat brain synaptosomal fraction. Effects of membrane potential, ions, and other neurotoxins. **Biochemistry**, Washington, v.19, n.3, p.463-467, 1980.

KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. **Toxicon**, Oxford, v.35, n.10, p.1523-1529, 1997.

KRIFI, M. N.; AMRI, F.; KHARRAT, H.; EL AYEB, M. Evaluation of antivenom therapy on children severely envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion venoms. **Toxicon**, Oxford, v.37, p.1627-1634, 1999.

KRIFI, M. N.; MILED, K.; ABDERRAZEK, M.; EL AYEB, M. Effect of antivenom on *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion venom pharmacokinetics: towards an optimization of antivenom immunotherapy in a rabbit model. **Toxicon**, Oxford, v.39, p.1317-1326, 2001.

KRIFI, M. N.; SAVIN, S.; DEBRAY, M.; BOM, C.; EL AYEB, M.; CHOUMET, V. Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. **Toxicon**, Oxford, v.45, p.187-198, 2005.

LABAUNE, J. P. **Pharmacocinétique: Principes Fondamentaux**. Paris: Masson, 1984. p.426.

LOURENÇO WR., CUELLAR O. Scorpions, scorpionism, life history strategies and parthenogenesis. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v.1, p.51-62, 1995.

LOURENÇO, W. R.; CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L.; CUELLAR, O.; VON EICKSTEDT, V. R. D.; BARRAVIERA, B.; KNOX, M. B. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v.2, n.2, p.121-134, 1996.

LUCAS, S. M.; SILVA-JÚNIOR, P. I. Escorpiões de interesse médico no Brasil. In: SCHUARTSMAN, S. (ED.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**, 2.ed. São Paulo: Sarvier; 1992. p. 288.

MAHADEVAN, S. Scorpion sting. **Indian Pediatrics**, New Delhi, v.37, p.504-513, 2000.

MAGALHÃES, O. C. Scorpionism. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.41, p.393-399, 1938.

MARDIROSSIAN, G.; WU, C.; RUSCKOWSKI, M.; HNATOWICH, D. J. The stability of  $^{99m}\text{Tc}$  directly labelled to an Fab antibody via stannous ion and mercaptoethanol reduction. **Nuclear Medicine Communications**, London, v.13, p.503-512, 1992.

MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CEARD, B.; RIBEIRO, A. M.; DINIZ, C. R.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P. E. Biochemical, pharmacological and genomic characterisation of Ts IV, an alpha-toxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. **Febs letters / Federation of European Biochemical Societies**, Amsterdam, v.342, n.2, p.181-184, 1994.

MCINTOSH, D. P.; COOKE, R. J.; MCLACHLAN, A. J.; DALEY-YATES, P. T.; ROWLAND, M. Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin and conjugates of cisplatin with carboxymethyldextran and A<sub>5</sub>B<sub>7</sub> monoclonal antibody in CD<sub>1</sub> mice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v.86, n.12, p.1478-1483, 1997.

MESQUITA, M.; MORAES-SANTOS, T.; MORAES, M. F. D. Phenobarbital blocks the lung edema induced by centrally injected tityustoxin in adult Wistar rats. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v.332, n.2, p.119, 2002.

MESQUITA, M.; MORAES-SANTOS, T.; MORAES, M. F. D. Centrally injected tityustoxin produces the systemic manifestations observed in severe scorpion poisoning. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.187, n.1, p. 58-66, 2003.



MURTHY, K. R. K.; ZARE, M. A.; HAGHNAZARI, L. The use of serotherapy to reverse ECG and cardiac enzyme changes caused by scorpion *Mesobuthus tamulus concanesis*, Pocock envenoming. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v.5, n.2, 1999.

MURTHY, K. R. K. On scorpion envenoming syndrome. Problems of medical ethics and accountability in medical research in India. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v.8, n.1, 2002.

MURTHY, R. K.; AS, D.; ABBAS, M. Z.; HAGHNAZARI, L. Investigations on the role of insulin and scorpion antivenom in scorpion envenoming syndrome. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.9, n.2, 2003.

MURUGESAN, S.; MURTHY K. R. K.; NORONHA, O. P. D.; SAMUEL, A. M. Tc 99m – scorpion venom: labeling, biodistribution, and scintimaging. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v.5, p.35-46, 1999.

NUNAN, E. A. **Influência da idade na letalidade do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e na farmacocinética e distribuição tecidual da tityustoxina**. 2001. 171f. Tese (Doutorado) Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

NUNAN, E. A.; CARDOSO, V. N.; MORAES-SANTOS, T. Lethal effect of the scorpion *Tityus serrulatus* venom: comparative study on adult and weanling rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v.37, n.1, p.39-44, 2001.

NUNAN, E. A.; CARDOSO, V. N.; MORAES-SANTOS, T. Technetium-99m labeling of tityustoxin and venom from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Applied Radiation and Isotopes**, Oxford, v.57, p.849-852, 2002.

NUNAN, E. A.; CARDOSO, V. N.; MORAES-SANTOS, T.; MORAES, M. F. D. Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Life Sciences**, Oxford, v.73, p.319-325, 2003.

NUNAN, E. A.; CARDOSO, V. N.; MORAES-SANTOS, T.; ARYA, V.; HOCHHAUS, G. Age effects on the pharmacokinetics of tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.37, p.385-390, 2004.

OSNAYA-ROMERO, N.; MEDINA-HERNANDEZ, T. J.; FLORES-HERNANDEZ, S. S.; LEON-ROJAS, G. Clinical symptoms observed in children envenomated by scorpion stings, at the children's hospital from the State of Morelos, Mexico. **Toxicon**, Oxford, v.39, n.6, p.781-785, 2001.

OTERO, R.; NAVIO, E.; CESPEDES, F. A.; NUNEZ M. J.; LOZANO, L.; MOSCOSO, E. R.; MATAALLANA, C.; ARSUZA, N. B.; GARCIA, J.; FERNANDEZ, D.; RODAS, J. H.; RODRIGUEZ, O. J.; ZULETA, J. E.; GOMEZ, J. P.; SALDARRIAGA, M.; QUINTANA, J. C.; NUNEZ, V.; CARDENAS, S.; BARONA, J.; VALDERRAMA, R.; PAZ, N.; DIAZ, A.; RODRIGUEZ, O. L.; MARTINEZ, M. D.; MATURANA, R.; BELTRAN, L. E.; MESA, M. B.; PANIAGUA, J.; FLOREZ, E.; LOURENCO, W. R. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.98, n.12, p.742-750, 2004.

PAUWELS, E. K. J.; WELLING, M. M.; FEITSMA, R. I. J.; AT SMA, D. E.; NIEUWENHVIZEN, W. The labeling of proteins and LDL with  $^{99m}\text{Tc}$ : a new direct method employing  $\text{KBH}_4$  and stannous chloride. **Nuclear Medicine and Biology**, Oxford, v.20, n.7, p.825-833, 1993.

PEPIN, S.; LUTSCH, C.; GRANDGEORGE, M.; SCHERRMANN, J. M. Snake  $\text{F(ab')}_2$  antivenom from hyperimmunized horse: pharmacokinetics following intravenous and intramuscular administrations in rabbits. **Pharmaceutical Research**, New York, v.12, n.10, p.1470-1473, 1995.

PÉPIN-COVATTA, S.; LUTSCH, C.; GRANDGEORGE, M.; LANG, J.; SCHERRMANN, J. Immunoreactivity and pharmacokinetics of horse anti-scorpion venom  $\text{F(ab')}_2$  – scorpion venom interactions. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.141, p.272-277, 1996.

PENTEL, P. R.; KEYLER, D. E.; BRUNN, G. J. Redistribution of tricyclic antidepressants in rats using a drug-specific monoclonal antibody: dose-response relationship. **Drug Metabolism and Disposition**, Switzerland, v.19, p.24-28, 1991 apud CALDERÓN-ARANDA, E. S.; RIVIÉRE, G.; CHOUMET, V.; POSSANI, L. D.; BOM, C. Pharmacokinetics of toxic fraction of *Centruroides limpidus limpidus* venom in experimentally envenomed rabbits and effects of immunotherapy with specific  $\text{F(ab')}_2$ . **Toxicon**, Oxford, v.37, n.5, p.771-782, 1999.

QUEIROZ, I. B.; TURCHETTI-MAIA, M. R. M.; MORAES-SANTOS, T.; GOMEZ, M. V. Ageing and acetylcholine release by tityustoxin from brain cortical slices. **Toxicon**, Oxford, v.32, p.232-234, 1994.

REDDY, C. R. R. M.; SUVARNAKUMARI, G.; DEVI, C. S.; REDDY, C. N. Pathology of scorpion venom poisoning. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.75, p.98-100, 1972.

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

REZENDE, N. A.; DIAS, M. B.; CAMPOLINA, D.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; DINIZ, C. R.; AMARAL, C. F. S. Efficacy of antivenom therapy for neutralizing circulating venom antigens in patients stung by *Tityus serrulatus* scorpion. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.52, n.3, p.277-280, 1995.

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

REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. S.; FREIRE-MAIA, L. Immunotherapy for scorpion envenomation in Brazil. **Toxicon**, Oxford, v.36, n.11, p.1507-1513, 1998.

RHODES, B. A.; ZAMOA, P. O.; NEWELL, K. D.; VALDEZ, E. F. Technetium-99m labeling of murine monoclonal antibody fragments. **Journal of Nuclear Medicine**, New York, v.27, p. 685-693, 1986.

RIVIÈRE, G.; CHOUMET, V.; AUDEBERT, F.; SABOURAUD, A.; DEBRAY, M.; SCHERRMANN, J. M.; BOM, C. Effect of antivenom on venom pharmacokinetics in experimentally envenomed rabbits: toward an optimization of antivenom therapy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.281, n.1, p.1-8, 1997.

ROCHAT, H.; BERNARD, P.; COURAUD, F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. **Advances in Cytopharmacology**, New York, v.3, p.325-334, 1979.

ROMERO, N. O.; HERNÁNDEZ, T. J. M. Cerebral edema associated to scorpion sting: a two-case sting report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.11, n.4, p.594-600, 2005.

ROODT, A. R.; GARCIA, S. I.; SALOMON, O. D.; SEGRE, L.; DOLAB, J. A.; FUNES, R. F.; TITTO, E. H. Epidemiological and clinical aspects of scorpionism by *Tityus trivittatus* in Argentina. **Toxicon**, Oxford, v.41, n.8, p.971-977, 2003.

ROWLAND, M.; TOZER, T. N. **Clinical Pharmacokinetics – Concepts and applications**. 3.ed. London: Lea & Febriger, 1995. 546p.

SABOURAUD, A.; URTIZBEREA, M.; CANO, N.; GRANDGEORGE, M.; ROUZIOUX, J. M.; SCHERRMANN, J. M. Colchicine-specific Fab fragments alter colchicine disposition in rabbits. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.260, p.1214-1219, 1992.

SALOUTI, M.; RAJABI, H.; BABAEI, M. H.; RASAEI, M. J.; NAJAFI, R.; PAKNEJAD, M.; HASAN, M.; ALTARIHI, T.; NEJADSALOUTI, J. M. A new monoclonal antibody radiopharmaceutical for radioimmunoscinigraphy of breast cancer: direct labeling of antibody and its quality control. **Daru: Journal of Faculty of Pharmacy**, (Published By: Tehran University of Medical Sciences), v.14, n.1, p.51-56, 2006.

SAMPAIO, S. V.; LAURE, C. J.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, Oxford, v.21, p.265-277, 1983.

SANDOVAL, M. R. L.; DORCE, V. A. C. The envenomation by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat: age and sex influence. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v.55, p.5-10, 1993.

SANTANA, G. C.; FREIRE, A. C. T.; FERREIRA, A. P. L.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; DINIZ, C. R.; FREIRE-MAIA, L. Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the rat. **Toxicon**, Oxford, v.34, n.9, p.1063-1066, 1996.

SAPIENZA, M. T.; MARQUES, F. L.; OKAMOTO, M. R.; HIRONAKA, F. H.; BUCHPIGUEL, C. A. Anti-CEA monoclonal antibody: technetium-99m labeling and the validation process of a scintigraphic animal model with a non-cellular antigenic implant. **Cellular and Molecular Biology**, Elmsford, v.48, n.5, p.511-516, 2002.

Serviço de Toxicologia do Hospital de Pronto-Socorro (HPS) João XXIII, 2006.

SEVCIK, C.; D'SUZE, G.; DIAZ, P.; SALAZAR, V.; HIDALGO, C.; AZPURUA, H.; BRACHO, N. Modelling *Tityus* scorpion venom and antivenom pharmacokinetics. Evidence of active immunoglobulin G's F(ab')<sub>2</sub> extrusion mechanism from blood to tissues. **Toxicon**, Oxford, v.44, n.7, p.731-741, 2004.

SILVA, M. C. **Escorpião e Escorpionismo no Contexto Urbano, Bairro Antônio Ribeiro de Abreu, Belo Horizonte, MG**. 1992. Monografia de Bacharelado, Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

**Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX**. Casos Registrados de Intoxicação Humana e Envenenamento, 2003. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>> Acesso em: 20 set. 2006.

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

SOFER, S.; GUERON, M. Respiratory failure in children following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus*: hemodynamic and neurological aspects. **Toxicon**, Oxford, v.26, p.931-939, 1988.

SOFER, S.; SHAHAK, E.; GUERON, M. Scorpion envenomation and antivenom therapy. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v.124, p.973-978, 1994.

SPIRANDELLI-CRUZ, E. F.; YASSUDA, W.; JIM J.; BARRAVIERA, B. Programa de controle de surto de escorpião *Tityus serrulatus* (Lutz e Mello, 1922), no Município de Aparecida (SP), (Scorpiones, Buthidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.28, p.123-128, 1995.

STRUYS, M. M. R. F.; KALMAR, A.; DE PAEPE, P. Pharmacokinetic principles. Cap 1. P.3-25, 2006.

TARASIUK, A.; KHVATSKIN, S.; SOFER, S. Effects of antivenom serotherapy on hemodynamic pathophysiology in dogs injected with *L. quinquestriatus* scorpion venom. **Toxicon**, Oxford, v.36, n.7, p.963-971, 1998.

TARASIUK, A.; MENASCU, S.; SOFER, S. Antivenom serotherapy and volume resuscitation partially improve peripheral organ ischemia in dogs injected with scorpion venom. **Toxicon**, Oxford, v.42, n.1, p.73-77, 2003.

THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. A Review **Toxicon**, Oxford, v.41, n.5, p.541-557, 2003.

TOLEDO, D. V.; NEVES, A. G. A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v.55B, p.249-253, 1976.

TORRES, J. B.; MARQUES, M. G. B.; MARTINI, R. K.; BORGES, V. A. An accident involving *Tityus serrulatus* and its epidemiological implications in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.36, n.5, 2002.

TOULOUN, O.; SLIMANI, T.; BOUMEZZOUGH, A. Epidemiological survey of scorpion envenomation in Southwestern Morocco. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v.7, n.2, 2001.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. 28<sup>th</sup> ed. Englewood: Micromedex, 2000. 3v.

VALDIVIA, H. H.; MARTIN, B. M.; RAMÍREZ, A. N.; FLETCHER, P. L.; POSSANI, L. D. Isolation and pharmacological characterization of four novel Na<sup>+</sup> channel blocking toxin from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v.116, p.1383-1391, 1994.

VÁZQUEZ, H.; CHAVEZ-HARO, A.; GARCIA-UBBELOHDE, W.; MANCILLA-NAVA, R. PANIAGUA-SOLIS, J.; ALAGON, A.; SEVCIK, C. Pharmacokinetics of a F(ab')<sub>2</sub> scorpion antivenom in healthy human volunteers. **Toxicon**, Oxford, v.46, n.7, p.797-805, 2005.

VON EICKSTEDT, V. R. D.; RIBEIRO, L. A.; CANDIDO, D. M.; ALBUQUERQUE, M. J.; JORGE, M. T. Evolution of scorpionism by *Tityus bahiensis* (Perty) and *Tityus serrulatus* Lutz and Mello and geographical distribution of the two species in the State of São Paulo - Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v.2, p.92-105, 1996.

**ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÉ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO  
ANIMAL (CETEA)****CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo n° 002/05 relativo ao projeto intitulado "Farmacocinética e biodistribuição de antiveneno escorpiônico marcado com Tc em ratos de 21-22 dias", que tem como responsável Elzéria de Aguiar Nunan, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comité de Ética em Experimentação Animal** (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado em reunião de **04.05.2005**.

Este certificado expira-se em **04.05.2010**

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol n° **002/05** related to the project entitled "Pharmacokinetics and body distribution of scorpion antivenom labeled with Tc in rats of 21-22 days old", under the supervision Elzéria de Aguiar Nunan, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation** (CETEA/UFMG) and was approved in **04.05.2005**.

This certificate expires in **04.05.2010**.

Belo Horizonte, 18 de maio de 2005

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cleuza Maria F. Rezende', is written over the printed name.

**Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE**  
PRESIDENTE DO CETEA/UFMG

## ANEXO B - Cálculos e parâmetros estatísticos para o teste de potência do soro não marcado com $^{99m}\text{Tc}$

DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE																						
SERVIÇO DE CONTROLE BIOLÓGICO																						
POTÊNCIA DE SOROS EM CAMUNDONGOS																						
<b>Identificação do Ensaio</b>																						
Tipo de Soro: Antiescorpiónico					No. Lote Veneno: VRF/TS 601					Desafio: 5 DL50												
Lote: AS-040629-31A					DL50 (ug): 19,50					Tempo Incubação a 37°C: 30 min.												
Amostra: Produto Acabado a Granel (PAG)					Sol.Estoque Veneno: 10,0 mg/ml					Via de Administração: IP												
Protocolo: P/099/04					Data Sol.Estoque: 03/12/2004					Sexo: M												
Data do Ensaio: 03/12/2004					Sol.Uso do Veneno: 1,0 mg/ml					Faixa de Peso: 18-22g												
<b>Protocolo do Ensaio</b>										<b>Cálculo dos Probitos</b>												
Nº	Lan.Nº	Dose	Nº de Animais	Solução Salina (ml)	Soro (ml)	Solução Veneno (ml)	Solução Veneno (mg)	Unid	Volume Injetado	Mortes 24h	Mortes 48h	Total Mortes	% Mortes	Log da Dose	Probita Empírico	Probita Esperado	Prob. Min. Op.	Inter valo	Coef. Pond.	Probita Ajustado	Peso	Probita Calculado
+02	1	38,00	8	3,65	0,38	0,97	0,97	mg	0,50	8	0	8	100,00	1,5798	8,72	7,4	-36,89	44,65	0,06	7,77	0,49	7,45
	2	46,00	8	3,57	0,46	0,97	0,97	mg	0,50	7	0	7	87,50	1,6628	6,15	6,6	-1,92	9,02	0,24	5,97	1,90	6,56
	3	58,00	8	3,45	0,58	0,97	0,97	mg	0,50	6	0	6	75,00	1,7634	5,67	5,5	3,54	2,84	0,58	5,67	4,65	5,48
	4	72,00	8	3,31	0,72	0,97	0,97	mg	0,50	3	0	3	37,50	1,8573	4,68	4,5	3,62	2,84	0,58	4,69	4,65	4,47
	5	91,00	8	3,12	0,91	0,97	0,97	mg	0,50	0	0	0	0,00	1,9590	2,00	3,4	2,91	9,02	0,24	2,91	1,90	3,38
Feito por : _____					Inoculado por : _____																	
<b>Cálculos dos Somatórios e das Médias</b>										<b>Análise de Variância</b>												
Soma dos Pesos : 13,59										Fonte de Variação												
Somatório de (X) Ponderado : 24,49										G.L.												
Somatório de (Y) Ponderado : 68,82										x2 calculado												
Somatório de (X)2 Ponderado : 44,27										x2 tabelado												
Somatório de (Y)2 Ponderado : 364,88										Resultado												
Somatório de (XY) Ponderado : 122,65										Regressão 1 14,82 3,84 Significativa												
Soma dos Quadrados de XY Ponderado - (S(XY)W) : -1,38										Desvio de Linearidade 3 1,53 7,82 Não Significativo												
Soma dos Quadrados de X Ponderado - (S(X)W) : 0,13										Total 4 16,34												
Soma dos Quadrados de Y Ponderado - (S(Y)W) : 16,34										<b>Resultados</b>												
Inclinação da Reta - (b) : -10,71										Limites de Confiança												
Média de Y Ponderado : 5,08										Mínimo Máximo Potência (mg/ml)												
Média de X Ponderado : 1,80										DE50 (ul) 64,29 73,81 56,55 1,21												
										Qte. de Passagens: 5												
										Data: 08/12/04												
										Liberado por : DWA												



## ANEXO C - Cálculos e parâmetros estatísticos para o teste de potência do soro marcado com <sup>99m</sup>Tc

### DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE SERVIÇO DE CONTROLE BIOLÓGICO POTÊNCIA DE SOROS EM CAMUNDONGOS

#### Identificação do Ensaio

Tipo de Soro: Antiescorpiônico  
Lote: AS-04062931-A  
Amostra: Produto Final  
Protocolo: Dayana  
Data do Ensaio: 14/07/2005

No. Lote Veneno: VRF/Ts0601  
DL50 (ug): 19,50  
Sol. Estoque Veneno: 10,0 mg/ml  
Data Sol. Estoque: 08/07/2005  
Sol. Uso do Veneno: 1,0 mg/ml

Desafio: 5 DL50  
Tempo Incubação a 37°C: 30 min.  
Via de Administração: IP  
Sexo: F  
Faixa de Peso: 18-22 g

#### Protocolo do Ensaio

#### Cálculo dos Probitos

Nº	Lan. Nº	Dose	Nº de Animais	Solução Salina (ml)	Soro (ml)	Solução Veneno (ml)	Solução Veneno (mg)	Unid	Volum	Mortes 24h	Mortes 48h	Total Mortes	% Mortes	Log da Dose	Probito Empírico	Probito Esperado	Prob. Min. Op.	Infer valo	Coef. Pond.	Probito Ajustado	Peso	Probito Calculado
98	1	38,00	8	3,56	0,47	0,97	0,97	mg	0,50	8	0	8	100,00	1,57978	8,72	7,2	-20,60	28,19	0,09	7,59	0,73	7,17
	2	47,00	7	3,44	0,59	0,97	0,97	mg	0,50	5	1	6	85,71	1,67209	6,07	6,4	0,26	6,68	0,30	5,99	2,11	6,41
	3	59,00	8	3,29	0,74	0,97	0,97	mg	0,50	5	0	5	62,50	1,77085	5,32	5,6	3,42	3,00	0,56	5,30	4,46	5,61
	4	74,00	8	3,10	0,93	0,97	0,97	mg	0,50	6	0	6	75,00	1,86923	5,67	4,8	3,72	2,56	0,63	5,64	5,02	4,80
	5	93,00	8	2,87	1,16	0,97	0,97	mg	0,50	0	0	0	0,00	1,96848	2,00	4	3,34	4,13	0,44	3,34	3,51	3,99

Feito por :

Inoculado por :

#### Cálculos dos Somatórios e das Médias

#### Análise de Variância

Soma dos Pesos :	15,84
Somatório de (X) Ponderado :	28,89
Somatório de (Y) Ponderado :	81,93
Somatório de (X)2 Ponderado :	52,87
Somatório de (Y)2 Ponderado :	442,33
Somatório de (XY) Ponderado :	147,87
Soma dos Quadrados de XY Ponderado - (S(XY)W) :	-1,54
Soma dos Quadrados de X Ponderado - (S(XX)W) :	0,19
Soma dos Quadrados de Y Ponderado (S(Y)W) :	18,60
Inclinação da Reta - (b) :	-8,19
Média de Y Ponderado :	5,17
Média de X Ponderado :	1,82

Fonte de	G.L.	x2 calculado	x2 tabelado	Resultado
Regressão	1	12,65	3,84	Significativa
Desvio de Linearidade	3	5,95	7,82	Não Significativo
Total	4	18,60		

#### Resultados

Qte. de Passagens: 5

DE50 (ul)	Limites de Confiança		Potência (mg/ml)
	Mínimo	Máximo	
89,95	84,72	60,25	1,12

Data:

Liberado por :