

PRISCYLLA TATIANA CHALFUN GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DO VENENO DE
Tityus fasciolatus E SUA AÇÃO SOBRE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada na Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor
em Ciência Animal

Área: Toxicologia e Plantas tóxicas

Orientadora: Profa. Marília Martins Melo

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2009**

G936c Guimarães, Priscylla Tatiana Chalfun, 1974-

Caracterização molecular e imunológica do veneno de *Tityus fasciolatus* e sua ação sobre camundongos / Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães. – 2009.

130 p. : il.

Orientadora: Marília Martins Melo

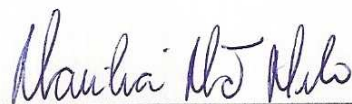
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Camundongo como animal de laboratório – Teses. 2. Escorpião – Veneno – Teses.
3. Envenenamento – Teses. 4. Hematologia – Teses. I. Melo, Marília Martins.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

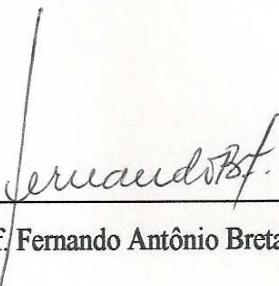
CDD – 615.918

Tese defendida e aprovada em 19 de fevereiro de 2009, pela Comissão Examinadora constituída por:

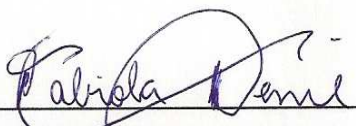


Prof.^a Marília Martins Melo

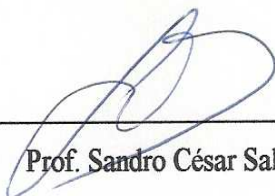
(Orientadora)



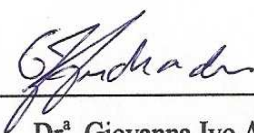
Prof. Fernando Antônio Bretas Viana



Prof.^a Fabiola de Oliveira Paes Leme



Prof. Sandro César Salvador



Dr.^a Giovanna Ivo Andrade

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me fortalece com sua benção, abrindo meus caminhos. Com Ele, ninguém nos detem.

À meu pai e minha mãe, a razão de tudo que faço em minha vida, é por eles que luto e enfrento todos os obstáculos com muito prazer e satisfação.

À minha família, pelo amor e apoio, em especial a minha avó Colete Haddad que me ensinou os princípios de uma vida honesta. Obrigada pelo amor.

À D. Marília, um anjo que Deus colocou em minha vida, obrigada pelo amor e atenção de mãe. Obrigada por me deixar entrar na sua família e fazer parte dela.

À minha orientadora Prof(a). Dr(a). Marília Martins Melo pela dedicação constante para minha vitória nesse doutorado. Obrigada pela oportunidade, paciência, confiança, amizade e principalmente o grande aprendizado na vida profissional e pessoal.

À Prof(a) Dr(a). Zélia pela paciência, ensinamentos e co-orientação para a obtenção de ótimos resultados

Ao Prof. Dr. Jenner pelas valiosas sugestões e atenção.

Ao Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis do Laboratorio de Biotecnologia e Marcadores Moleculares-ICB pela oportunidade e aprendizado na área de Biologia Molecular.

Ao Prof. Dr. Carlos Delfin Chaves Olortegui e sua equipe pela oportunidade e auxílio para a realização deste trabalho

A toda equipe do laboratório de Toxicologia da Veterinária-UFMG, Eduardo, Durval, Márcia, Luana, Carla, Stella, Ana Flavia, Victoria e Felipe muito obrigada pela atenção, carinho e em especial a Mariana pela grande dedicação para alcançarmos excelentes resultados.

Aos amigos do Laboratorio de Biotecnologia e Marcadores Moleculares-ICB, Arthur, Higgor, Ana Luiza, Ana Paula, Carolina, Ana Carolina, Gabriel, Juliana, André e Bárbara pela ajuda, amizade e companherismo durante o tempo que passamos juntos.

À Thais, o outro anjo que Deus colocou na minha vida. Pela valiosa ajuda me enriquecendo com os conhecimento na área de biologia molecular e principalmente por nunca me negar uma ajuda pessoal e profissional.

À Thalita e Sabrina, minhas amigas e irmãs, obrigada pela paciência, carinho e compreensão durante esses 4 anos.

Aos funcionários da Escola de Veterinária-UFMG pelo carinho e auxílio para realização deste trabalho.

Aos funcionários da Pós-graduação da Escola de Veterinária-UFMG pelo atenção e apoio durante esses 4 anos.

Aos membros da banca examinadora pelos elogios e críticas construtivas.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

A equipe da FUNED pelas sugestões e auxílio para o desenvolvimento deste projeto.

Ao centro de Zoonoses de Ituiutaba pela doação das espécies de *Tityus*

Aos meus amigos de Liverpool que me fizeram sentir em casa me recebendo com todo carinho e atenção.

Em especial ao Dr. Robert Harrison por ter sido um orientador e amigo me ensinando e apoiando nos momentos felizes e difíceis e sua equipe, Dr. David Theakston, Dr. Gavin, Dr. Darren e Dr. Simon pelo apoio durante os 15 meses que permaneci no grupo. Obrigada pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Aos animais meu respeito e amor. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. Escorpiões	20
2.1.1. Distribuição geográfica e classificação dos escorpiões	20
2.1.2. Aspectos epidemiológicos	22
2.2. Manifestações clínicas	23
2.2.1. Alterações sanguíneas	25
2.3. Diagnóstico	27
2.4. Composição do veneno	29
2.4.1. Toxinas escorpiônicas e seus mecanismos de ação	29
2.4.2. Estrutura molecular das toxinas	31
2.4.3. Toxinas que atuam nos canais de sódio	32
2.4.4. Toxinas que atuam nos canais de potássio	33
2.4.5. Toxinas que atuam nos canais de cloro	33
2.4.6. Toxinas que atuam nos canais de cálcio	33
2.4.7. Toxinas sem ponte dissulfeto	33
2.5. Resposta imune (Soroterapia e vacinas)	34
2.6. Nomenclatura das toxinas	39
2.7. Veneno do <i>Tityus fasciolatus</i>	40
2.8. Veneno do <i>Tityus serrulatus</i>	41
2.9. Homologia entre os venenos	43
3. OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo geral	43
3.2. Objetivos específicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. Veneno e sua extração	43
4.1.1. <i>Tityus fasciolatus</i>	43
4.1.2. <i>Tityus serrulatus</i>	45
4.2. Caracterização clínica do veneno	46
4.2.1. Determinação da DL ₅₀	46
4.2.2. Avaliação anátomo-histológica	46
4.2.3. Avaliação hematológica, bioquímica sérica e plasmática	46
4.2.4. Exames laboratoriais	47
4.3. Caracterização molecular do veneno	47
4.3.1. Extração e purificação do RNA (Ácido ribonucleico)	49
4.3.2. Construção do cDNA da glândula de veneno	50
4.3.3. Padronização da RT-PCR	50
4.3.4. Purificação do cDNA a partir do gel de agarose 1%	51
4.3.5. Ligação do amplicon no vetor de clonagem	51
4.3.6. Preparação de bactérias competentes	52
4.3.7. Transformação da linhagem <i>E. coli</i> XL1 <i>Blue</i>	53
4.3.8. Purificação do plasmídeo	53

4.3.9. Amplificação do cDNA	54
4.3.10. Sequenciamento	54
4.3.11. Análises computacionais das sequências obtidas	55
4.3.12. Desenho dos iniciadores após resultado do sequenciamento.....	55
4.4. Caracterização imunológica.....	56
4.4.1. Imunização dos animais.....	56
4.4.2. SDS-PAGE do veneno bruto e eletroforese em gel de poliacrilamida	57
4.4.3. Western Blotting	57
4.4.4 Soroneutralização	57
4.5. Análise estatística	58
4.6. Ética em experimentação animal	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. Parte I – Estudo Clínico	59
5.1.1. DL ₅₀	59
5.1.2. Alterações macroscópicas.....	61
5.1.3. Alterações microscópicas.....	62
5.1.4. Manifestações clínicas	66
5.1.5. Alterações hematológicas	69
5.1.6. Bioquímica Sérica.....	81
5.2. Parte II - Estudo Molecular.....	93
5.2.1. Caracterização Molecular	93
5.3. Parte III - Estudo Imunológico	104
5.3.1. SDS-PAGE e Western Blotting	104
5.3.2. Soroneutralização <i>in vivo</i>	109
6. CONCLUSÕES	111
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
9. ANEXO	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Divisão dos grupos (tratamentos)	47
Tabela 2-	Quantidade de reagentes utilizados na RT-PCR	51
Tabela 3-	Descrição de programa utilizado na RT-PCR	51
Tabela 4-	Quantidade de material utilizado na ligação do inserto ao vetor	52
Tabela 5-	Quantidade de reagentes utilizados no sequenciamento	55
Tabela 6-	Descrição do programa utilizado no sequenciamento	55
Tabela 7-	Quantidade de reagentes utilizados na segunda RT-PCR	56

Tabela 8-	Descrição do programa utilizado para realização da segunda RT-PCR	56
Tabela 9-	Doses de veneno do <i>Tityus fasciolatus</i> inoculadas via subcutânea nos camundongos e porcentagem de mortes (primeiro intervalo)	60
Tabela 10-	Doses de veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> inoculadas por via subcutânea nos camundongos e porcentagem de mortes (segundo intervalo).	60
Tabela 11-	Valores médios do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	71
Tabela 12-	Valores médios das concentrações de hemoglobina (g/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	72
Tabela 13-	Valores médios do volume globular (%) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	73
Tabela 14-	Valores médios de hemoglobina globular média, HGM (pg), volume globular médio, VGM (g/dl) e concentração de hemoglobina globular média, CHGM (fl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	74
Tabela 15-	Valores médios do numero total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	75
Tabela 16-	Valores médios absolutos de neutrófilos e linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	76
Tabela 17-	Valores médios absolutos de monócitos e eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	77
Tabela 18-	Valores normais para proteínas séricas (%) de camundongos.	78

Tabela 19-	Valores médios das concentrações de proteínas plasmáticas (g/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	78
Tabela 20-	Valores médios de albumina (g/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	79
Tabela 21-	Valores médios das α , β e γ -globulinas (g/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	80
Tabela 22-	Valores médios de CK total (U/l) e CK-MB (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	81
Tabela 23-	Porcentagem da isoenzima CK-MB em relação a CK total	83
Tabela 24-	Valores médios de AST (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	84
Tabela 25-	Valores médios de LDH (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	84
Tabela 26-	Valores médios de uréia (mg/dl) e creatinina (mg/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	87
Tabela 27-	Valores médios séricos de amilase (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	89
Tabela 28-	Valores médios de glicose (mg/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	90
Tabela 29-	Valores médios de cortisol (ng/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	92

LISTA DE FIGURAS		
------------------	--	--

Figura 1-	Espécie <i>Tityus serrulatus</i> .	22
Figura 2-	Espécie <i>Tityus fasciolatus</i> .	22
Figura 3-	Distribuição mundial dos escorpiões (Lourenço, 2002).	22
Figura 4-	<i>Exemplar de T. fasciolatus</i> .	44
Figura 5-	Extração manual de veneno de <i>T. fasciolatus</i> .	45
Figura 6-	Metologia empregada na caracterização molecular do veneno de <i>Tityus fasciolatus</i>	49
Figura 7-	Vetor de clonagem pCR2.1-TOPO utilizado para clonagem dos genes.	52
Figura 8-	Áreas de hemorragias nos pulmões do camundongo que veio à óbito após a inoculação de 62,9µg do veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> .	61
Figura 9-	Área de hemorragia na região torácica do camundongo que veio à óbito após a inoculação de 62,9µg do veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> .	62
Figura 10-	Congestão de vasos cerebrais do camundongo que veio à óbito após a inoculação subcutânea de 62,9µg do veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> .	62
Figura 11-	Histologia do coração (HE, 60x) do camundongo que veio à óbito após a inoculação subcutânea de 62,9µg do veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> .	64
Figura 12-	Histologia do pulmão (HE, 60x) do camundongo que veio à óbito após a inoculação subcutânea de 62,9µg do veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> .	65
Figura 13-	Histologia do cortex cerebral (HE, 60x) do camundongo que veio à óbito após a inoculação subcutânea de 62,9µg do veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> .	66
Figura 14-	Sequenciamento e análise das sequências. Em A, B e C, sequências obtidas no MegaBase semelhante a TsNTxP, TsIV e TsVII com resultado da análise no Blastx.	95
Figura 15-	Alinhamento da sequência de nucleotídeos de toxinas de <i>Tityus serrulatus</i> e <i>Tityus fasciolatus</i> para obtenção de novos iniciadores. Sequência de DNA correspondente ao mRNA da toxina TsNTxP de <i>Tityus serrulatus</i> .	96

Figura 16-	Alinhamento da sequência de nucleotídeos de toxinas de <i>Tityus serrulatus</i> e <i>Tityus fasciolatus</i> para obtenção de novos iniciadores. Sequência de DNA correspondente ao mRNA da toxina TsIV de <i>Tityus serrulatus</i> .	97
Figura 17-	Alinhamento da sequência de nucleotídeos de toxinas de <i>Tityus serrulatus</i> e <i>Tityus fasciolatus</i> para obtenção de novos iniciadores. Sequência de DNA correspondente ao mRNA da toxina TsVII de <i>Tityus serrulatus</i> .	98
Figura 18-	Resultado do segundo sequenciamento.	99
Figura 19-	Alinhamento da sequência de aminoácidos da toxina de <i>Tityus fasciolatus</i> (Tf1) com outras toxinas do tipo beta de escorpiões do gênero <i>Tityus</i> .	100
Figura 20-	Alinhamento da toxina de <i>Tityus fasciolatus</i> (Tf3) com outras toxinas de escorpiões.	100
Figura 21-	Alinhamento da toxina de <i>Tityus fasciolatus</i> (Tf4a) com outras toxinas de escorpiões do gênero <i>Tityus</i> .	101
Figura 22-	SDS-PAGE dos principais componentes do veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> e <i>Tityus serrulatus</i> .	106
Figura 23	SDS-PAGE dos principais componentes do veneno de <i>Tityus fasciolatus</i>	107
Figura 24-	Identificação da antigenicidade por Western blotting entre os componentes presentes no veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> e <i>Tityus serrulatus</i> .	108

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Valores médios do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	71
Gráfico 2-	Valores médios das concentrações de hemoglobina (g/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	72
Gráfico 3-	Valores médios do volume globular (%) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	73

Gráfico 4-	Valores médios de hemoglobina globular média, HGM (pg), volume globular médio, VGM (g/dl) e concentração de hemoglobina globular média, CHGM (fl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	74
Gráfico 5-	Valores médios do numero total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	75
Gráfico 6-	Valores médios absolutos de neutrófilos e linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	76
Gráfico 7-	Valores médios absolutos de monócitos e eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	77
Gráfico 8-	Valores médios das concentrações de proteínas plasmáticas (g/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	79
Gráfico 9-	Valores médios de albumina (g/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	80
Gráfico 10-	Valores médios das α , β e γ -globulinas (g/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	81
Gráfico 11-	Valores médios de CK total (U/l) e CK-MB(U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	82
Gráfico 12-	Porcentagem da isoenzima CK-MB em relação a CK total.	83
Gráfico 13-	Valores médios de AST (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	84

Gráfico 14-	Valores médios de LDH (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	85
Gráfico 15-	Valores médios de uréia (mg/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	87
Gráfico 15	Valores médios de creatinina (mg/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	88
Gráfico 16-	Valores médios séricos de amilase (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	90
Gráfico 17-	Valores médios de glicose (mg/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	91
Gráfico 18-	Valores médios de cortisol (ng/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de <i>Tityus fasciolatus</i> (grupo II) e <i>Tityus serrulatus</i> (grupo III) em diferentes tempos.	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Uniformização da nomenclatura das toxinas de <i>Tityus serrulatus</i>	40
Quadro 2-	Toxinas purificadas do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> nas décadas de 60 a 80	42
Quadro 3-	Resultado da Soroneutralização <i>in vivo</i>	110

LISTA DE ABREVIATURAS	
-----------------------	--

Aa	Aminoácidos
ADP	Adenosina difosfata
ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	Adenosina mono-fosfato cíclico
AST	Aspartato-aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfata
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Soro Albumina Bovina
cDNA	DNA complementar
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CK	Creatina quinase
CK-BB	Creatina quinase isoenzima BB
CK-MB	Creatina quinase isoenzima MB
CK-MM	Creatina quinase isoenzima MM
cTnI	Troponina I cardíaca
DEPC	Dietil pirocarbonato
dl	Decilitro
DL ₅₀	Dose letal de 50%
DNA	Ácido dexorribonucléico
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HE	Hematoxilina-eosina
ICK	Inhibitory cystine Knot
IL	Interleucina
INF	Interferon
Kb	Quilobase
kDa	Quilo Dalton
Kg	Quilograma
Lb	Meio de cultura Luria-Bertani
LD ₁	Lactato desidrogenase isoenzima 1
LDH	Lactato-desidrogenase
M	Molar
mg	Miligrama
Mg	Micrograma
ml	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
μl	Microlitro
mM	Mili-Molar
mm	Micrômetro
N	Normal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ng	Nanograma
°C	Graus Celsius

PAGE	Eletróforese em gel de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão salina fosfato
PBST	Tampão salina fosfato Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrofeniônico
PSA	Persulfato de amônia
PTC	<i>Programmable Thermal Controller</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com SDS
SEE	Síndrome do envenenamento escorpiónico
SNC	Sistema nervoso central
TAE	Tampão tris, Ácido acético, EDTA
TE	Tampão tris e EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
TsNTxP	<i>Tityus serrulatus non-toxic protein</i>
U	Unidade de enzima
UV	Ultra-violeta
V	Volts

LISTA DE ABREVIATURAS DE NOMES DE ESCORPIÕES

<i>T. bahiensis</i>	<i>Tityus bahiensis</i>
<i>T. brazilae</i>	<i>Tityus brazilae</i>
<i>T. cambridgei</i>	<i>Tityus cambridgei</i>
<i>T. charreyroni</i>	<i>Tityus charreyroni</i>
<i>T. costatus</i>	<i>Tityus costatus</i>
<i>T. fasciolatus</i>	<i>Tityus fasciolatus</i>
<i>T. lamottei</i>	<i>Tityus lamottei</i>
<i>T. mattogrossensis</i>	<i>Tityus mattogrossensis</i>
<i>T. metuendus</i>	<i>Tityus metuendus</i>
<i>T. neglectus</i>	<i>Tityus neglectus</i>
<i>T. serrulatus</i>	<i>Tityus serrulatus</i>
<i>T. stigmurus</i>	<i>Tityus stigmurus</i>
<i>T. trivittatus</i>	<i>Tityus trivittatus</i>

RESUMO

Objetivou-se estudar o veneno do escorpião da espécie *Tityus fasciolatus*, encontrada no Brasil Central, por meio da caracterização molecular, determinação, da dose letal e sua ação refletida nos componentes hematológicos, bioquímicos, anatomo-histopatológicos e imunológicos, utilizando-se o camundongo como modelo experimental. Sessenta camundongos *Swiss CF1*, machos (18-20g) foram utilizados para determinar a DL_{50} do veneno bruto de *T. fasciolatus* por via subcutânea (SC). Durante o desafio da DL_{50} , foi realizado o exame anatomo-histopatológico dos animais que vieram a óbito. Para o estudo do perfil hematológico e da bioquímica sanguínea foram utilizados cinquenta camundongos *Swiss CF1*, machos, 30g distribuídos em três grupos (n=18), inoculados via SC com 50 μ l de PBS (G1), 24 μ g de veneno de *T. fasciolatus* (G2) e 8 μ g veneno de *T. serrulatus* (G3). Cada grupo foi subdividido em três subgrupos (n=6) de acordo com o momento da coleta de sangue, que foi feita 1, 8 e 24h após a inoculação do veneno, e realizados hemograma e dosagem de cortisol, uréia, creatinina, creatina quinase e isoenzima MB, aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase, amilase, glicose, proteínas totais e frações. A avaliação molecular foi realizada pela extração e purificação do RNA e técnica de RT-PCR, tendo como moldes iniciadores oriundos da sequência de toxinas do veneno de *T. serrulatus*. Foi utilizada a técnica de SDS-PAGE e Western Blotting para verificação do perfil protéico das proteínas e reação antigênica cruzada entre as toxinas dos venenos e, a capacidade de neutralização do soro anti-*T. serrulatus* contra o veneno de *T. fasciolatus*. A DL_{50} do veneno de *T. fasciolatus* para camundongo foi de 59,65 μ g/camundongo. Foram observadas alterações histopatológicas no coração, pulmão e cérebro dos camundongos que vieram á óbito. O veneno de *T. fasciolatus*, na dose de 24 μ g, causou piloereção, comportamento nociceptivo, secreção nasal e oral acentuadas, dispnéia, prurido na face, reflexos exacerbados, policitemia e leucocitose com linfocitose. O veneno de *T. fasciolatus* mostrou similaridade ao veneno de *T. serrulatus*, reatividade e neutralização cruzadas. A metodologia adotada, utilizando iniciadores desenhados a partir do veneno de *T. serrulatus* e RT-PCR, se mostrou eficaz para o isolamento e obtenção de clones contendo sequências correspondentes aos transcritos de mRNA presentes na glândula de veneno de *T. fasciolatus*, como a identificação de Tf1, Tf3 e Tf4a. O soro anti-*T. serrulatus* foi capaz de neutralizar o veneno de *T. fasciolatus* no estudo *in vivo*.

Palavras-chave: *Tityus fasciolatus*, toxina escorpiônica, DL_{50} , camundongos, envenenamento, hematologia.

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the specie *Tityus fasciolatus* scorpion found in the Central of Brazil. This study was performed through molecular characterization, lethal dose and biochemical, anatomo-histopathological and immunological alterations in mice. Sixty *Swiss* CF1 mice, male, (18-20kg) were used to determine lethality assays *T. fasciolatus* (LD₅₀) by subcutaneous injection (SC). The anatomo-histopathological examination was performed with the animals who died during the lethality assays (LD₅₀). To study the blood profile and biochemistry fifty *Swiss* CF1 mice, male, 30g were used divided into three groups (G) (n= 18) SC with: 50µl of PBS (G1), 24µg of venom of *T. fasciolatus* (G2) and 8µg venom of *T. serrulatus* (G3). Each group was subdivided into three subgroups (n = 6) according to the time of blood sample was taken at 1h , 8h and 24h after inoculation of the venom. It was investigated blood profile and levels of cortisol, urea, creatinine, creatine kinase, MB isoenzyme, aminotransferase aspartate, lactate dehydrogenase, amylase, glucose, total protein and fractionated. The molecular characterization was evaluated by molecular extraction and purification of RNA and RT-PCR technique with primers from the sequence of toxin from venom of *T. serrulatus*. The antigenic cross-reaction between the toxins of venoms and neutralization ability the anti-*T. serrulatus* against that of the *T. fasciolatus* was determined by using the Western Blotting technique. The protein concentration was determined by SDS-PAGE. The LD₅₀ of the venom of *T. fasciolatus* for mice was 59.65mg. Histopathological changes were observed in heart, lung and brain of mice who died. The venom of *T. fasciolatus* at a dose of 24µg caused piloerection, nociceptive behavior, nasal and oral sharp, dyspnoea, itching on the face and reflexes exacerbated, polycythemia, leukocytosis with lymphocytosis. The venom of *T. fasciolatus* showed similarity with the venom of *T. serrulatus*, reactivity and cross-neutralization. The methodology with primers from the venom of *T. serrulatus* and RT-PCR was effective for the isolation and obtain clones containing sequences corresponding to the mRNA transcripts from the venom gland of *T. fasciolatus* such as Tf1, Tf3 and Tf4a. In the neutralization assays the antivenon anti-*T. serrulatus* was able to effectively neutralize the venom of *T. fasciolatus*.

Keywords: *Tityus fasciolatus*, scorpion toxin, LD₅₀, mice, envenomation, blood profile.

1. INTRODUÇÃO

A produção de substâncias tóxicas como forma de defesa é um mecanismo desenvolvido por muitas espécies de plantas e animais ao longo da evolução, conferindo-lhes uma variabilidade e aumentando a biodiversidade entre estas.

Uma substância produzida por um animal pode adquirir toxicidade através da transformação metabólica obtida pela alimentação, pelo armazenamento de toxinas de outros organismos (bactérias, plantas ou outros animais) ou, pela produção de suas próprias proteínas tóxicas, através da expressão de seus genes.

Toxinas podem ter diferentes atividades biológicas (locais ou sistêmicas); ser sítio-específicas ou não; ser formadas por diferentes tipos de compostos químicos; apresentar numerosos peptídeos em sua estrutura molecular; participar de processos enzimáticos, de inibição, de exacerbação ou de modulação de funções (Gazarian et al., 2005).

Os escorpiões, como muitos artrópodes, produzem venenos bem adaptados para matar ou paralisar presas, especialmente insetos. A purificação de componentes tóxicos do veneno bruto dos escorpiões e a análise dos seus efeitos são os principais interesses de diversos pesquisadores em todo o mundo (Kalapothakis, 2000).

O escorpionismo é um problema encontrado em muitos países, em áreas de clima tropical e subtropical, especialmente nos centros urbanos

(Cupo et al., 1994; Davila et al., 2002). Cerca de 50 das mais de 1600 espécies de escorpiões conhecidas em todo o mundo são nocivas para os humanos, devido ao alto grau de toxicidade (Gazarian et al., 2005).

No Brasil, os escorpiões comprovadamente perigosos pertencem ao gênero *Tityus*. Embora ocorram quase 30 espécies desse gênero no país, as responsáveis ou suspeitas de provocar casos de envenenamentos em humanos restringem-se às seguintes: (1) complexo *Tityus stigmurus* – inclui os escorpiões atualmente identificados como *T. stigmurus* (Thorell 1876), *T. serrulatus* (Lutz e Mello, 1922), *T. lamottei* (Lourenço, 1981) e outras espécies não nominadas. É o grupo mais importante do ponto de vista do escorpionismo no Brasil e também o mais complexo, devido aos padrões de polimorfismo apresentados. O grupo é encontrado nos estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Distrito Federal, norte do Paraná e São Paulo. Por este motivo, a identificação correta das formas envolvidas em acidentes por profissionais não especialistas é muito difícil. (2) a espécie polimórfica *T. bahiensis* (Perty 1834), encontrada desde a Bahia até Santa Catarina e também descrita no Mato Grosso do Sul; (3) a espécie polimórfica, *T. costatus* (Karsch 1879), distribuída desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, na zona costeira da Mata Atlântica; (4) *T. trivittatus* Kraepelin (1898), espécie monomórfica que ocorre apenas em algumas localidades do Mato Grosso do Sul e do extremo oeste de São Paulo; (5) *T. metuendus* e *T. cambridgei* (Pocock, 1897), espécies de

grande porte e pigmentação negra que vivem nas matas da região amazônica; (6) *T. braziliae*, *T. neglectus* e *T. mattogrossensis*, responsabilizadas por acidentes de pequena gravidade na Bahia e, (7) *T. fasciolatus*, presente no Distrito Federal e Minas Gerais (Triângulo Mineiro) e *T. charreyroni* existente em Goiás (Lourenço et al., 1997; Barbosa et al., 2002; Soares et al., 2002; Lourenço e Eicksted, 2003; Pardal et al., 2003; Wagner et al., 2003).

Em 1998, ocorreram no Brasil 10.000 acidentes com escorpiões, com uma taxa de mortalidade que chegou a 12,5% entre crianças. Em 2001, as notificações se elevaram para 18.000 casos e, em 2006, mais de 36.000 casos foram notificados, com uma incidência anual de 16 casos/100.000 habitantes (Manual...2001). Em 2008, 856 casos foram atendidos no Hospital João XXIII em Belo Horizonte¹.

Cinquenta por cento dos casos humanos notificados no Brasil ocorreram nos estados de Minas Gerais e São Paulo (Chavez-Olórtegui et al., 1994). Esta alta incidência no Estado de Minas Gerais contribui para aumentar o interesse dos pesquisadores pelos escorpiões e seus venenos, especialmente por seu potencial toxicológico. Ressalta-se que pouco se sabe sobre a composição do veneno do *T. fasciolatus* e praticamente nada se sabe da ação deste veneno sobre os tecidos e as células sanguíneas.

¹ Comunicação Pessoal. Dr. Délio Campolina. Responsável pelo setor de Toxicologia do Hospital João XXIII-Belo Horizonte.

O veneno de escorpião é composto por proteínas neurotóxicas de baixo peso molecular, associadas a aminoácidos livres e sais. Contém um grande número de peptídeos e proteínas com 58-76 resíduos de aminoácidos e um número similar de 20-40 (Moreira-Ferreira et al., 1998; Castro, et al., 2000; Wagner et al., 2003).

Para facilitar a obtenção de toxinas, as proteínas do veneno são purificadas, usando-se métodos clássicos da bioquímica, como a cromatografia. Porém, este método é lento, caro e requer grande volume de veneno. Atualmente, têm sido empregados métodos mais modernos, como genética molecular, com o intuito de isolar novas proteínas. A genética molecular emprega métodos cada vez mais eficiente no isolamento de genes que codificam toxinas através da técnica de DNA recombinante.

Diante deste contexto, surgem várias questões: Qual é o perfil molecular do veneno de *T. fasciolatus* e como caracterizá-lo? Quais seriam os efeitos desse veneno sobre as células sanguíneas, sobre os tecidos, as alterações bioquímicas e anatomo-histopatológicas que causa, além do comportamento imunológico?

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Escorpiões

2.1.1. Distribuição Geográfica e classificação dos escorpiões

Os escorpiões pertencem ao grupo dos primeiros animais que apareceram na terra, há aproximadamente 400 milhões

de anos (Cupo et al., 2003). Escorpiões são artrópodes que pertencem ao filo dos *Artropoda*, à classe *Arachnida* e ordem *Scorpionida*. São distribuídos em nove famílias e hoje 1600 espécies são conhecidas. A família com a mais ampla distribuição no Brasil e no mundo e, além de sua maior importância do ponto de vista epidemiológico, é a *Buthidae* (Dias et al., 2001).

Os escorpiões podem ser divididos em duas categorias ecológicas, equilíbrio e oportunistas, dependendo do tipo de ambiente que eles habitam e sua estratégia de vida. Espécies de equilíbrio ocupam ambientes estáveis e naturais, enquanto as espécies oportunistas, como os *Tityus* spp., podem rapidamente se adaptar a diferentes ambientes (Lourenço et al., 1996). A classificação dos escorpiões tem mudado significativamente nos últimos 10 anos. Especialistas têm reconhecido o dobro do número de famílias aceitas até 1990. A técnica de análise de DNA e, especialmente, os estudos moleculares, tem ajudado na definição de uma linhagem natural dos escorpiões (Lourenço, 2001).

Todos os escorpiões possuem veneno, sendo que alguns são perigosos ao homem, podendo até matar. Estes pertencem à família *Buthidae*, onde encontram-se 48 gêneros e aproximadamente 1400 espécies, sendo que 25 letais a humanos. A família *Buthidae* possui quatro subfamílias, as quais são responsáveis pelos casos mais graves, *Isometrinae*, *Buthinae* - *Androctonus*, *Buthus*, *Leiurus*, *Buthatus* e *Heterometrus* (norte da África, Oriente Médio, Índia), *Centrurinea* -

Centruroides (América do Norte e Central) e *Tityinea* - *Tityus* (América do Sul e Trindade e Tobago). As espécies mais venenosas pertencentes a essa família são *Androctonus* (Argélia), *Leiurus quinquestriatus* (Israel e Jordânia), *Centruroides* (México), *Buthus occitanus* (Jordânia), *Tityus serrulatus* (Brasil), *Parabuthus* (África do Sul), *Buthus occitanus* (Saara), *Tityus trinitatis* (Trindade) e *Centruroides sculpturatus* (América do Norte) (Lira-da-Silva et al., 2000; Murthy e Haghazari, 1999; Lourenço, 2001).

No Brasil, o grupo de escorpiões mais perigosos é representado pelo gênero *Tityus* (família *Buthidae*), que está distribuído por todo o país (Lourenço, 2003; Wagner et al., 2003), sendo as espécies mais responsáveis pelos acidentes *Tityus serrulatus* (Fig. 1), *Tityus bahienses*, *Tityus stigmurus*, *Tityus cambridgei*, *Tityus trivittatus* e *Tityus fasciolatus* (Fig. 2). A espécie de escorpião mais estudada, em especial na região Sudeste, é a *Tityus serrulatus*, o escorpião amarelo. Dos 10.000 acidentes anuais no Brasil, 50% são diagnosticados nos estados de Minas Gerais e São Paulo (Revelo et al., 1996; Diego-Garcia et al., 2005). Em Minas Gerais, a letalidade pode chegar a 12,5%, mas, na capital mineira, onde os acidentados podem ser socorridos em serviços especializados, este número diminui (Soares et al; 2002).

Na Amazônia se encontra os escorpiões *Tityus cambridgei*, *Tityus silvestris*, *Tityus metuendus*, entre outros. Apesar de *Tityus cambridgei* ser a espécie mais frequente na Amazônia Ocidental,

existem poucos relatos de acidentes com o mesmo (Pardal et al., 2003). Na região do cerrado brasileiro, Lourenço (2003) descreveu a ocorrência

de duas espécies: *Tityus fasciolatus* (Pessoa) e *Tityus charreyroni* (Vellard).



Figura 1- Espécie *Tityus serrulatus*



Figura 2 – Espécie *Tityus fasciolatus*

2.1.2. Aspectos epidemiológicos

O escorpionismo desponta, no Brasil, como um dos maiores problemas de saúde pública. Além do Brasil, o escorpionismo afeta vários países subtropicais como México, Tunísia, Marrocos, África do Sul, Egito e

Estados Unidos (Fig. 3). As espécies comumente associadas aos acidentes com escorpiões no Brasil são *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*, mas em Brasília e Goiás os acidentes que ocorrem são atribuídos aos *Tityus serrulatus* e *Tityus fasciolatus* (Pardal et al., 2003).

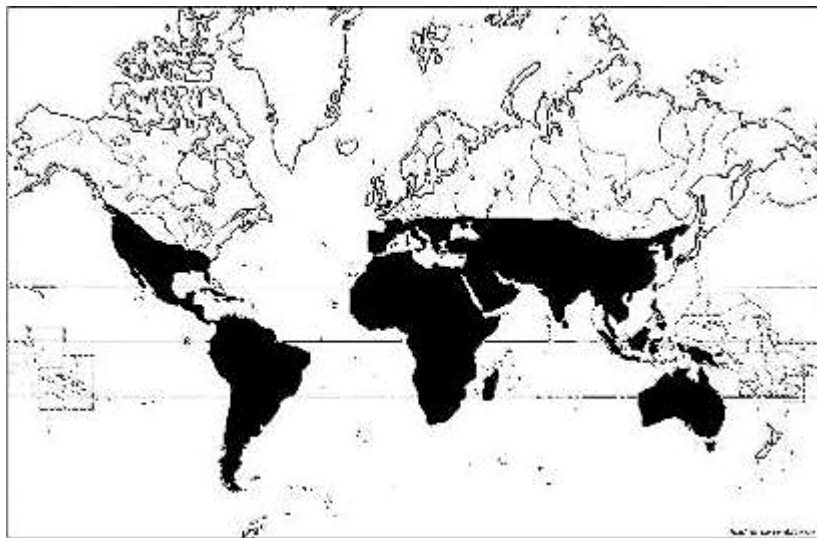


Figura 3- Distribuição mundial dos escorpiões (Lourenço, 2002)

Tityus fasciolatus é uma espécie endêmica encontrada na região central do Brasil (Goiás) e parte de Minas Gerais (Triângulo Mineiro), sendo responsável por muitos casos de acidentes nesta área. Muitos escorpiões da família Buthidae são considerados como espécies oportunistas, embora os *T. fasciolatus* sejam termitófilos e se abriguem exclusivamente em cupinzeiros *Armitermes euamignathus* Silvestri. Com a variação da composição do solo, a vegetação modifica e quando a relva não permanece por muito tempo, o cupinzeiro e o *Tityus fasciolatus* desaparecem (Lourenço, 1995, Lourenço, 2003).

Os acidentes podem assumir um perfil epidemiológico grave em algumas áreas e sob certas condições. Além do clima tropical e de estações chuvosas, os escorpiões possuem a seu favor a alta adaptabilidade. São muito adaptados ao ambiente urbano, onde têm alimentação farta e não possuem os competidores que teriam no meio silvestre, tais como macaco, quati, seriema e sapo. Certos locais, como Belo Horizonte, são considerados localizados em “solo escorpionífero” (Bucherl, 1969, Soares et al, 2002, Alves et al., 2005). Apesar de Minas Gerais e São Paulo serem os estados com maior frequência de acidentes escorpiônicos, estes ocorrem em quase todos os demais (Soares et al., 2002).

Vários peptídeos básicos do veneno de *Tityus serrulatus* têm atividades neurotóxicas, levando a aproximadamente 1% de mortalidade (Kalapothakis e Chávez-olórtegui 1997).

Em 1988, iniciou-se a notificação dos acidentes escorpiônicos (Manual..., 2001). Considera-se leve a maioria dos acidentes por escorpiões no Brasil, sendo que, nos casos graves, a letalidade chega a 0,58%, sendo o óbito é associado aos acidentes com *Tityus serrulatus* (Pardal et al., 2003).

Em Ituiutaba, região do Triângulo Mineiro, escorpiões da espécie *Tityus fasciolatus* têm sido capturados pelo Centro de Zoonoses e, segundo os dados do mesmo, ocorreram 158 acidentes no período de 1995 a 1997, cujos casos foram atendidos no Hospital Municipal. Ao contrário do que se observam em outros dados de regiões tropicais, os acidentes ocorreram em maior número na seca, com 24 casos no mês de julho, enquanto no período chuvoso foram atendidos apenas três casos. Não foram pesquisadas as espécies de escorpião envolvidas nesses acidentes (Plazzi et al. 2000).

2.2. Manifestações clínicas

O escorpião injeta seu veneno na camada subcutânea e intradérmica da vítima e este posteriormente vai para circulação sanguínea, sendo absorvido em poucas horas. A gravidade do envenenamento causado pelo escorpião *T. serrulatus* está relacionada com a concentração do veneno no plasma e nos sítios de ação (Rezende et al., 1996).

As substâncias inoculadas pela via subcutânea têm uma maior taxa de absorção e caem diretamente na corrente sanguínea (Klaasen e Rozman, 1994). Parâmetros farmacocinéticos do

veneno de *Tityus serrulatus*, determinados por ELISA após injeção subcutânea em ratos, mostraram (1) que a absorção do veneno do tecido subcutâneo para o compartimento central é rápida; (2) que a distribuição para os tecidos é rápida, sendo de 30 minutos a meia-vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$); (3) que a afinidade por tecidos é alta, já que a velocidade de distribuição do compartimento central para os tecidos foi 28 vezes maior que na direção oposta e (4) que a excreção é lenta, observando-se que a meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) é 5,5 vezes maior que a meia-vida de distribuição (Santana et al., 1996).

Hialuronidases, componentes não tóxicos do veneno de *Tityus serrulatus*, podem contribuir para a rápida absorção e difusão do mesmo através dos tecidos, podendo até mesmo, restringir a eficácia da soroterapia (Pessini et al., 2001).

Nunan et al. (2003, 2004) mostraram que há diferenças de valores toxicocinéticos entre ratos jovens (21-22 dias) e adultos (150-160 dias). Após utilização da tityustoxina (TsTX) do veneno de *Tityus serrulatus* marcada com tecnécio, foi demonstrado, por cintilografia, que animais jovens apresentam absorção e distribuição pelos tecidos (coração, tireóide, pulmões, baço, rins e fígado) mais altas e mais rápidas, com eliminação mais lenta, inclusive com concentração da toxina no cérebro, cinco minutos após a aplicação, de 17 vezes maior.

O efeito do veneno depende da idade do escorpião, quantidade injetada, estação do ano e idade e peso da vítima (Murthy e Haghazari, 1999).

O envenenamento por escorpião pode levar a um complexo conjunto de sintomas clínicos devido à alteração nos sistemas nervoso, cardiovascular e respiratório, podendo ocasionar insuficiência cardíaca e edema pulmonar óbito (Cupo e Hering, 2002; Moreira-Ferreira et al., 1998).

O primeiro sinal clínico é a dor local que nos envenenamentos mais graves pode não ser observada devido às manifestações sistêmicas (Dias et al., 2001). Os efeitos fisio-farmacológicos induzidos pelas toxinas escorpiônicas são devidos à ação específica nos canais de sódio, seguido da despolarização da membrana das células excitáveis e posterior liberação de catecolaminas e acetilcolina pelas terminações nervosas dos sistemas simpático e parassimpático e zona medular adrenal. Dessa forma, as toxinas agem em diferentes sítios do organismo, levando ao aparecimento do quadro clínico. O agravamento dessas alterações pode se complicar, levar o desenvolvimento de insuficiência cardio-circulatória, edema pulmonar agudo, choque e consequente morte (Manual... 2001).

Rezende et al. (1998) relataram os seguintes achados clínicos dos pacientes atendidos no Hospital João XXIII: dor local, emese, taquipnéia, sudorese, agitação, sonolência, ruídos na respiração, arritmias cardíacas, hipertermia, dispnéia, prostração, insuficiência cardíaca, edema pulmonar, hipotermia, bradicardia, palidez, tremores, hipertensão, diminuição da perfusão capilar, confusão mental, convulsão e parada cardíaca.

Pardal et al. (2003), no Estado do Pará, relataram que as manifestações sistêmicas decorrentes de acidentes com escorpiões ocorreram em 98,6% das vítimas, sendo que predominaram as alterações neurológicas sobre as autonômicas, diferindo então dos envenenamentos por escorpiões em outros estados do Brasil, demonstrando assim um comportamento clínico regional do escorpionismo na região de Santarém (PA).

A função exócrina dos pâncreas altera nas intoxicações por escorpiões. Uma das mais severas consequências dos acidentes escorpiônicos em humanos é uma grave pancreatite hemorrágica aguda, seguida de sialorréia, náusea, diarreia e dor abdominal. Os efeitos no pâncreas são devido à ação do veneno nos receptores muscarínicos. O veneno de *Tityus serrulatus* leva a um aumento significativo e prolongado da secreção pancreática em ratos, além de alterações histológicas no órgão (Novaes et al., 2002).

A administração de insulina reverte às alterações hemodinâmicas e edema pulmonar em crianças e adultos em acidentes escorpiônicos. Revertem também as mudanças no ecocardiograma em animais e reduz os níveis de angiotensina II, glicogênese e lipogênese (Murthy e Haghazari, 1999).

Ribeiro (2008), estudando o escorpionismo em cães, demonstrou que a dose de veneno de *Tityus serrulatus* capaz de levar a um quadro clínico de média gravidade é de 250µg/kg. Os sinais e sintomas observados nos cães foram dor local imediata e intensa,

seguida, às vezes, de hiperestesia, alterações posturais, claudicação, espirros, rinorréia, dispnéia, taquicardia, elevação da pressão arterial, dor abdominal, náuseas e vômitos.

2.2.1. Alterações sanguíneas

Leucocitose com neutrofilia é uma alteração comum, registrada em muitos casos clínicos de envenenamento escorpiônico humanos (Gueron et al., 1967; Bucarechi et al., 1995; Cupo e Hering, 2002; Melo et al., 2004) e também em cães (Cordeiro et al., 2006; Labarrère et al., 2007, Ribeiro et al., 2009). Embora sejam relatadas reações inflamatórias decorrentes do envenenamento escorpiônico, como miocardite e pancreatite, além da vasta participação de citocinas e mediadores inflamatórios, o mecanismo mais provável da leucocitose é o estresse causado pela dor, que maximiza a descarga de adrenalina e provoca uma reação fisiológica devido ao desprendimento de leucócitos do “pool” marginal dos vasos sanguíneos (Jain, 1993).

A hiperglicemia é o efeito metabólico do envenenamento escorpiônico mais importante e relacionado a diversas espécies de escorpiões. Os mecanismos da hiperglicemia são multifatoriais, incluindo os efeitos dos neurotransmissores sobre fígado, pâncreas e tecido adiposo. As catecolaminas agem no fígado ativando a adenilciclase, levando à formação de AMPc (adenosina mono-fosfato cíclico), com subsequente glicogenólise, enquanto o efeito lipolítico causa liberação de ácidos graxos livres e aumento de aminoácidos precursores de gliconeogênese, tais como leucina,

isoleucina e valina. Os efeitos do veneno sobre o pâncreas podem causar lesões que degeneram ilhotas pancreáticas e influenciar na produção de hormônios, inibindo a liberação de insulina e estimulando a secreção de glucagon (El-Asmar, 1984; Ismail e Abd-Elsalam, 1988; Murthy e Hase, 1994; Murthy e Haghazari, 1999; Yugandar et al., 1999). A inoculação experimentalmente de veneno do escorpião indiano *Mesobuthus tamulus concanensis* em cães causou hiperglicemia, aumento dos níveis de glucagon e elevação em mais de 200% dos níveis de cortisol, concluindo-se que a norepinefrina liberada pelas terminações nervosas e os glicocorticóides mediam os efeitos de gliconeogênese e glicogenólise decorrentes ao envenenamento escorpiônico (Murthy e Haghazari, 1999). Contudo, Sankaran et al. (1983) induziram experimentalmente a secreção pancreática de insulina *in vivo* em cães e em ratos, usando veneno de *T. trinitatis*; essas secreções foram inibidas por atropina, o que revelou a participação de receptores colinérgicos muscarínicos na estimulação. Diversos relatos de acidentes escorpiônicos no Brasil incluem entre os achados laboratoriais a hiperglicemia em quadros clínicos moderados e graves.

Com o aumento das catecolaminas ocorre a retenção da secreção de insulina e aumento da angiotensina II. Pode ocorrer também liberação da secreção de glucagon e cortisol. O aumento dos hormônios reguladores (glucagon, glicocorticóides e catecolaminas) opõe à ação de insulina, resultando em deficiência de energia e inabilidade dos órgãos vitais para

utilizar os substratos metabólicos, com falência múltipla dos órgãos (Murthy e Haghazari, 1999).

Os níveis plasmáticos de glicose no homem, que são considerados normais até 99mg/dl em humanos, variaram de 249 a 357mg/dl entre oito pacientes com quadro clínico grave, atendidos por Cupo e Hering, (2002). Em um caso extremo, Bucarechi et al. (1995) relataram em uma criança uma glicemia de 576mg/dl.

A dor abdominal, em muitos casos, pode ser atribuída à ação tóxica do veneno escorpiônico sobre o pâncreas. Atribui-se essa sintomatologia ao estímulo parassimpático da acetilcolina, que aumenta a sua secreção exócrina, determinando níveis plasmáticos aumentados de amilase pancreática em envenenamentos moderados ou graves (Bartholomew, 1970; Sofer et al., 1991; Bucarechi et al., 1995; Cupo et al., 2003; Melo et al., 2004). Novaes et al. (1982) induziram aumento no fluxo pancreático de ratos vagotomizados com injeção de tityustoxina purificada, indicando tal resultado que o bloqueio vagal não pôde impedir os efeitos do veneno sobre o pâncreas. Fletcher et al. (1996), usando venenos de escorpiões do gênero *Tityus* mostraram que o estímulo à secreção de células acinares pancreáticas de cobaias depende da abertura de canais de Na⁺ sensíveis a neurotoxinas, assim como acontece nos neurônios. Machado e Silveira Filho (1976/1977) induziram uma pancreatite hemorrágica em cães aplicando doses letais e sub-letais de veneno total de *T. serrulatus* por via intravenosa. Possani et al., (1992) observaram o efeito secretagogo do veneno de *T. serrulatus*

sobre o pâncreas de cobaias *in vitro* e caracterizaram microscopicamente a depleção de grânulos zimógenos de células acinares pancreáticas de cães, eliminados após o estímulo do veneno *in vivo*. Em ratos, o veneno de *T. serrulatus* causou pancreatite aguda 48h após a injeção intravenosa e pancreatite crônica em até 20 dias após o envenenamento, sendo os achados histopatológicos mais importantes degranulação e vacuolização acinar, infiltração difusa de leucócitos, lesões granulomatosas, dilatação e hiperplasia ductal, hiperplasia de linfonodos peripancreáticos e mobilização e degranulação de mastócitos (Novaes et al., 2002).

As lesões de miocárdio são identificadas em análises laboratoriais por meio da dosagem sérica de enzimas de origem muscular, tais como aspartato-aminotransferase (AST), lactato-desidrogenase (LDH) e creatina-quinase (CK) e principalmente as isoenzimas LD1 e CK-MB, liberadas especificamente pelo músculo cardíaco lesado. A dosagem de troponina I, uma proteína estrutural do miócito, tem sido utilizada para diagnóstico de lesões cardíacas, sobretudo infarto agudo do miocárdio. Como as sequências de aminoácidos dessa proteína diferem entre o músculo cardíaco e o estriado esquelético, ensaios imunológicos baseados em anticorpos contra troponina I cardíaca (cTnI) são de altíssima especificidade e auxiliam no diagnóstico de miocardite do envenenamento escorpiônico (Cupo e Hering, 2002; Cupo et al., 2003).

Ribeiro (2008), estudando os efeitos do veneno de *T. serrulatus* em cães adultos

saudáveis, relatou aumento dos níveis de cortisol, insulina, glicose, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), além de leucocitose com neutrofilia até 12 horas após o envenenamento.

2.3. Diagnóstico

O diagnóstico de acidentes escorpiônicos em Minas Gerais, ainda é feito pela identificação do animal envolvido e exame clínico. Por isso é muito importante levar o espécime envolvido no acidente para identificação. Um exame importante para o tratamento dos acidentes humanos causados por escorpiões é o eletrocardiograma, onde podem ser visualizadas várias alterações, que normalmente desaparecem em torno de três dias, mas podem persistir por sete ou mais dias (Manual..., 2001). Mudanças ecocardiográficas foram primeiramente reportadas em 1988 em Jerusalem, após a ocorrência de lesão do miocárdio devido a um acidente por escorpião. No mesmo ano foram observadas alterações ecocardiográficas depois de um acidente com *Tityus serrulatus* (Cupo et al., 1994).

O acidente escorpiônico, devido ao efeito inotrópico positivo, pode haver consumo excessivo de oxigênio, levando a hipóxia e possível necrose teciduais, justificando então o aumento das enzimas cardíacas e as alterações observadas no ecocardiograma (Cupo et al., 1994).

Antigamente a lesão cardíaca causada por picada de escorpião era avaliada apenas por mudanças no eletrocardiograma. Como o acidente

pode levar a um infarto do miocárdio ou miocardite, atualmente, além do eletrocardiograma, avalia-se o aumento das enzimas creatina fosfoquinase (CK-MB), lactato desidrogenase (LD₁) e aspartato aminotransferase (AST), além de detecção de mioglobina em amostras de soro e urina e achados de necropsia (Cupo et al., 1994). Entretanto, como estas enzimas possuem baixa especificidade, os pesquisadores começaram a utilizar marcadores mais específicos, como a troponina, que apresenta mais de 98% de sensibilidade e especificidade para detectar um infarto agudo do miocárdio em humanos (Cupo e Hering, 2002).

Bertazzi et al. (2005) observaram que o veneno de *T. serrulatus* tem a habilidade de induzir o recrutamento de leucócitos, além de ativar o sistema complemento após gerar fatores quimiotáticos. Ocorre também uma reação inflamatória caracterizada por edema, níveis elevados da proteína C-reativa, das interleucinas IL-6, IL-1 α e TNF- α e grave leucocitose com relativa neutrofilia.

A ativação do sistema do complemento pode explicar algumas manifestações causadas pela picada de *Tityus serrulatus*. O aumento da permeabilidade vascular pode exacerbar o edema pulmonar e as alterações cardíacas, que são as principais alterações responsáveis pela morte no envenenamento escorpiónico. Baseado nisso, o veneno pode ser considerado importante para o controle da atividade do sistema complemento durante a resposta imune e inflamação, bem como em pacientes em condições como

rejeição de transplantes (Bertazzi et al., 2003; Bertazzi et al., 2005).

Testes imunodiagnósticos podem ser úteis na identificação e quantificação de antígenos tóxicos no sangue de pacientes picados por escorpiões. Esses testes podem fornecer uma base para determinar a quantidade de antiveneno que deve ser usado no tratamento ou para determinar uma relação entre a gravidade e a quantidade de veneno circulante. O *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) é uma técnica utilizada para quantificação e verificação da cinética do veneno circulante, podendo estimar a toxicidade do veneno. A técnica de ELISA apresenta várias vantagens, como rapidez, sensibilidade e baixo custo, mas requer reagentes de boa qualidade para uma detecção confiável (Revelo et al., 1996; Manual..., 2001).

Chávez-Olórtegui et al. (1994) padronizaram um ELISA para detecção de antígenos do veneno de *Tityus serrulatus*. O teste de ELISA detectou antígenos em soro de pacientes com envenenamento sistêmico por *Tityus serrulatus*, mas falhou na separação daqueles que apresentaram apenas dor local no sítio da picada de pacientes controles. O teste de ELISA pode ser utilizado para monitoração de níveis de veneno no soro de pacientes com envenenamento sistêmico. A técnica tem sido utilizada para quantificar veneno e antiveneno, por ser de fácil execução, baixo custo e não envolver material radioativo.

Revelo et al. (1996) realizaram um experimento para avaliar a distribuição do veneno de *T. serrulatus* e sua

redução com o uso do antiveneno no soro em vários tecidos de ratos, utilizando a técnica de ELISA. Depois da injeção do veneno, os animais apresentaram sintomas durante duas horas e seis animais morreram entre a primeira e segunda hora; quando veneno e antiveneno foram aplicados juntos, nenhum animal morreu. Entretanto, quando o antiveneno foi administrado uma hora depois, os sintomas foram similares ao do primeiro experimento, mas nenhum animal morreu. O veneno foi absorvido rapidamente, observando-se níveis renais máximo em 15 minutos. A eliminação ocorreu rapidamente quando o veneno foi administrado junto com o antiveneno, mas foi mais lenta quando este foi administrado uma hora após; isso explicou a ineficiência da soroterapia quando administrada algumas horas após a picada.

Revelo et al. (1996) concluíram que o antiveneno tem uma meia vida de 66 minutos e uma distribuição entre três compartimentos (sangue, tecidos superficiais e tecidos profundos), com uma eliminação de meia-vida de 43,3 horas, sendo que o nível máximo se encontra no rim, pulmão, coração e fígado. O fato de encontrar uma concentração maior de veneno no rim deve-se à eliminação do mesmo por esse órgão. A absorção e distribuição em diferentes tecidos são rápidas, chegando ao nível máximo dentro de 30 minutos após injeção, e sua eliminação ocorre em oito 8 horas. Nenhum veneno foi detectado no SNC, concluindo que esse não atravessa a barreira hematocefálica. A concentração do veneno no coração foi baixa e não para

explica as complicações cardíacas do envenenamento.

Os achados anátomo-patológicos são raros nos acidentes em humanos que levam a morte. Apesar disso, pode ser encontrados pneumonia hemorrágica, dilatação do ventrículo esquerdo e miocárdio sem alterações a microscopia ótica, alterações degenerativas de fibras cardíacas, necrose focal, edema intersticial e aumento da celularidade, com presença de linfócitos e monócitos. Pode ocorrer presença de neutrófilos e eosinófilos nos espaços alveolar e intersticial, além da deposição de fibrina. São observados aumento do tamanho do pulmão, áreas de edema e hemorragia pulmonar e infiltrado inflamatório (Cupo et al., 2003).

2.4. Composição do Veneno

2.4.1. Toxinas escorpiônicas e seus mecanismos de ação

A geração de substâncias tóxicas é uma evolução adquirida nos sistemas de defesa de várias espécies de invertebrados e vertebrados (Gazarian et al., 2005). Os primeiros estudos sobre o veneno de escorpião no Brasil foram realizados por Murano em 1915 e Vital Brasil em 1918 (Pardal et al., 2003).

As principais características do veneno de escorpiões são a grande variedade e a complexidade de suas toxinas. O veneno é composto por proteínas de baixo peso molecular (toxinas e neurotoxinas, entre outras), aminoácidos livres, sais inorgânicos, lipídeos e aminas biogênicas. Os escorpiões utilizam diferentes peptídeos neurotóxicos para imobilizarem suas vítimas e estes afetam a permeabilidade

dos íons de algumas células. O veneno dos escorpiões é constituído principalmente por proteínas, com ponto isoelétrico entre 8,0-9,0, dialisável e termo resistente (Possani et al., 1999; Castro, et al., 2000; Wagner et al., 2003; Vasconcelos et al., 2005).

As neurotoxinas de peso molecular entre 6000 a 7000 daltons são moléculas bem estruturadas, resistentes à desnaturação térmica e contém de 30 a 22% de sua estrutura composta por folhetos β e 4 a 11% composta por α hélices. As toxinas são classificadas de acordo com seu efeito em mamíferos, crustáceos e insetos. As neurotoxinas são compostas por uma cadeia simples de polipeptídeos de 4-9 kDa e estruturalmente estabilizadas por três ou quatro pontes dissulfeto. As proteínas que contém cisteínas na sua estrutura e fazem ponte dissulfeto sendo divididas em quatro grupos de acordo com sua ação nos canais de sódio, potássio, cálcio e cloro. As toxinas mais estudadas e de maior importância farmacológica são as toxinas que afetam os mamíferos e atuam nos canais de sódio. Estas toxinas são divididas em dois grupos, α e β (Becerril et al., 1997).

As toxinas α agem no sítio 3 dos canais de sódio, retardando ou bloqueando a inativação do canal de maneira voltagem-dependente. Sua ligação promove uma mudança conformacional, de tal forma que ao retardar ou bloquear a inativação do canal produz uma contínua despolarização das membranas das terminações nervosas, causando uma liberação não controlada de neurotransmissores (Becerril, et al., 1997). A α -toxina é o componente letal

principal no veneno total e escorpiões com grande concentração da mesma têm alto nível de toxicidade (Kalapothakis e Chávez-Olórtegui 1997).

As toxinas β agem no sítio 4 e mudam a dependência de voltagem da ativação do canal na direção hiperpolarizante sem afetar a inativação, promovendo repetidos disparos após um único estímulo. São compostas por 60-65 resíduos de aminoácidos e unidas por quatro pontes dissulfeto (Possani et al., 1999).

Dois grupos de toxinas de escorpião altamente específicos para insetos têm sido descritos as excitatórias e depressivas. As excitatórias causam uma descarga repetida nos axônios e as depressivas produzem inibição da excitabilidade devido à despolarização do mesmo. As toxinas depressivas causam uma diminuição no pico de sódio e induzem uma corrente negativa no potencial das membranas (Possani et al., 1999).

O mecanismo de ação do veneno do escorpião *T. serrulatus* e *T. bahiensis* envolve ligação da proteína em canais de sódio pós-ganglionares com função estimuladora, havendo toxinas voltagem-dependente e outras não. Ocorre também ligação de outras proteínas em canais de potássio pós-ganglionares, mas com função bloqueadora, ou seja, não deixa o potássio retornar para célula, acumulando-se esse íon no meio extracelular; despolarização da membrana e “disparo” do potencial de ação e liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e

acetilcolina pelas terminações neuronais nas sinapses (Melo et al., 2004; Gazarian et al.; 2005, Rodríguez et al., 2005).

A liberação dos mediadores químicos pode levar a um aumento substancial da secreção das glândulas exócrinas do trato gastrointestinal, glândulas salivares, estômago e pâncreas e, assim, induzir degranulação de mastócitos e de outras células, liberando histamina, serotonina, peptídeos e citocinas (Novaes et al., 2002).

Lourenço et al. (2002) demonstraram que as toxinas de escorpiões são capazes de causar alterações diretas no sistema nervoso central. Eles fracionaram o veneno de *T. bahiensis* e estudaram os efeitos de algumas frações (P2, P3, P4, P5, P6 e P7) no sistema nervoso central de mamíferos. Inoculações de P5, P6 e P7 em camundongos induziram convulsão e as frações P5 e P6 determinaram alterações eletrocardiográficas. Injeções da fração P3 no hipocampo não induziram convulsão ou lesões, porém quando administrada via endovenosa, causou alterações neurológicas.

2.4.2. Estrutura molecular das toxinas

A estrutura primária das toxinas escorpiônicas apresenta grande semelhança. Há uma estrutura conservada entre as famílias de proteínas (Possani et al., 1999).

As toxinas têm a mesma estrutura secundária α -hélice e três fitas folha- β antiparalelas conectadas por duas pontes dissulfeto construindo a estrutura α -

hélice/folha- β estabilizada por cisteína, três voltas compactadas tipo I e quatro pontes dissulfeto. As toxinas γ possuem uma extensão típica da região C-terminal, seguido de uma α -hélice adicional que deve ser essencial para atividade tóxica. O segmento α -hélice não está diretamente envolvido na atividade biológica e provavelmente age na estabilização da conformação ativa da molécula. Resíduos na região C-terminal podem contribuir para a atividade biológica da toxina. A superfície onde há o grupo aromático e resíduos hidrofóbicos, chamado de superfície hidrofóbica conservada constitui o sítio ativo da toxina, embora alguns autores não concordem (Possani et al., 1999).

Existem resíduos de aminoácidos que são conservados ou invariáveis nas toxinas α e β . O resíduo positivo (arginina ou lisina) na posição 2, negativo na posição 3, aromáticos nas posições 5 e 47 e alifático nas posições 4, 6, 7, 45 e 51 (numeração da AaH II) e as oito cisteínas são conservadas em todas as toxinas (com exceção das toxinas γ -inseto específica). A estrutura tridimensional é formada pela presença de quatro pontes dissulfeto, uma estrutura secundária altamente conservada com um folheto β -folha antiparalelo e uma α -hélice. A hélice está ligada a β 3 por duas das quatro pontes dissulfeto. Um par de cisteína da α -hélice está separado por um tripeptídeo, enquanto um par de resíduos de cisteína de β 3 está separado por um resíduo de aminoácido. Se resíduos de cisteína são de N- ou C-terminal, o α -hélice contém resíduos Cys3 e Cys4, e enquanto β 3 inclui

resíduos Cys6 e Cys7. Estruturas terciárias conservadas na $\beta 2$ são Cys5 e Cys2, exceto na toxina de inseto onde há dois resíduos de cisteína (Possani et al., 1999).

Inspecções nos alinhamentos da estrutura terciária das toxinas revelam quatro principais regiões onde se tem observado grande número de *gaps*, aumentando a similaridade entre as mesmas. Essas regiões estão localizadas nos resíduos 20, 35, 45 e 65. Esses *gaps* têm o nome de *loop* J, M, B e F, respectivamente. O *loop* F é de toxina específica de insetos (Possani et al., 1999).

O modelo de organização das toxinas que afetam canais de sódio consiste em dois exons e um intron, sendo que o intron interrompe o peptídeo sinal. Os genes que codificam toxinas de escorpião apresentam intron que sempre interrompem a sequência que codifica para o peptídeo sinal. O significado funcional desta localização do introns é desconhecido, mas pode estar envolvido na regulação da expressão destas proteínas. Os íntrons presentes em genes que codificam toxinas têm em média 400bp e formam uma estrutura característica, exon-intron-exon (Becerril et al., 1997).

Os pesquisadores têm procurado o isolamento de toxinas por meio de um par de oligonucleotídeos específicos de uma sequência de cDNA seguida da amplificação por PCR da sequência de interesse, sem a necessidade de fazer bibliotecas genômicas e de cDNA (Corona et al., 1996).

2.4.3. Toxinas que atuam nos canais de sódio

As toxinas desse grupo são longas, com aproximadamente 60 a 70 aminoácidos, e têm quatro pontes dissulfetos e são subdivididas em alfa (α) e beta (β) (Possani et al., 1999).

As toxinas que agem nos canais de sódio são as mais reativas neurotoxinas e as principais responsáveis pela maior toxicidade do veneno. A interação da toxina com o canal de sódio é do tipo hidrofóbica, composta de resíduos de aminoácidos alifático e aromático (Vasconcelos et al., 2005). O estudo das toxinas que interferem nos canais de sódio (NaScTxs) tem grande importância científica e médica (Wagner et al., 2003).

As toxinas de canal de sódio incluem toxinas contra insetos, crustáceos e mamíferos e peptídeos sem ou com pouca toxicidade (Possani et al., 1999).

De acordo com Possani et al. (1999), as toxinas de canal de sódio são classificadas em 10 grupos:

- 1- Velho mundo: Toxinas α clássicas ativas em mamíferos, incluindo α toxina do novo mundo.
- 2- Toxinas β clássicas: específicas de mamíferos.
- 3- β toxinas: específicas de mamíferos e insetos.
- 4- Depressivas: específicas de insetos.
- 5- Fraca atividade em insetos
- 6- α -toxinas insetos: não é só específica de insetos.
- 7- Excitatória em insetos e α e β em mamíferos.

- 8- Toxinas ativas fracas: Não tóxicas para mamíferos.
- 9- Novo mundo: Tóxica para insetos e crustáceos
- 10- Excitatórias: Específicas para insetos.

O cDNA e sequências genômicas de algumas toxinas de canal de sódio têm sido estudadas (Diego-Garcia et al., 2005). Essas análises mostraram que os DNA têm aproximadamente 650-950 nucleotídeos contendo um íntron 300-620 bases. Em todas as sequências o íntron interrompe o último terço na região clonada do peptídeo sinal. Então, a estrutura dos genes clonados das toxinas de canal de sódio é composta por dois exons e um íntron inserido no último terço do peptídeo sinal, que é composto por 18-21 aminoácidos (Possani et al., 1999).

2.4.4. Toxinas que atuam nos canais de potássio

As primeiras toxinas descritas atuavam em canais de sódio, hoje se sabe que, além das toxinas que atuam nos canais de sódio existem também outras que agem nos de potássio; estas toxinas ligam-se na superfície extracelular da célula e impedem a passagem desse íon (Legros et al., 1998; Possani et al., 1999). As toxinas específicas para canais de potássio (KTx) podem ser longas ou curtas, sendo curtas compostas por com 20 a 50 aminoácidos, subdivididas nos três tipos, alfa (α), gama (γ) e kapa-KTx, com três ou quatro pontes dissulfeto (Batista et al., 2000). As toxinas grandes contêm entre 60 e 70 aminoácidos, três pontes dissulfeto e são chamadas de beta-KTx. Elas têm

ação em células excitáveis e não excitáveis (Becerril et al., 1997) e uma alta conservação da estrutura secundária cisteína α/β (Abdel-Mottaleb et al., 2006).

2.4.5. Toxinas que atuam nos canais de cloro

As toxinas que atuam nos canais de cloro são pequenas, com 35 a 38 aminoácidos e quatro pontes dissulfeto. A Clorotoxina, específica para canais de cloro, tem 36 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto (Becerril, et al., 1997; Possani et al., 1999).

2.4.6. Toxinas que atuam nos canais de cálcio

As toxinas que atuam nos canais de cálcio são um grupo de toxinas muito heterogêneo, de cadeia longa ou curta, que agem em canais dependentes de voltagem ou em receptores de rianodina responsável pela liberação de cálcio intracelular, algumas têm motivo ICK (*inhibitory cystine knot*) (Mosbah et al., 2000).

2.4.7. Toxinas sem ponte dissulfeto

As toxinas sem ponte dissulfeto pertencem a uma importante classe de peptídeos bioativos descobertas recentemente no veneno de escorpiões. Vinte e seis peptídeos deste tipo foram descritos. São toxinas de tamanho entre 13 a 50 aminoácidos e um baixo grau de similaridade. Funcionalmente essas toxinas atuam como potencializadores de bradicinina, antimicrobianos, iniciadores da sinalização molecular de célula e modulação imune, entre outras (Zhijian et al., 2006).

2.5. Resposta imune (Soroterapia e vacinas)

O tratamento mais usual para pacientes picados por escorpiões é a soroterapia. A soroterapia é eficiente quando administrada imediatamente após a picada, diminuindo por completo a concentração do veneno no coração, baço e fígado e reduzindo de forma significativa nos pulmões e rins (Revelo et al., 1996; Moreira-Ferreira et al., 1998).

O primeiro soro antiescorpiônico foi produzido no Cairo por Todd em 1909 (Hassan, 1984). No Brasil, o primeiro soro produzido foi em 1917, por Eurico Vilela, aplicando a metodologia utilizada por Vital Brasil, no Instituto Butantã. Após a descoberta do *T. serrulatus* por Lutz e Mello, em 1922, o veneno desta espécie foi utilizado como imunógeno na produção de eficientes antivenenos para uso terapêutico no estado de Minas Gerais (Hassan, 1984).

No Brasil existem três grandes centros onde são produzidos os soros antiescorpiônicos, Instituto Butantã em São Paulo, Instituto Vital Brasil no Rio de Janeiro e Fundação Ezequiel Dias em Belo Horizonte, Minas Gerais. Os estudos com veneno de escorpião no Instituto Butantã começaram por volta de 1905 com o veneno de *Tityus bahiensis* Perty (Brazil, 1918). Em 1915, Heitor Maurano testou o soro antiescorpiônico produzido a partir do veneno do escorpião *Butbus quinquestriatus* e chegou à conclusão de que o mesmo deveria ser específico, pois não apresentava eficácia contra o envenenamento causado pela espécie

Tityus serrulatus. Após isso, foi produzido pela primeira vez em ampla escala o soro antiescorpiônico utilizando o veneno de *Tityus serrulatus* em cavalos. Para se conseguir o antígeno, era feito o macerado dos télson, que contém a glândula de veneno, sendo então injetado em cavalos (Lucas, 2003).

O veneno para a produção de soro pode ser obtido de duas formas, por extração mecânica ou manual e extração das proteínas tóxicas das glândulas. Um télson produz, no máximo, 24mg de veneno. Alguns pesquisadores citam que a extração do veneno por estimulação elétrica provoca a saída de substâncias não tóxicas e que a estimulação manual libera apenas as tóxicas (Hassan, 1984).

O veneno bruto contém vários antígenos, cada um possuindo uma atividade biológica e imunológica diferente. Anticorpos específicos para diferentes antígenos não são produzidos em quantidades iguais. O efeito total desses anticorpos representa a potência imunológica do antiveneno. Como todos os venenos contém diversas toxinas letais com antigenicidade diferente, cada um combina com seu anticorpo correspondente. Com um antiveneno altamente concentrado e refinado, esse efeito é mínimo (Hassan, 1984).

O uso de mistura de venenos de escorpião é importante para a produção de anticorpos, mas a variabilidade da composição do veneno entre espécies deve ser considerada e analisada. O conhecimento da variabilidade geográfica e individual nos venenos da

mesma espécie tem se tornado importante para a produção de soro efetivo e o entendimento dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes (Kalapothakis e Chávez-Olórtegui 1997).

O soro utilizado na terapia é obtido pela imunização de cavalos com veneno total. A eficácia do tratamento está relacionada com a rapidez da administração, pois toxinas de baixo peso molecular se difundem rapidamente pelo organismo, dificultando sua captura pelos anticorpos específicos. A qualidade do soro é importante, pois o mesmo neutraliza apenas ou predominantemente as neurotoxinas no compartimento vascular, sendo tratamentos tardios ou com doses insuficientes pouco eficazes, podendo levar o indivíduo à morte (Lima et al., 1993; Kalapothakis e Chávez-Olórtegui 1997).

Para a conservação do soro, a Organização Mundial da Saúde recomenda a forma liofilizada, mas no Brasil o soro mesmo é apresentado sob forma líquida, devendo ser mantido em geladeira entre 4-8 graus (Manual..., 2001).

Rezende et al. (1998), avaliando pacientes picados por escorpião e admitidos no Hospital João XXIII em Belo Horizonte, observaram que uma hora após a administração do soro escorpiônico houve diminuição da dor local e 12h após a emese e a hiperglicemia não foram mais detectadas. Da mesma forma, as manifestações cardiorespiratórias e o edema pulmonar desapareceram em

dois pacientes entre seis e 24 horas após a administração do antiveneno. Assim, demonstraram a eficácia da imunoterapia no tratamento do envenenamento por escorpiões em humanos.

Rezende et al. (1998) também estudaram a farmacocinética do veneno de *Tityus serrulatus* pela via subcutânea em ratos e observaram uma rápida absorção do veneno, alta distribuição e afinidade nos tecidos e uma lenta eliminação. Assim, tais autores concluíram que a terapia com o antiveneno deve ser iniciada o mais rápido possível, devido à sua rápida absorção e concluíram também que a gravidade dos acidentes escorpiônicos está relacionada diretamente com a concentração plasmática do veneno.

Davila et al. (2002) relataram pacientes que receberam rapidamente o soro antiescorpiônico houve diminuição do grau e duração da ativação simpática.

Delori et al. (1981) estudaram uma classificação das neurotoxinas de espécies de escorpião do Norte da África e a presença de várias aplicações para soroterapia. Quinze toxinas purificadas foram divididas em três grupos e três antitoxinas foram obtidas por injeção das mesmas em coelhos: neurotoxina I e II do escorpião *Androctonus australis Hector* e neurotoxina I do escorpião *Buthus occitanus tunetanus*. Foi observada neutralização dessas toxinas pertencentes ao mesmo grupo, com a vantagem que a misturas delas mostrou-se eficiente em neutralizar o veneno total dos escorpiões africanos.

Um outro estudo imunológico das toxinas foi realizado com venenos de escorpiões norte-africanos da família *Buthidae* revelando vários grupos de toxinas com reação cruzada. Um anticorpo contra um membro do grupo estrutura-antígeno neutralizou toxinas do mesmo grupo, de forma mais eficaz do que as toxinas de outros grupos. Estes resultados foram essenciais para a detecção, purificação e caracterização estrutural e farmacológica de toxinas individuais e famílias de toxinas, obtendo-se um antiveneno de boa qualidade, com localização e descrição estrutural dos determinantes antigênicos, epitopos relativos ao sítio tóxico e testando a capacidade de neutralização das toxinas (Gazarian et al., 2005).

Vários pesquisadores têm realizado uma comparação imunológica entre proteínas e suas sequências de aminoácidos e têm demonstrado grande correlação entre o grau de diferentes sequências e o de diferenças antigênicas. O número de sítios antigênicos entre as toxinas homólogas é importante, bem como suas sequências de aminoácidos, além de se estabelecer uma possível correlação entre substituições e diminuição do número de sítios antigênicos comuns. Assim, se tem um melhor entendimento sobre a ligação dos sítios antigênicos no mecanismo de neutralização e a relação entre estes e os sítios farmacológicos das toxinas, além da importância da seleção de peptídeos para síntese de vacinas. Estudos com anticorpos marcados em microscopia eletrônica permitiram visualizar que a ação de um ou mais sítios antigênicos provavelmente não interfere com a

ligação da toxina no receptor (Ayeb e Delori, 1984).

É importante o conhecimento dos sítios antigênicos das neurotoxinas, ou seja, o número de fragmentos Fab que podem se ligar simultaneamente na superfície das moléculas. Deve-se saber também, o número máximo de anticorpos que podem ligar-se ao mesmo tempo numa toxina. A modificação ou ausência de um resíduo de uma toxina interfere na sua antigenicidade (Ayeb e Delori, 1984).

Mendes et al. (2004) estudaram diferentes modelos animais, incluindo ratos, coelhos e ovelhas para produção de antivenenos contra o veneno total de *Tityus serrulatus*, comparando a habilidade das toxinas TsNTxP e a TsNTxP recombinante na geração de anticorpos neutralizantes. Esse estudo revelou um padrão específico de reconhecimento do peptídeo pelos anticorpos gerados em cada animal, além de ter diferença entre os imunógenos da TsNTxP e da recombinante, devido à diferença na conformação da estrutura secundária e terciária da proteína. Os autores concluíram também que, a ovelha é o modelo animal mais eficaz para produção de anticorpos anti-*Tityus serrulatus*, e que os anticorpos de cada modelo animal podem identificar alvos diferentes presentes nas toxinas do veneno total e/ou diferentes epitopos de uma toxina individual.

Como a rapidez da instituição do soro antiescorpiônico tem grande influência no prognóstico desses acidentes, é viável a preexistência de anticorpos circulantes com alta afinidade para

reconhecer o antígeno assim que ele estiver no organismo. Com esse intuito, alguns especialistas e clínicos de países onde o acidente escorpiónico é um sério problema de saúde pública, sugeriram o desenvolvimento de uma vacina contra acidentes escorpiónicos (Moreira-Ferreira et al., 1998). A toxicidade impede o uso das toxinas como vacinas e investigações da interação entre anticorpo (ligação anticorpo) e toxina (ligação receptor) determinam os limites para os estudos imunológicos. Apenas as toxinas naturais são capazes de induzir uma resposta para imunidade passiva, mas os peptídeos são fortes candidatos para produção de vacinas (Gazarian et al., 2005).

Devaux et al. (1996) realizaram um estudo sobre a antigenicidade de uma toxina onde foi demonstrado que a região conservada é pobre em antigenicidade com exceção da região N-terminal que é conservada e antigênica. O veneno de uma espécie de escorpião contém várias toxinas e uma diversidade de outros antígenos, ocasionando um problema na produção de soro polivalente. Anticorpos policlonais contra uma mistura de várias sequências representativas da região N-terminal podem ser capazes de neutralizar os efeitos letais de muitas toxinas de alguns venenos e então serem usados para o tratamento de vítimas de acidente escorpiónico. Pode haver também estratégias de proteção ativa usando imunógenos sintéticos criados a partir da neutralização da região N-terminal associada com epitopos das toxinas. Com isso, a produção de peptídeos sintéticos tem auxiliado nesses estudos de resposta imune objetivando completa ausência de

toxicidade de um imunógeno, bem como um baixo custo de produção.

A dificuldade da produção do antiveneno para terapia passiva ou ativa contra veneno de escorpião resulta do fato de que os antígenos neutralizados pelos anticorpos têm uma alta toxicidade e baixo peso molecular. Vários trabalhos têm demonstrado que a toxina polimerizada com glutaraldeído ou soro albumina bovina (BSA) promove um imunógeno detoxificado capaz de induzir uma boa resposta de anticorpos contra as toxinas dos escorpiões. Usando um antígeno detoxificado, pode-se aumentar a exposição de anticorpos numa neutralização do veneno de *Tityus serrulatus* e os epitopos reconhecidos por esses anticorpos correspondem as regiões das toxinas que estão envolvidas com seu sítio ativo (Ávila et al., 2004).

Ávila et al. (2004) estudaram a possibilidade de aumento da resposta imune para proteção *in vivo* contra os efeitos letais do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* em camundongos. Um imunógeno foi preparado da fração tóxica (TstFG₅₀) e conjugado com BSA usando glutaraldeído para detoxificação da mesma. A fração (TstFG₅₀) acoplada a BSA rendeu um completo imunógeno detoxificado. Os camundongos que foram imunizados com esse imunógeno produziram anticorpos protetores. Proteção *in vivo* de uma semana após a última imunização demonstrou que camundongos vacinados podem resistir à mudança de DL₅₀ e TstFG₅₀ que levou ao óbito todos os camundongos não imunizados. A proteção efetiva permanece por nove semanas depois do último protocolo de imunização. Esse

resultado se deve a presença de anticorpos neutralizantes induzidos por TstFG₅₀-BSA. Foram feitos peptídeos a partir das sequências das toxinas TsII, TsVII e TsIV e observadas regiões específicas na região C-terminal para a neutralização dos epitopos nas três toxinas.

Maria et al. (2005) observaram a capacidade de peptídeos derivados das sequências de aminoácidos de TsII, TsIV e TsVII reagirem com o soro (antiveneno) de equino em diferentes ensaios de neutralização. Assim, observaram três principais regiões antigênicas, o N-terminal, a região central e C-terminal. As toxinas VII expõem um grande número de epitopos. Os melhores resultados foram encontrados com peptídeos sintéticos correspondentes ao N-terminal de TsII, N-terminal de TsVII e C-terminal de TsIV.

Para obtenção de anticorpos monoclonais ou policlonais, é feita uma imunização em animais com veneno puro, que pode levá-los à morte e prejudicar a produção de antivenenos. Uma forma de diminuir esse problema é a detoxificação do veneno utilizando lipossomas ou preparação de BSA (Alvarenga et al., 2002; Alvarenga et al., 2005).

Alvarenga et al. (2005) imunizaram ratos com a fração TstFG₅₀ do veneno *Tityus* detoxificado. Esse foi o primeiro estudo que descreveu o reconhecimento e proteção de um anticorpo monoclonal contra uma fração neurotóxica do veneno de *T. serrulatus*. De nove anticorpos monoclonais foi obtido apenas um capaz de neutralizar *in vivo*

os efeitos letais causados pela fração tóxica G50 derivada do veneno de *T. serrulatus* induzir reação cruzada com anticorpos neutralizantes, produzindo assim anticorpos monoclonais. Eles foram obtidos com a capacidade de reconhecer e neutralizar as três principais toxinas de *T. serrulatus* TsIV ou toxina IV-5 uma α toxina, TsII, TsVII ou toxina γ , ambas β toxina e TsNTxP, uma proteína não tóxica. Foram feitos peptídeos com a sequência dessas toxinas. O resultado de imunensaio com os peptídeos revelou que a neutralização com anticorpos monoclonais reconhece um antígeno na região central de parte das toxinas TsIV, TsVII e TsNTxP. O resíduo de lisina da região N-terminal do epitopo foi identificado como uma região importante para ligação do anticorpo monoclonal.

Vários estudos sobre toxinas e peptídeos sintéticos para a produção de vacinas têm sido desenvolvidos. Um dos primeiros estudos foi realizado pelo Dr. Possani e colaboradores, utilizando veneno detoxificado do escorpião *Centruroides noxius*, que resultou na proteção de coelhos contra a DL₅₀ da fração tóxica do veneno, mas a duração e efetividade da proteção foram limitadas. A dificuldade encontrada pelos autores foi a obtenção de veneno suficiente para proteção humana. Outro método utilizado também é a preparação de proteínas expressas em *E. coli*. Os autores acreditam que toxinas expressas como fusão de proteínas são um avanço para componente da vacina (Gazarian et al., 2005).

Outros experimentos foram realizados com mapeamentos de epitopos e

vacinas baseadas em epitopos miméticos. Esses auxiliaram na elucidação da estrutura e localização dos epitopos e indução da resposta imune contra os antígenos, resultando assim grande perspectiva para produção de vacinas (Gazarian et al., 2005).

2.6. Nomenclatura das Toxinas

Devido à falta de uniformidade da nomenclatura das toxinas escorpiônicas, os autores têm atribuído diferentes nomes para uma mesma toxina e os nomes idênticos para diferentes. Por exemplo, a tityustoxina (TsTx), ao contrário do que foi descrito por Gómez e Diniz (1966) e Gómez (1967), é uma mistura de várias proteínas e não é a mesma toxina chamada tityustoxina descrita por Coutinho Netto Júnior (1975). Assim, a tityustoxina seguida por TsTx-1 e TsTxII foi adaptada por

investigação das toxinas de *T. serrulatus*, que as nomenclaturas foram reunidas em um nome simples como TsTx e substituída futuramente por Possani et al. (1981) em Toxina IV-5, TsTx-1 por toxina γ (Possani et al., 1977), TsTx-II por T₁V₁, TsTx-III por T₁IV e II_8, TsTx-IV por X₂, TsTx-V por XI-2, TsTX-VI por CM-I-S₁V₁, e TsTX-VII por CM-I-S₁-III-2 (Sampaio et al., 1991). O quadro 1 apresenta a uniformização dos nomes das toxinas de *T. serrulatus*.

Uma das nomenclaturas de toxinas proposta é baseada nas primeiras letras do nome do escorpião do qual a toxina foi isolada, seguida do número. Em seguida, os peptídeos homólogos são nomeados por número, seguido de nomes abreviados (Becerrill et al., 1997).

Quadro 1. Uniformização da nomenclatura das toxinas de *Tityus serrulatus*

Toxinas	Outros nomes	Canal de ação
TsTx	“TsTx” (Gomez e Diniz, 1966) TsTx (Coutinho Netto, 1975) TsIV-5 (Possani et al., 1981) T2III1 (Sampaio et al., 1983) X4 (Arantes et al., 1989) TsIV (Martin-Eauclaire et al., 1994)	Sódio
TsTx-I	TsTx-I (Toledo e Neves, 1976) Gama (Possani et al., 1981) T1VIII (Sampaio et al., 1983) TsVII (Bechis et al., 1984) XIII (Arantes et al., 1989)	Sódio
TsTx-II	TsTx-II (Toledo e Neves, 1976) T1V1 (Sampaio et al., 1983)	Possivelmente sódio
TsTx-III	T1IV (Sampaio et al., 1983) TsIII-8 (Possani et al., 1985) TsII (Mansuelle et al., 1992)	Sódio
TsTx-IV	X2 (Arantes et al., 1989) TsTx-IV (Novello et al., 1999)	Potássio
TsTx-V	XI2 (Arantes et al., 1989) (Arantes et al., 1994)	Sódio
TsTx-VI	CM I SIVII (Sampaio et al., 1997) TsTx-VI (Maragoni et al., 1990)	-
TsTx-VII	CM I SIIIII (Sampaio et al., 1997)	Potássio ou cálcio

Fonte: Mendes, 2007.

2.7. Veneno de *Tityus fasciolatus*

Devido aos poucos relatos de acidentes com o escorpião *Tityus fasciolatus*, pouco se estudou sobre o seu veneno. Nos anos de 2006 e 2007, foram capturados muitos escorpiões desta espécie pelo Centro de Zoonoses de Ituiutaba, região do Triângulo Mineiro (Ribeiro, 2008).

Castro et al. (2000) purificaram e caracterizaram parcialmente uma neurotoxina do veneno de *Tityus fasciolatus* de 6.6 kDa. Essa neurotoxina tem um peso molecular de 6614 daltons e uma sequência N-terminal de 28 resíduos, sendo

homóloga à TsTx-VI e TsNTxP de *Tityus serrulatus*.

Wagner et al. (2003) determinaram a DL₅₀ do veneno de *Tityus fasciolatus* em 72,92µg por camundongo (3,646 mg kg⁻¹). Comparando a letalidade, observaram que o veneno desta espécie é menos tóxico que o de *T. stigmurus* (DL₅₀ = 0,773mg kg⁻¹), *T. bahiensis* (DL₅₀ = 1,062mg kg⁻¹), *T. serrulatus* (DL₅₀ = 1,160mg kg⁻¹) e *T. costatus* (DL₅₀ = 1,590mg kg⁻¹) e mais tóxico que *T. cambridgei* (DL₅₀ = 12,136mg kg⁻¹).

Wagner et al. (2003) isolaram e caracterizaram o principal peptídeo de *T. fasciolatus*, Tf4, homólogo à classe 4

da toxina de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*. Baseado no sistema de nomenclatura e de sequência de aminoácidos (77-84%), a nova toxina foi denominada Tf4 (classe 4 de *T. fasciolatus*). Há 21 diferentes resíduos entre as sequências de aminoácidos de Ts1 e Tf4. A posição dentro dessas sequências é a razão da baixa toxicidade de Tf4 (Barbosa et al., 2002).

Apesar dos trabalhos relatados, pouco se sabe sobre a composição do veneno de *Tityus fasciolatus* e o mecanismo do envenenamento causado por esta espécie.

2.8. Veneno do *Tityus serrulatus*

O veneno do *T. serrulatus* contém proteínas de baixo peso molecular e atividade neurotóxica. Apresenta toxinas que agem nos canais de sódio e potássio. O quadro 2 apresenta as toxinas purificadas deste veneno. Algumas toxinas, ativas em canais de sódio voltagem-dependente, são subdivididas em α -toxinas e β -toxinas de acordo com o sítio de ligação nestes canais de mamíferos. As toxinas causam alterações nos sistemas nervoso, cardiovascular e respiratório. O veneno do *T. serrulatus*, assim como de outros escorpiões, possui proteínas com atividade hialuronidase (Sampaio et al., 1983). Ele não apresenta atividade de fosfolipase, colinesterase, fosfodiesterase, protease, amilase ou fibrinólise, mas outras espécies apresentam essas atividades enzimáticas e inclusive outras substâncias, como serotonina no caso de *Leiurus quinquestriatus* e histamina em

Palamneus gravimanus (Kalapothakis e Chávez-Olórtegui, 1997).

O veneno de *Tityus serrulatus* foi primeiro estudado por Gómez e Diniz (1966), do qual foi isolado a tityustoxina (TsTx). Durante 26 anos essa toxina foi considerada uma fração pura, mas posteriormente descobriu-se que a mesma era composta por vários peptídeos (Becerril et al., 1997).

Esse mesmo veneno foi isolado em duas frações neurotóxicas por Coutinho Netto (1975), que caracterizou em uma delas uma proteína básica com 61 aminoácidos e com lisina no C-terminal (Possani, 1984). Outros pesquisadores purificaram a Tityustoxina I e Tityustoxina II (Sampaio et al., 1983).

Possani et al. (1977) descreveram cinco outras toxinas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* Lutz e Melo, que foram caracterizadas por cromatografia, eletroforese, além de testar sua toxicidade em ratos. Os peptídeos tóxicos encontrados no veneno dos escorpiões são importantes para vários grupos de pesquisa, pois interferem em eventos nas membranas das células.

Chávez-Olórtegui et al. (1996) purificaram uma proteína não-tóxica do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (TsNTxP), básica e com 63 resíduos de aminoácidos com alto grau de homologia com as toxinas isoladas do veneno de *Tityus serrulatus*. Em 1997, Chávez-Olórtegui et al. injetaram essa toxina em coelhos para produção de anticorpos e estes reconheceram e neutralizaram *in vitro* os efeitos letais do veneno de *Tityus serrulatus*.

Quadro 2. Toxinas purificadas do veneno de *Tityus serrulatus* nas décadas de 60 a 80.

Pesquisadores	Ano	Número de Toxinas Purificadas	Toxinas Caracterizadas
Gomez e Diniz	1966	2 frações não tóxicas e 2 Tóxicas	- Tityustoxina
Coutinho Netto	1975	-	TsTx Sequência parcial
Toledo e Neves	1976	2 toxinas	TsTx-I PM 6932 e K N-terminal TsTx-II PM 8580 e G N-terminal
Possani et al.	1977	5 toxinas	Gama Sequência Parcial PM 7000 62 aa
Possani et al.	1981	10 toxinas Frações I-IV Subfrações II 1-11 III 1-10 IV 1-8	Tóxicas II, III, IV II 9-11 III 7-8 IV 5,6,8 II-11 e III-10=δ II-11, III-10, III-8 e IV-5 sequências parciais
Sampaio et al.	1983	2 Frações não tóxicas e 2 tóxicas T1 → 8 proteínas T2 → 4 proteínas	T2III 63aa PM 7216 sequência parcial T1VIII 61aa PM 6675 T1V1 72aa PM 7549 T1IV 45aa PM 5188 T2IV = T1VIII
Martin-Eauclaire et al.	1985	8 toxinas	5 β (sítio 4) e 3 α (sítio 3)
Arantes et al.	1989	8 frações I-VIII subfrações IX (5 toxinas) X (4 toxinas)	XIII = T1VIII IX3 = T1V1 X4 = T2III IX5 e X3 = III-8 X2 → TsTx-IV 61aa PM 6885

Fonte: Adaptada de Mendes, 2007.

2.9. Homologia entre os venenos

O número total de diferentes toxinas produzidas por escorpiões é estimado em 100.000, das quais, apenas 1% é conhecida. Entre elas, destaca-se a primeira toxina de *Tityus serrulatus* isolada e a mais estudada, a tityustoxina, que é uma toxina composta por proteínas com sítios específicos em canais de sódio pós-ganglionares. O caráter evolutivo da produção de toxinas por escorpiões é marcante, principalmente quando se analisam as características dos genes que codificam para essas proteínas, muito móveis e oriundos de mutações pontuais, duplicação de genes e recombinações (Gazarian et al., 2005).

Foi verificado um polimorfismo nos genes de toxinas de escorpiões principalmente nos clones de cDNA. Esse polimorfismo demonstra que os genes clonados dessas toxinas têm um ancestral comum. Também há uma homologia entre as sequências das toxinas de venenos de escorpiões do gênero *Tityus*. Muitas vezes, encontram-se toxinas homólogas em diferentes espécies de *Tityus* ou até mesmo idênticas. (Possani et al., 1999).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudo do veneno do escorpião *Tityus fasciolatus* por meio da caracterização molecular, determinação da dose letal e sua ação refletida nos componentes hematológicos, bioquímicos, anatomo-histopatológicos e imunológicos,

utilizando-se o camundongo como modelo experimental.

3.2. Objetivos específicos

Os objetivos do trabalho foram:

Parte I- Estudo clínico

- 1) Determinar a DL₅₀ do veneno de *Tityus fasciolatus* em camundongos;
- 2) Estudar as alterações anatomo-histopatológicas de coração, pulmão e cérebro após inoculação do veneno de *Tityus fasciolatus* em camundongos;
- 3) Estudar a hematologia e bioquímica sérica de camundongos após inoculação do veneno de *Tityus fasciolatus*;

Parte II- Estudo molecular

- 4) Clonar a sequência parcial de genes de toxinas do veneno de *Tityus fasciolatus*;

Parte III- Estudo imunológico

- 5) Caracterizar parcial bioquímica e imunologicamente o veneno de *Tityus fasciolatus*;
- 6) Avaliar *in vivo* a capacidade do soro antiescorpiônico em neutralizar o veneno de *Tityus fasciolatus* em camundongos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Veneno e sua extração

4.1.1. *Tityus fasciolatus*

Foi utilizado um *pool* de venenos de vários escorpiões da espécie *Tityus fasciolatus* (Fig. 4), capturados na

região de Ituiutaba (MG), cedidos pelo

Centro de Zoonoses de Ituiutaba (CCZ).



Figura 4: *Exemplar de T. fasciolatus*

O método de extração do veneno foi manual, pressionando-se o télson contra uma peça de parafilme² até este ser perfurado pelo aguilhão. Após coleta e centrifugação para remoção de alguns constituintes, tais como muco e debris celulares, o veneno foi posteriormente liofilizado, conforme técnica descrita por Kalapothakis e Chávez-Olórtegui (1997) (Fig. 5).

² American National Can Group, Inc – San Diego, EUA



Figura 5- Extração manual de veneno de *T. fasciolatus*. A: Apreensão do animal com auxílio de uma pinça; B: Perfuração e compressão do télson contra a peça de parafilme; C: Coleta do veneno com auxílio de uma micropipeta e ponteira de 200µl.

O veneno liofilizado foi ressuscitado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para a dosagem de proteínas pelo método do reagente Folin-Fenol-Ciocalteau (Lowry et al., 1951). Em seguida a solução foi alíquotada e congelada a -20 °C.

4.1.2. *Tityus serrulatus*

Foi utilizado um *pool* de venenos de vários escorpiões da espécie *Tityus serrulatus* capturados na região de Belo

Horizonte (MG), cedido pelos Professores Chávez-Olórtegui³ e Kalaphotakis⁴.

O veneno de *Tityus serrulatus* foi processado e armazenado nas mesmas

³ Professor Dr.Carlos Delfin Chávez-Olórtegui, Departamento de Bioquímica e Imunologia – Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – UFMG

⁴ Professor Evanguedes Kalapothakis, Departamento de Biologia Geral – Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG

condições descritas para *Tityus fasciolatus*.

4.2. Caracterização clínica do envenenamento

4.2.1. Determinação da DL₅₀

Sessenta camundongos *Swiss* CF1 machos, com peso entre 18 e 20g (peso médio 19g), seis em cada grupo, foram utilizados para determinar a letalidade do veneno bruto de *Tityus fasciolatus*. Os animais foram acomodados e mantidos em caixas apropriadas, nas dependências do Laboratório de Toxicologia da Escola de Veterinária da UFMG, recebendo alimentação à base de ração comercial e água *ad libitum*.

Para a determinação da DL₅₀, iniciou-se com uma dose de 8µg e um fator de diluição de 1,6. Foram utilizados sete grupos (sete doses) com seis animais. Após o estabelecimento da dose máxima, na qual não morreu nenhum animal e naquela onde morreram todos, mais 18 camundongos foram utilizados com um fator de diluição de 1,2, totalizando três doses, 62,9µg, 75,5µg e 90,6µg.

Cada dose de veneno utilizada foi diluída em PBS/BSA 1%, em um volume final de 100µl, e inoculada por via subcutânea (SC). A contagem de animais mortos foi feita 24h após o desafio. A dose letal para matar 50% dos camundongos (DL₅₀) foi calculada pelo programa “PROBITOS”, proposto por Finney (1971, 1978).

4.2.2. Avaliação anátomo-histopatológica

Foi realizado exame necroscópico dos animais que durante o desafio da DL₅₀ vieram a óbito. Os órgãos, coração, pulmão e cérebro, foram fixados em solução tamponada de formol a 10% neutro e tamponado, sendo processados por técnica rotineira de inclusão em parafina (Prophet et al., 1992). Cortes histológicos de 4µm de espessura de tais órgãos foram feitos e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para avaliação histopatológica.

4.2.3. Avaliação hematológica, bioquímica sérica e plasmática

Cinquenta e quatro camundongos *Chez* CF1 machos, pesando aproximadamente 30g, foram distribuídos em três grupos de 18 animais cada. Os animais do grupo (G1), inoculados com 50µl de solução salina (PBS), funcionaram como grupo controle negativo; os animais do grupo II (G2) foram inoculados com 24µg de veneno de *Tityus fasciolatus* por camundongo, diluído em 50µl de PBS (40% da DL₅₀ determinada neste trabalho); e os animais do grupo III (G3) foram inoculados com 8µg de veneno de *Tityus serrulatus* por camundongo, diluído em 50µl de PBS (34% da DL₅₀ do veneno de *Tityus serrulatus* conforme Nishikawa et al., 1994), funcionando como controle positivo.

Cada grupo foi dividido em três subgrupos de seis animais (a, b e c), de acordo com o momento da coleta de sangue, conforme expresso na tabela 1.

Tabela 1. Divisão dos grupos (tratamentos).

Grupos \ Tempos	Placebo (PBS)	<i>T. fasciolatus</i> (24µg)	<i>T. serrulatus</i> (8µg)
1h	G1	G2	G3
8h	G1	G2	G3
12h	G1	G2	G3

O local de inoculação do veneno nos camundongos foi a região inter-escapular, pela via subcutânea, utilizando-se seringa hipodérmica descartável de 1,0ml⁵.

4.2.4. Exames laboratoriais

Foram coletadas amostras de sangue pelo plexo orbital (1,3ml). Uma, oito e 24 horas após a administração do veneno (T1, T8 e T24, respectivamente). O sangue foi colocado em tubos⁶ com sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%, para realização do hemograma e dosagem de glicose, e 1000µl sem anticoagulante, para separação do soro e posterior dosagem de uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase (CK), isoenzima (CK-MB), amilase, lactato desidrogenase (LDH) por método colorimétrico cinético⁷ em aparelho analisador bioquímico⁸.

A contagem total de eritrócitos e leucócitos e a determinação da

concentração de hemoglobina foram feitas em contador eletrônico⁹ e os cálculos dos índices hematimétricos realizados conforme Ferreira Neto et al. (1982). A determinação da glicose foi realizada com sangue total utilizando tiras no glicosímetro¹⁰, imediatamente após a coleta do sangue.

Os esfregaços sanguíneos foram feitos em lâminas de vidro (26 x 76mm)¹¹ e corados com May Grunwald - Giemsa¹² para a contagem diferencial de leucócitos, de acordo com Ferreira Neto et al. (1982). As proteínas totais foram estimadas por técnica de refratometria.

O perfil protéico foi feito por meio de eletroforese em tampão Tris em filmes de agarose¹³ e as bandas eletroforéticas foram lidas e quantificadas pelo *software* SE-250¹⁴ para determinar a porcentagem de albumina e globulinas α , β e γ , segundo técnica descrita por Naoum (1990).

As mensurações quantitativas de cortisol no soro foram realizadas por

⁵ BD Plastipak®

⁶ VACUETTE®, Greiner Bio-One Brasil – Americana-SP

⁷ SYNERMED® - Synermed International Inc., Westfield, EUA

⁸ Cobas Mira –Roche – GMI, Global Medical Instrumentations, Inc. – Ramsey, EUA

⁹ CELM CC-530®, Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos – Barueri-SP

¹⁰ Tiras Biochek - Bioeasy

¹¹ Lâminas para Microscopia Exacta - Perfecta, São Paulo-SP

¹² May Grunwald/Giemsa – Doles ® Reagentes, Goiânia, GO.

¹³ CELMGEL ® - CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri-SP

¹⁴ Software SE-250

técnica de radioimunoensaio¹⁵ em fase-sólida marcado com ¹²⁵I e com contador gama¹⁶, utilizando kit comercial⁸.

4.3. Caracterização molecular do veneno

A caracterização molecular do veneno foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. As etapas da metodologia estão resumidas na Figura 6.

¹⁵ COAT-A-COAT® - DPC-Diagnostic Products Corporation, Los Angeles-EUA

¹⁶ COBRA II Auto Gama – Packard BioScience Company

⁸ Coat-a-Count – DPC® USA

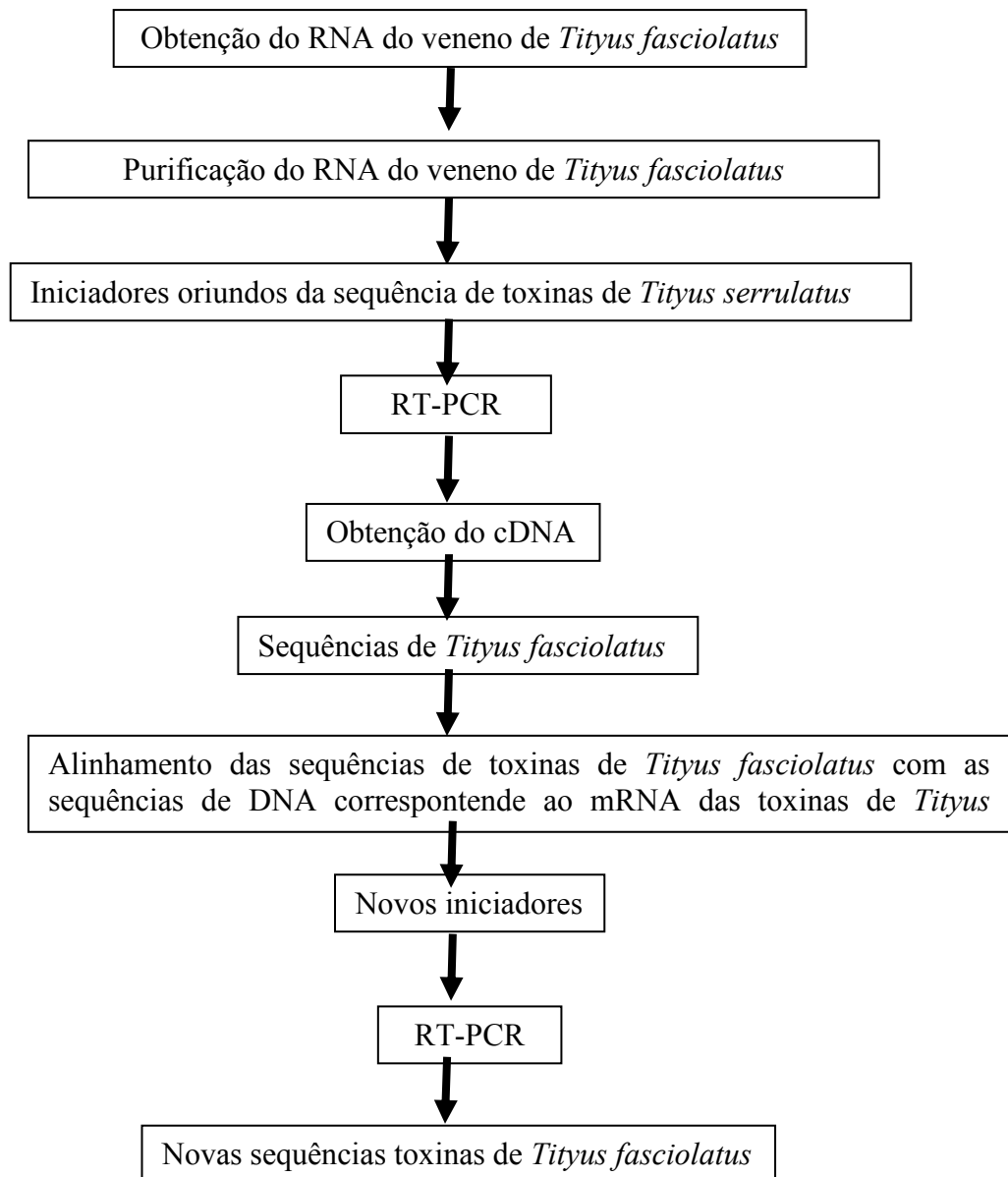


Figura 6- Metodologia empregada na caracterização molecular do veneno de *Tityus fasciolatus*

4.3.1. Extração e purificação do RNA (Ácido ribonucléico)

Todo procedimento foi realizado a 4°C, usando água tratado por dietil pirocarbonato (DEPC). A glândula de veneno (télson) do escorpião *Tityus fasciolatus* foi extraída e macerada usando pilão e pistilo em gelo seco até

ser formado um pó. Esse foi ressuspenso em 200µl de solução de desnaturação (tiocianato de guanidina 4M, Tris HCl 0.1M pH 7.0, 0.5 sarcosil e β-mercaptoetanol 1%) e transferido para um micro tubo de 1,5ml. Após, foram adicionados 20µl (1/10 do volume) de acetato sódico 2M pH4,0, 200µl (1 volume) de fenol ácido e 40µl

(2/10 de volume) de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) que foram misturados por agitação vigorosa e, o tubo contendo a mistura foi mantido no gelo por 15 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 10.000g durante 20 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um microtubo de 1,5ml e foi acrescentado um volume de isopropanol e mantido a -20°C durante aproximadamente 15 horas.

Em seguida, a amostra foi centrifugada a 13.200g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado com o auxílio de uma micropipeta. O *pellet* foi ressuscitado em 50µl de solução de desnaturação e acrescentados 125µl de uma solução de (2,5 volume) etanol 95%. A amostra foi homogeneizada e mantida a -20°C durante aproximadamente 15 horas.

A amostra foi centrifugada a 13.200g por 30 minutos 4°C. O sobrenadante foi descartado. O “pellet” foi lavado com álcool etílico 70% com cuidado e em seguida deixado em contato com o ar para secar; o “pellet” foi ressuscitado em água deionizada.

4.3.2. Construção de cDNA da glândula de veneno

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada usando o Kit RT-PCR¹⁷ (Reação em cadeia de polimerase-transcriptase reversa). Para realização da RT-PCR foram utilizados iniciadores de toxinas do escorpião *Tityus serrulatus* pré determinados.

¹⁷Access Quick™ RT-PCR System – Promega Corporation

Primeiro par de iniciadores originado de TsNTxP

Senso - 5'CTC GAG GGT AGA GAA
GGT TAT CCA G 3'
Anti-senso - 5'CTC GAG GCC ACA
TTT ATT CGT TTC ACT AGT CC 3'

Segundo par de iniciadores originado da TsTx

Senso - 5' GTC GAC AAG AAA GAC
GGA TAC CCG 3'
Anti-senso - 5' GTC GAC GGA TTT
GCA TTT TCC GTT GG 3'

Terceiro par de Iniciadores originado da TsTx-I

Senso - 5' AAG CTT AAA GAA GGT
TAT CTC ATG 3'
Anti-senso - 5' AAG CTT ACA TTT
GTT CGT CGC TCT ATC C 3'

4.3.3. Padronização da RT-PCR

Foram realizados vários testes para padronizar a quantidade de DNA a ser usado na RT-PCR (Tab. 2). A reação foi realizada segundo recomendações do fabricante¹⁷ (Tab. 3). Os ciclos da reação foram realizados no termociclador PTC-100 *Programmable Thermal Controller* (MJ Research).

Após término da reação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% em tampão Tris-acetato-EDTA (solução estoque 50x: 242 g de tris base, 57,1ml de ácido acético e 100ml de EDTA 0,5M pH 8.0) (TAE 1x) e submetidas a eletroforese por duas horas à 52V e 170mA. Em seguida, o gel foi colocado em solução de brometo de etídio (0,5µg/ml) sob agitação por

aproximadamente 30 minutos sendo posteriormente visualizado sob luz U.V.

Tabela 2 - Quantidades de reagentes utilizados na RT-PCR

<i>Material</i>	<i>Quantidade</i>
Primer senso (20 pmol/ μ l)	0,25 μ l
Primer anti-senso (20 pmol/ μ l)	0,25 μ l
Mix 2x (tampão, DNTp, taq)	12,5 μ l
DNA	0,2 μ l
Água deionizada estéril	6,8 μ l
Volume final	20 μ l

Tabela 3 – Descrição do programa utilizado na RT-PCR

PASSO	TEMPERATURA	TEMPO
1 (desnaturação)	94°C	3 min
2 (desnaturação)	94°C	30 segundos
3 (anelamento)	46°C	30 segundos
4 (extensão)	72°C	1 min e 30 segundos
5	Repetir o ciclo 30 vezes a partir da etapa 2	
6	72°C	5 min
7	4°C	Infinito

4.3.4. Purificação do cDNA a partir do gel de agarose 1%

A banda correspondente ao DNA amplificado foi recortada do gel com auxílio de um estilete, colocada em um microtubo de centrífuga de 1,5ml e purificada com o kit Wizard PCR Preps DNA purification System¹⁸.

4.3.5. Ligação do inserto ao vetor de clonagem

Após a purificação do amplicon foi feita a reação de ligação usando o vetor pCR2.1-TOPO¹⁹ (Fig. 7), segundo recomendações do fabricante para posterior digestão com a enzima de

restrição NdeI²⁰ CATATG. A tabela 4 apresenta as quantidades utilizadas na reação.

¹⁸Promega

¹⁹Invitrogen

²⁰New England BioLabs

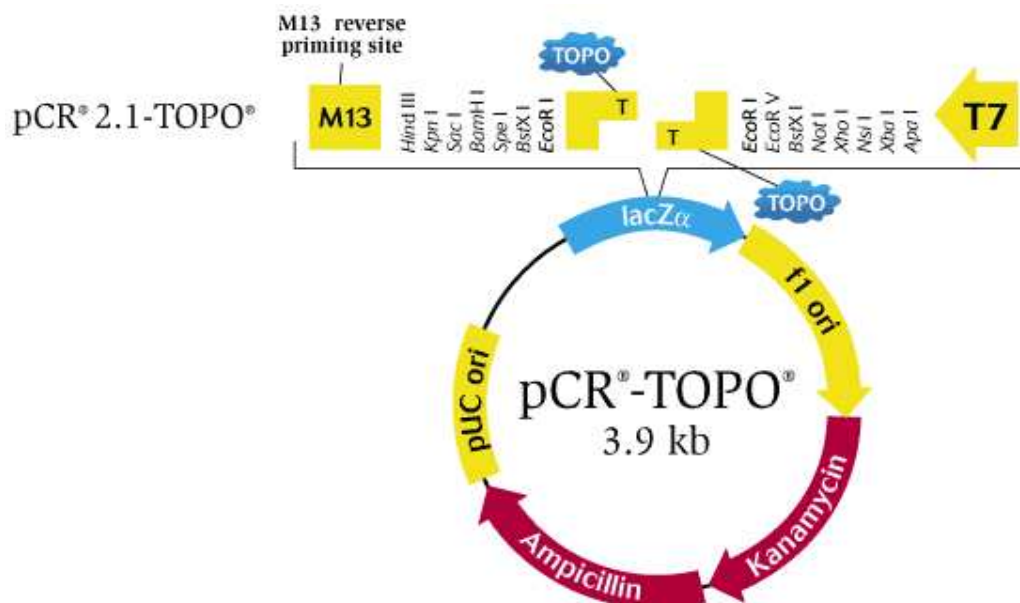


Figura 7- Vetor de clonagem pCR2.1-TOPO utilizado para clonagem dos genes. A figura mostra o sítio múltiplo de clonagem.

A ligação no vetor pCR2.1-TOPO foi realizada de acordo com as especificações do fabricante¹⁹.

Tabela 4- Quantidade de material utilizado na ligação do inserto ao vetor de clonagem pCR2.1-TOPO

MATERIAL	QUANTIDADE
Vetor	1µl
Produto purificado do gel de agarose	2µl
Sal	1µl
Água deionizada	2µl

A reação foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos.

4.3.6. Preparação de bactérias competentes

O procedimento foi realizado de acordo com Sambrook et al. (1989). Cinco colônias foram coletadas e colocadas para crescer por 2 a 3 horas em meio 2xYT-caldo (16g de extrato de

levedura, 10g de bactotripton, 5g de NaCl para 1 litro de água destilada-autoclavada), até atingir uma $DO_{600} = 0,5-0,6$. As células foram centrifugadas a 2.500g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado com cuidado em 40ml de tampão Tfb I (30mM acetato de potássio, 50mM de $MnCl_2$, 100mM de KCl, 10 mM de $CaCl_2$, 15% de glicerol, pH 5,8) gelado por 100ml

de cultura. O material foi colocado no gelo 5-10 minutos e centrifugado novamente. O precipitado foi cuidadosamente ressuspenso com 4ml de Tfb II (10mM de Na-MOPS, 75mM de CaCl₂, 10mM de KCl, 15% de glicerol, pH 7,0) gelado por 100ml de cultura. Alíquotas de 100µl foram preparadas e estocadas a -80°C.

4.3.7. Transformação da linhagem *E. coli* XL1 Blue

Genótipo da linhagem *E. coli* XL1 Blue: Δ (mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR)].

Bactérias *E. coli* da linhagem XL1 Blue (50µl) quimicamente competentes foram retiradas do freezer a -80°C, descongeladas no gelo por 15 minutos e acrescidas de 2µl do produto obtido da ligação do produto ligação do amplicon no vetor de clonagem PCR2.1-TOPO. A mistura resultante foi homogeneizada manualmente, incubada no gelo por 30 minutos, transferida para o banho-maria a 42°C por 90 segundos e imediatamente transferida para o gelo. Após esse procedimento, 800µl de meio 2xYT-caldo (16 g de extrato de levedura, 10 g de bactotripton, 5 g de NaCl para 1 litro de água destilada) foram adicionados e a mistura incubada por uma hora a 37°C. Em seguida, 100µl da cultura de bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar (10g de NaCl; 10g de bactotripton e 5g de extrato de levedura), adicionado com ampicilina (100µg/ml). As placas obtidas foram incubadas a 37°C, por 14 a 16 horas.

4.3.8. Purificação do plasmídeo

Extração de plasmídeo de *E. coli* foi realizada segundo o método de lise alcalina-SDS (Sambrook et al. 1989). Uma colônia isolada foi colocada para crescer em 10ml de meio LB com ampicilina (100µg/ml), em um agitador a 180 rpm e à temperatura de 37°C, durante 16 horas; em tubo de 50ml.

Após crescimento, a cultura foi mantida no gelo por 10 minutos e centrifugada a 3000g por 10 minutos, a 4°C. Todo o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 300µl de solução I (50mM de glicose, 25mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10mM de EDTA pH 8,0) gelada, transferido para um tubo de 1,5ml e deixado por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 300µl de solução II (0,2N de NaOH e 1% de SDS), preparada na hora do uso, o conteúdo foi misturado cuidadosamente por inversão e deixado por 5 minutos no gelo. Foram adicionados 30µl de solução III (60ml de uma solução de acetato de potássio 5M, 11,5ml de ácido acético glacial e 28,5ml de água destilada) e a mistura foi homogeneizada novamente por inversão. O tubo foi deixado no gelo por mais 5 minutos e centrifugado a 12000g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e foram adicionados ao sobrenadante 0,6 volumes de isopropanol 100%. O tubo foi deixado em repouso por 12 minutos e centrifugado novamente (12000g por 10 minutos, à temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1,0ml de etanol 70%. Depois que o precipitado secou foi dissolvido em um volume de 50µl de TE pH 8,0 com RNase

(20µg/ml). O tubo foi deixado 1 hora a 37°C para a enzima agir. Um gel de agarose 1% foi corrido para quantificar os plasmídeos purificados.

4.3.9. Amplificação do cDNA

Após a purificação do plasmídeo, foi realizado outro RT-PCR com o intuito de amplificar o gene correspondente à toxina específica. Após a amplificação dos clones positivos que continham o inserto, foi realizada uma nova purificação do plasmídeo e o produto foi enviado para sequenciamento.

4.3.10. Sequenciamento

Os sequenciamentos dos plasmídeos quantificados foram realizados no aparelho *MegaBACE DNA sequencer* no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular da UFMG. A reação de sequenciamento foi feita utilizando-se o Kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing*²¹. A tabela 5 e 6 apresentam as quantidades de reagentes e o programa utilizado para a realização de sequenciamento.

²¹Amersham Biosciences

Tabela 5 - Quantidades de reagentes utilizados no sequenciamento

<i>Material</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Quantidade</i>
Primer (5 pmol/ μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
ET Kit	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l
DNA molde *	0,7 μ l	1 μ l	2 μ l	0,8 μ l	0,9 μ l
Água qsp	4,3 μ l	4 μ l	3 μ l	4,2 μ l	4,1 μ l
Volume final	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

* Foram utilizadas diferentes quantidades do DNA molde devido à concentração de cada um.

Iniciador utilizado:

M13 anti-senso: GGAAACAGCTATGACCATG

Tabela 6 – Descrição do programa utilizado no sequenciamento

PASSO	TEMPERATURA	TEMPO
1 (desnaturação)	95°C	25 segundos
2 (anelamento)	50°C	15 segundos
3 (extensão)	60°C	3 minutos
4	Repetir o ciclo 35 vezes a partir da etapa 1	
5	4°C	Infinito

4.3.11. Análises computacionais das sequências obtidas

As sequências de nucleotídeos foram analisadas através do programa “Basic Local Alignment Search tool program for amino acids” – Blast – GenBank (Altschul e Lipman, 1990) – www.ncbi.nlm.nih.gov) e pelo programa DNASTar Lasergene 6²².

4.3.12. Desenho dos iniciadores após resultado do sequenciamento

Para obtenção de toda a sequência de nucleotídeo das toxinas de *Tityus fasciolatus* (início do N-terminal e fim do C-terminal) foram usadas as sequências de nucleotídeos do mRNA

(RNA mensageiro) das toxinas TsNTxP, Ts IV e TsVII de *Tityus serrulatus*, já descritas na literatura, para desenhar os novos iniciadores. O sítio de restrição utilizado foi o CATATG de NdeI²³. Após a definição dos novos iniciadores, foi realizada novamente a RT-PCR para a obtenção da nova sequência das toxinas de *Tityus fasciolatus*, purificação do cDNA, ligação do amplicon ao vetor de clonagem, purificação do plasmídeo e sequenciamento e análise das sequências, como citado anteriormente.²⁴ A tabela 7 e 8 apresentam as quantidades de reagentes e o programa

²³New England BioLabs

²⁴Amersham Biosciences

²²SentinelLM®

utilizado para a realização da segunda RT-PCR.

Tabela 7 - Quantidades de reagentes utilizados na segunda RT-PCR.

<i>Material</i>	<i>Quantidade</i>
Primer senso (20pmol/μl)	0,5μl
Primer anti-senso (20pmol/μl)	0,5μl
Mix 2x (tampão, DNTp, taq)	12μl
DNA	0,1μl
Água deionizada estéril	6,9μl
Volume final	20μl

Programa de RT-PCR:

Tabela 8 – Descrição do programa utilizado para a realização da segunda RT-PCR.

PASSO	TEMPERATURA	TEMPO
1 (desnaturação)	95°C	3 min
2 (desnaturação)	94°C	30 segundos
3 (anelamento)	55°C	30 segundos
4 (extensão)	72°C	30 segundos
5	Repetir cinco vezes a partir da etapa 2	
6	94°C	30 segundos
7	52°C	30 segundos
8	72°C	30 segundos
9	Repetir 25 vezes a partir da etapa 6	
10	72°C	5 min
11	4°C	Infinito

4.4. Caracterização imunológica

4.4.1. Imunização dos animais

Foram utilizadas duas ovelhas sadias, com dois anos de idade e peso médio de 40kg, sem padrão racial definido.

As ovelhas foram inoculadas por via subcutânea com 500μg de veneno de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus* em adjuvante completo de Freund's (dia 1), respectivamente. Dez imunizações

subsequentes foram feitas com intervalo de uma semana entre elas, com a mesma dose em adjuvante incompleto de Freund's. Sete dias após a última inoculação, foram realizadas as coletas de sangue por punção da veia jugular com sistema para coleta a vácuo²⁵. O sangue foi centrifugado e o soro obtido foi mantido a -20°C.

²⁵ LABOR IMPORT® - Osasco-SP

4.4.2. SDS-PAGE do veneno bruto e eletroforese em gel de poliacrilamida

Foi preparado gel poliacrilamida SDS em condições desnaturantes para quantificação e separação das proteínas dos venenos de *Tityus fasciolatus* e veneno de *Tityus serrulatus* segundo Laemmli (1970). O gel de separação foi constituído de 12% de uma solução de acrilamida/bisacrilamida 30%; Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 10% ; 10% de persulfato de amônia (PSA) e 0.05% de TEMED. O gel de concentração foi constituído de 4% de acrilamida/bisacrilamida 30%; Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8; SDS 10%; PSA 10%, TEMED 0,025% e água destilada. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra SDS-PAGE em condições redutoras e submetidas a uma temperatura de 100°C durante cinco minutos e aplicadas no gel. A eletroforese foi desenvolvida verticalmente, em placas de dimensão 10,0x 8,0 x 0.8cm, à 150V, 40 mA, durante uma hora. Após eletroforese, os géis foram fixados e revelados com a solução corante de Azul de Coomassie (50% metanol, 10% ácido acético, 0,25% Azul de Coomassie) por 60 minutos à temperatura ambiente e lavados em solução descorante (10% metanol, 5% ácido acético e água destilada) até o desaparecimento da coloração de fundo. Foi utilizado padrão de peso molecular BenchMark Protein Ladder²⁶.

4.4.3 Western Blotting

Após a separação em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para

²⁶Invitrogen

membrana de nitrocelulose (0,45 µm)²⁷, sob corrente de 110 V, 400 mA, por uma hora em tampão de transferência (25mM Tris, 192mM de glicina e 20% de metanol), sob agitação. As ligações a sítios não específicos foram bloqueadas por uma hora em tampão TRIS salina Tween (TBST- 10mM TRIS, 150mM NaCl) com solução de leite desnatado a 5%, sob agitação. As membranas de nitrocelulose foram lavadas quatro vezes com intervalos de 10 minutos, em cada lavagem, em PBS contendo 0,5% de Tween 20 (TBST). Posteriormente foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente com soro imune de interesse na diluição de 1:200, sob agitação. Quatro lavagens com intervalos de 10 minutos, em cada lavagem, com TBST foram feitas e então o conjugado anti-IgG de ovelha foi acrescentado nas diluições de 1:10000 e diluição de 1:5000 para o soro imune de *T. serrulatus* e *T. fasciolatus*, respectivamente, em TBST com leite em pó desnatado a 5%. A membrana foi incubada por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. Após quatro lavagens com TBST a reação foi revelada pela adição do substrato DAB-diaminobenzidine.

4.4.4. Soroneutralização

Foram utilizados 20 camundongos *Swiss* CF1 machos, pesando entre 18 e 20g.

A dose do veneno de *T. fasciolatus* utilizada, 134,2µg/camundongo (dose máxima mortal determinada no estudo da DL₅₀) foi incubada durante uma hora

²⁷Sigma

a 37°C com 100µl e 200µl de soro antiescorpiônico²⁸ e PBS.

A dose do veneno de *T. serrulatus* utilizada, 52,65µg/camundongo (equivalente à dose máxima mortal determinada no estudo da DL₅₀), foi incubada durante uma hora a 37°C com 100µl e 200µl de soro antiescorpiônico e PBS.

Foram formados quatro grupos (G) (n=2) inoculados pela via SC com:

- veneno de *T. fasciolatus* e 100µl de soro antiescorpiônico anti-*T. serrulatus* (**G1**);
- veneno de *T. fasciolatus* e 200µl de soro antiescorpiônico anti-*T. serrulatus* (**G2**);
- veneno de *T. serrulatus* e 100µl de soro antiescorpiônico anti-*T. serrulatus* (**G3**);
- veneno de *T. serrulatus* e 200µl de soro antiescorpiônico anti-*T. serrulatus* (**G4**).

Mais outros quatro grupos (n=2) funcionaram como controle positivo e foram chamados de **G1b**, **G2b**, **G3b** e **G4b**, recebendo o mesmo protocolo, porém utilizando-se PBS no lugar do soro antiescorpiônico anti-*T. serrulatus*:

- veneno de *T. fasciolatus* e 100µl de PBS (**G1b**);
- veneno de *T. fasciolatus* e 200µl de PBS (**G2b**);
- veneno de *T. serrulatus* e 100µl de PBS (**G3b**);

- veneno de *T. serrulatus* e 200µl de PBS (**G4b**).

Foram ainda formados mais dois grupos G5a (n=2) e G5b (n=2) que receberam 100 e 200µl de soro antiescorpiônico anti-*T. serrulatus*, respectivamente.

A contagem de sobreviventes foi feita até 48h após o desafio.

4.5. Análise estatística

O delineamento experimental aplicado foi o inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas, conforme preconizou Sampaio (2007). As parcelas correspondem aos tratamentos (controle e veneno) e as subparcelas aos tempos de avaliação em horas. Os dados referentes aos diferentes grupos e tempos foram plotados em tabelas e analisados pelo programa de computador SAS (Statistical Analysis System)²⁹. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Tukey e SNK (Student-Newman-Keuls).

4.6. Ética em experimentação animal

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, com o número de protocolo 131/2006, em 20 de dezembro de 2006 (certificado em anexo).

²⁸FUNED- Belo Horizonte-MG

²⁹SAS® – Statistical Analysis System – Cary, EUA

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PARTE I – ESTUDO CLÍNICO

5.1.1. DL₅₀

Para o cálculo da DL₅₀ foram testadas inicialmente sete doses diferentes de veneno de *Tityus fasciolatus*, levando em consideração o fator de diluição, que foi inicialmente 1,6, proposto pelo Prof. Carlos Delfin Chávez-Olórtegui³⁰ como apresentado na tabela 9.

³⁰Departamento de Bioquímica e Imunologia,
ICB, Universidade Federal de Minas Gerais

Tabela 9: Doses de veneno do *Tityus fasciolatus* inoculadas via subcutânea nos camundongos e porcentagem de mortes (primeiro intervalo)

DOSE (μg)	PORCENTAGEM DE MORTES (%)
8,0	0
12,8	0
20,5	0
32,8	0
52,4	0
83,9	100
134,2	100

Para o cálculo da DL_{50} utilizando o programa Probitos (Finney, 1971,1978) foi elaborada uma nova faixa, utilizando um novo intervalo. Este segundo intervalo foi criado a partir da maior dose que não causou mortes (52,4 μg) e a maior dose com a qual todos os

animais morreram (134,2 μg), conforme destacado na tabela 9. Assim, foi utilizado um fator de concentração de 1,2, que resultou em mais três doses, como apresentado na tabela 10.

Tabela 10. Doses de veneno de *Tityus fasciolatus* inoculadas por via subcutânea nos camundongos e porcentagem de mortes (segundo intervalo).

DOSE (μg)	PORCENTAGEM DE MORTES (%)
52,4	0
62,9	66,7
75,5	83,3
90,6	100
134,2	100

Com os resultados obtidos, foi utilizado o programa Probitos (Finney, 1971,1978) com sete doses (μg) para o cálculo da DL_{50} .

Neste estudo, o cálculo da DL_{50} , pela via subcutânea, foi de 59,65 μg por camundongo (2,984 mg kg^{-1}) com um intervalo entre 52,72 μg por camundongo e 67,5 μg por camundongo. Wagner et al. (2003) utilizando a mesma espécie, mas a via intraperitoneal, encontraram uma DL_{50} de 72,92 μg por camundongo (3,646 mg kg^{-1}). Nishikawa et al. (1994) realizaram um estudo comparativo de DL_{50} com alguns venenos de várias espécies de escorpiões brasileiros e

observaram uma grande variedade da toxicidade entre eles, entre 0,773 mg/kg^{-1} para *Tityus stigmurus* a 90,904 mg/kg para o *Brotheas amazonicus*. Os mesmos autores realizaram-se a comparação de letalidade do veneno de *T. fasciolatus* com outras espécies de escorpiões do mesmo gênero, verificando-se que ele possui uma menor toxicidade do que o de *T. stigmurus* (DL_{50} 0,773 mg kg^{-1}), *T. bahiensis* (DL_{50} 1,062 mg kg^{-1}), *T. serrulatus* (DL_{50} 1,160 mg kg^{-1}) e *T. costatus* (DL_{50} 1,590 mg kg^{-1}). Entretanto, o veneno de *T. fasciolatus* possui uma toxicidade maior do que o *T. cambridgei* (DL_{50} 12,136 mg kg^{-1}), o

qual é considerado moderadamente tóxico.

Kalapothakis e Chávez-Olórtegui (1997) afirmaram que a utilização de um *pool* de venenos é importante para pesquisa e produção de anticorpos, assegurando a melhor qualidade do antiveneno. Entretanto, uma variabilidade individual na composição do veneno deve ser considerada e analisada, sendo o conhecimento de variações individuais e geográficas dos venenos da mesma espécie extremamente importante para a produção de antivenenos efetivos.

A DL_{50} não é uma constante biológica, pois muitos fatores podem influenciar a toxicidade e, conseqüentemente, alterar sua estimativa.

5.1.2. Alterações macroscópicas

Os achados macroscópios encontrados com mais frequência foram áreas de

hemorragia pulmonar, variando de petéquias a equimoses difusamente distribuídas pela superfície dos órgãos (Fig. 8 e 9). Além disso, foi observado que os corações apresentavam uma área de coloração mais clara, em formato de cunha no ápice, sugerindo infarto. Essas alterações também foram visualizadas por Cupo (2002), após estudos anátomo-histopatológicos de seis pacientes humanos que apresentaram pulmão com aumento de tamanho, edema alveolar difuso, áreas com hemorragia e infiltrado inflamatório e aumento da câmara cardíaca em quatro pacientes.

No sistema nervoso central (SNC), observou-se congestão dos vasos cerebrais e das meninges de intensidade leve (Fig. 10). Têm sido reportadas alterações no SNC em casos fatais de picadas de escorpião como congestão cerebral, hemorragia difusa, infarto cerebral e trombozes cérebro-vascular (Ismail, 1995).



Figura 8- Áreas de hemorragias nos pulmões do camundongo que veio a óbito após a inoculação de 62,9 μ g do veneno de *T. fasciolatus*.

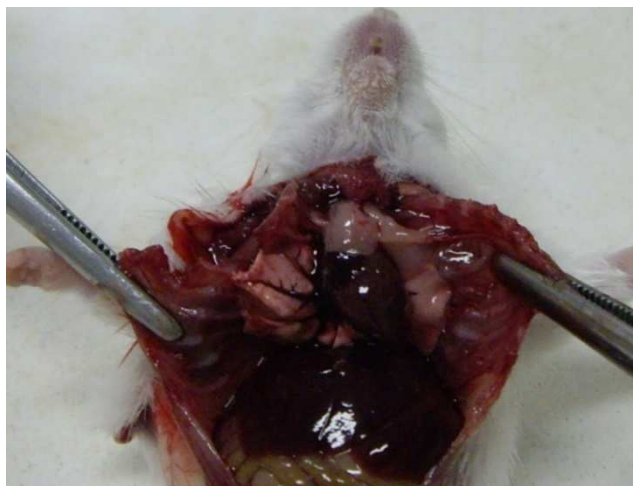


Figura 9- Área de hemorragia na região torácica do camundongo que veio a óbito após a inoculação de 62,9µg do veneno de *T. fasciolatus*.



Figura 10- Congestão de vasos cerebrais do camundongo que veio a óbito após a inoculação de 62,9µg do veneno de *T. fasciolatus*.

5.1.3. Alterações microscópicas

Foi realizado um estudo histopatológico do coração, pulmão e cérebro de seis animais que vieram a óbito. As alterações observadas foram as seguintes:

Coração

As manifestações cardiovasculares do veneno de escorpião e anormalidades histológicas são relacionadas com o alto nível de catecolaminas circulantes que ocorre devido ao efeito direto do veneno no sistema nervoso simpático (Corrêa et al., 1997).

Foi observada congestão de leve a moderada dos vasos sanguíneos do epicárdio, miocárdio e endocárdio (Fig. 11) e discreto infiltrado inflamatório

linfo-histiocitário no endocárdio e miocárdio. Cupo et al. (1994) relataram alterações mais graves em três pacientes humanos, como degeneração das fibras cardíacas, necrose local, edema intersticial e aumento de celularidade envolvendo linfócitos e monócitos.

Cupo (2002) também relatou, em cinco pacientes envenenados, degeneração vacuolar de fibras cardíacas, área focal com miocitólise e necrose e edema intersticial com infiltrado inflamatório.

Corrêa et al. (1997) realizaram inoculações endovenosas, diferente da via utilizada neste trabalho, em ratos com doses sub-letais do veneno de *T. serrulatus* e com a principal neurotoxina (tityustoxina) e descreveram congestão venosa, necrose das fibras musculares com núcleo vacuolizado e hemorragias decorrentes de uma severa resposta cardiovascular.

Evidências físicas de dano no miocárdio causado pelo veneno de escorpião foram descritas à auscultação por Gueron (Gueron et al., 1967; Gueron e Yaron, 1970) como “galope protodiastólico passageiro” e “murmúrio pansistólico apical consistente com regurgitação mitral aguda”. As lesões cardíacas já descritas resultam de degeneração de fibras musculares, necrose local e edema intersticial (Yaron e Braun, 1970; Ismail, 1995); edema intersticial com aumento de celularidade, acúmulo intersticial local de linfócitos, com envolvimento de músculos papilares e áreas subendocardiais (Gueron e Ovsyshcher, 1984); áreas de hemorragia recentes e múltiplos focos de cardiomiócitos mostrando miocitólise

coagulativa (contração das bandas) e sarcômeros rompidos e hipercontraídos (Cupo et al., 1994; Benvenuti et al., 2002); infiltrado inflamatório de leucócitos polimorfonucleares, histiócitos e linfócitos dispersos entre miocardiócitos necróticos e hipereosinofílicos (Daisley et al., 1999).

Desde os primeiros trabalhos já se supunha que houvesse um efeito direto das toxinas do veneno sobre o miocárdio. Ismail (1995) citou várias lesões identificadas por microscopia eletrônica que diferem qualitativamente daquelas causadas por superdosagem de catecolaminas, tais como edema intracelular, dilatação de sistema tubular, destruição de bandas I e deposição de lipídeos que, portanto, indicam que a descarga adrenérgica, por si só, não pode explicar as lesões cardiovasculares agudas pelo envenenamento escorpiônico grave. Embora efeitos diretos das toxinas escorpiônicas ainda não tenham sido revelados, evidência da ação direta do veneno de *T. serrulatus* sobre o músculo cardíaco foi obtida por Teixeira Júnior et al. (2001). Nesse trabalho, foi verificado que o veneno pode induzir contratilidade em corações de ratos pré-tratados com 6-hidroxidopamina, uma droga que lesa seletivamente terminações nervosas simpáticas, demonstrando que pelo menos os efeitos do veneno de *T. serrulatus* sobre o coração isolado de rato não dependem unicamente da liberação de neurotransmissores.

Os efeitos induzidos pelo veneno de escorpião são explicados pela liberação de neurotransmissores ao nível de sinapse. Essa liberação se deve à ação

excitatória das toxinas na membrana dos axônios, causado pela modificação da voltagem nos canais de sódio. O veneno de *Tityus serrulatus* é capaz de atrasar a inativação dos canais de sódio. A TsTX-I altera a dependência da ativação da voltagem através dos potenciais negativos, assim, diminui a excitação e aumenta a tendência da membrana para ocorrer potenciais espontâneos e repetitivos. Isso explica o aumento da liberação de catecolaminas pela glândula adrenal e

terminações nervosas pós-ganglionares e acetilcolina pelos gânglios e nervos terminais pós-ganglionares (Corrêa et al., 1997). O efeito múltiplo dos venenos de escorpião no sistema cardiovascular é, entretanto, similar (Gueron et al., 1992). Assim se explicam as discretas alterações cardíacas vistas no estudo histológico após a inoculação do veneno de *Tityus fasciolatus*.

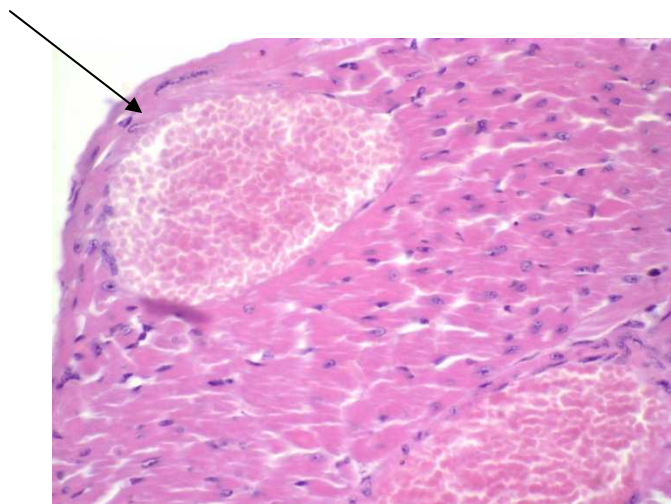


Figura 11- Histologia do coração (HE, 60x) do camundongo que veio a óbito após a inoculação de 62,9µg do veneno de *T. fasciolatus*. Congestão de vasos (seta).

Pulmões

Observou-se grande quantidade de hemácias nos capilares alveolares, levando a uma congestão (Fig. 12). Foram encontrados septos intensamente espessados por grande quantidade de hemácias nos capilares alveolares, hemorragia intersticial (Fig. 12) e presença de leucócitos nas paredes dos alvéolos (Fig. 12).

Cupo et al. (1994) observaram achados compatíveis com edema e áreas difusas de hemorragia pulmonar. O edema pulmonar é, sem dúvida, a patologia mais importante. As causas são de origem cardiogênica, embora a literatura nunca descarte a participação de mecanismos não cardiogênicos, muito evidentes na rotina clínica (presença de edema sem alteração cardíaca) e comprovados em experimentos. As diversas causas apontadas são: (1) a hipertensão arterial

de natureza adrenérgica e aumento da impedância sistêmica, induzindo insuficiência cardíaca esquerda; (2) diminuição do débito cardíaco; (3) aumento de permeabilidade vascular no pulmão, provocada por mediadores inflamatórios, como a bradicinina e histamina; (4) aumento do retorno venoso devido à ação de catecolaminas sobre a contração do músculo liso de veias periféricas; (5) miocardite, igualmente causando insuficiência cardíaca (Guéron e Ovsyshcher, 1984, 1987; Freire-Maia e Campos, 1987; Ismail, 1995). O uso do captopril mostrou-se eficiente na reversão do quadro de edema pulmonar e cianose,

além de proporcionar a diminuição do débito cardíaco e da pressão arterial, após acidentes escorpiônicos, creditando-se esses efeitos à inibição de angiotensina, com consequente vasodilatação e inibição da liberação de catecolaminas (Karnad et al., 1989). Os edemas foram, por vezes, caracterizados como unilaterais e periféricos, reforçando a participação dos mecanismos não cardiogênicos (Freire-Maia et al., 1994). Guéron e Ilia (1996) levantaram essa questão ao relatar diversos casos clínicos em que ocorreu edema pulmonar na ausência de hipertensão.

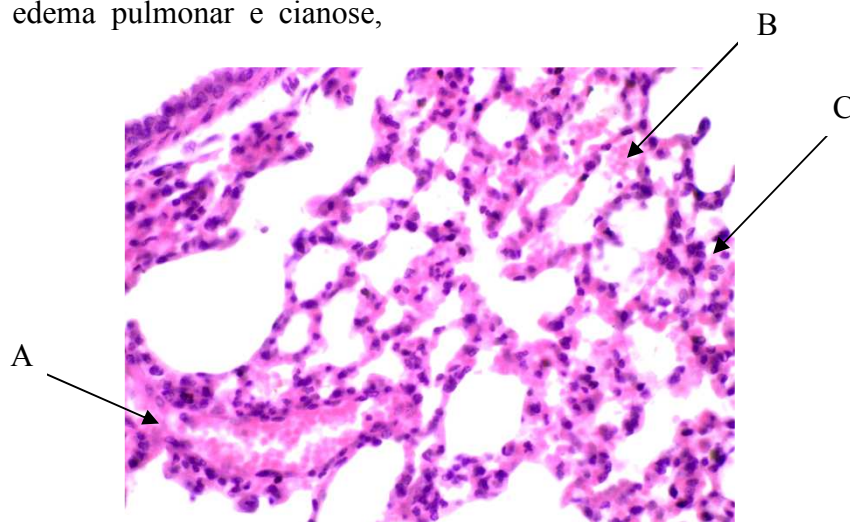


Figura 12- Histologia do pulmão (HE, 60x) do camundongo que veio a óbito após a inoculação de 62,9µg do veneno de *T. fasciolatus*. (A) Presença de congestão dos vasos; (B) hemorragia intersticial e (C) infiltrado inflamatório.

O veneno do escorpião *T. discrepans* causou edema e microtrombos em pulmões de coelhos, mas ambos foram inibidos por tratamento com heparina, corroborando com a hipótese de que a ativação da cascata de coagulação esteja envolvida, também, na gênese do edema pulmonar (D’Suze et al., 1999). Nesse mesmo trabalho, os autores propõem que o termo “edema pulmonar” seja abandonado e substituído por Síndrome

da Angústia Respiratória Aguda (SARA), frente a tantos mecanismos e sinais inerentes à ação pulmonar do veneno escorpiônico. A participação do fator ativador de plaquetas (PAF) também foi evidenciada na gênese do edema pulmonar causado por veneno de *T. serrulatus*, visto que o influxo de neutrófilos para os pulmões e o aumento de permeabilidade foram inibidos por antagonistas de receptores PAF e de

citocinas quimiotáticas (Coelho et al., 2007).

Lesões pulmonares foram descritas em pacientes por Cupo et al. (1994) e consistiam no aumento de volume e congestão bilaterais, parênquima congesto contendo líquido espumoso e hemorrágico, alvéolos pulmonares difusamente repletos de material amorfo e proteináceo ou mesmo hemorrágicos em áreas focais. Em ratos anestesiados e ventilados mecanicamente, o veneno de *T. serrulatus* causou diminuição de complacência pulmonar sem modificar a resistência aérea, devido à ausência de contração muscular e outros achados que justificam essas alterações, como edema moderado, espessamento de parede alveolar, áreas de colapso e

infiltrado inflamatório (Andrade et al., 2004).

Cérebro

Observou-se a presença de leve congestão dos capilares do córtex e demais áreas (tronco e cerebelo) (Fig. 13).

Ismail et al. (1988), em estudo da concentração do veneno em diversos órgãos utilizando marcador radioativo, observaram que o veneno de escorpião tem eliminação rápida. O veneno foi detectado na urina após 15 minutos da inoculação intramuscular e intraperitoneal. A concentração mais alta do veneno foi encontrada nos rins, pulmão e coração e a baixa no cérebro.

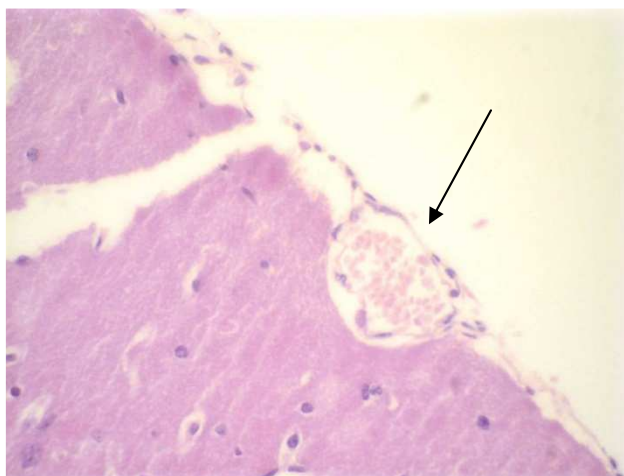


Figura 13- Histologia do córtex cerebral (HE, 60x). Presença de discreta congestão do vaso (seta).

5.1.4. Manifestações clínicas

Todos os camundongos dos grupos II e III, inoculados com os venenos de *T. serrulatus* e *T. fasciolatus*, apresentaram piloereção, comportamento nociceptivo (demonstração de incômodo após o toque e busca constante por uma

posição mais cômoda), secreção nasal e oral acentuadas, dispnéia, prurido na face e reflexos normais exacerbados.

A dor no local picado pelo escorpião é o sinal mais comum, predominante no escorpionismo humano em praticamente 100% dos acidentados. É progressiva e

depende da quantidade de veneno inoculada e da sensibilidade individual do acidentado. Ocorre imediatamente após o acidente. Pode ser discreta, restrita ao local de inoculação do veneno, ou insuportável, manifestada na forma de ardor, “agulhada” ou “ferroada”, acompanhada ou não de hiperestesia. Pode irradiar-se até a raiz do membro atingido, exacerbando-se à palpação. Algumas vezes, apesar de sentir e identificar a picada, o paciente não sente a dor, provavelmente por deficiência na inoculação do veneno ou por falta deste no momento da inoculação, consumido antes na captura de uma presa. O local da picada é, às vezes, detectado com dificuldade, podendo-se encontrar hiperemia e edema discretos, acompanhados ou não de sudorese e piloereção local (Ismail e Abd-Elsalam, 1988; Bucarechi et al., 1995; Ismail, 1995; Rezende et al., 1996; Cupo e Hering, 2002; Soares et al., 2002; Cupo et al., 2003; Melo et al., 2004; Campolina, 2006). Neste experimento foi observado, nos camundongos inoculados com os venenos de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus*, comportamento nociceptivo (indicativo de dor).

Uma investigação farmacológica da resposta nociceptiva e da indução de edema pelo veneno de *T. serrulatus* em ratos e camundongos, conduzida por Nascimento Júnior et al. (2005), mostrou como determinadas concentrações de veneno induzem efeitos diferentes. Esse estudo investigou tanto *nociceção*, conceito definido como um estímulo nódico que dá origem à sensação intensa e desagradável de dor aguda, quanto alodinia, dor crônica evocada por

estímulo não-nódico (Rang et al., 2004). Embora os resultados sejam limitados quanto ao estabelecimento de paralelos entre a experiência de dor humana e a manifestação de dor em animais experimentais, concluiu-se que o veneno de *T. serrulatus* causou alodinia térmica e mecânica ipsilateral após injeção intraplantar, qualitativamente diferente da experiência humana, que registra alodinia de larga distribuição, alcançando órgãos distantes do local da picada. O comportamento nociceptivo dos animais foi manifestado por incômodo no local onde foi aplicado o veneno, demarcadamente nos primeiros 15 minutos, enquanto o prurido facial instalou-se rapidamente e permaneceu por uma hora. Há suspeitas de que a resposta nociceptiva imediata tenha sido influenciada pela atuação das neurotoxinas e de eicosanóides endógenos sobre fibras aferentes nociceptivas primárias. Tratamentos com drogas antagonistas de aminas biogênicas, tais como histamina e 5-hidroxitriptamina (5-HT ou serotonina), que foram identificadas como constituintes do veneno, mas também têm origem endógena, inibiram as respostas nociceptivas e o edema, fazendo-se supor uma ampla participação desses mediadores nesses processos.

Experimentos com injeções de veneno de escorpiões em animais produziram sinais locais e sistêmicos, bem como sintomas similares observados em envenenamento humano, como agitação, salivação, lacrimejamento, aumento da motilidade gastrointestinal, arritmias cardíacas e respiratórias, hipertensão arterial seguida de hipotensão, insuficiência cardíaca,

edema pulmonar e choque (Pessini et al., 2008).

Embora o trabalho de Nascimento Júnior et al. (2005) descarte a atuação de citocinas inflamatórias nos processos algésicos locais, devido à rapidez com que eles se instalam, trabalhos mais recentes sobre escorpionismo têm dado amplo destaque para esses mediadores e têm gerado discussões sobre os mecanismos patofisiológicos da Síndrome do Envenenamento Escorpiônico (SEE). Há suspeitas de que parte dos efeitos do veneno escorpiônico seja atribuída à liberação de mediadores inflamatórios, já que foi relatada a ocorrência de síndrome de resposta inflamatória sistêmica, edema pulmonar e até morte em pacientes reincidentes e já tratados com anticorpos contra veneno escorpiônico (Fukuhara et al., 2004). Sofer et al. (1996) encontraram níveis muito elevados, quase oito vezes acima do normal, de interleucina 6 (IL-6) no plasma de crianças acidentadas por *Leiurus quinquestriatus hebreus* e *Buthotus judaicus*; Meki e El-Dean (1998) fizeram um trabalho semelhante no Egito e observaram níveis elevados de IL-6, IL-1 β , óxido nítrico (NO), um importante modulador farmacológico e antitripsina α -1, uma proteína de fase aguda (globulina) produzida pelo fígado em quadros inflamatórios. Essas interleucinas estão diretamente relacionadas com resposta pró-inflamatória e indução de liberação de outras citocinas. Fatani et al., (1998) investigaram a participação de cininas no envenenamento de coelhos por *L. quinquestriatus* e também encontraram alta correlação entre a sua concentração plasmática e a ocorrência de alterações

cardiovasculares. O escorpião venezuelano *T. discrepans* também causou aumento de IL-6 em paciente humanos e foi encontrada alta correlação com os níveis de amilase pancreática após o acidente (D'Suze et al., 2003). Em trabalhos semelhantes ao anterior, porém envolvendo acidentes com *T. serrulatus*, Magalhães et al., (1999) e Fukuhara et al., (2003) registraram o aumento plasmático de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) e fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) em pacientes com quadros graves de intoxicação. Em trabalhos experimentais com *T. serrulatus*, Petricevich et al., (2007) constataram a estimulação de produção de citocinas por macrófagos, *in vitro*, promovida pela toxina Tsl (toxina γ) isolada. Fukuhara et al., (2004) avaliaram os níveis de cininas em pacientes humanos acidentados por *T. serrulatus*, coincidindo os maiores níveis com os quadros mais graves. As cininas, como a bradicinina, também causam dor local, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, promovem a migração de polimorfonucleares e a liberação de citocinas, prostaglandinas e leucotrienos. A bradicinina foi relatada por Freire-Maia e Campos (1987) como possível causadora de edemas pulmonares de origem não-cardiogênica no envenenamento escorpiônico. A participação de bradicinina NO e IL-1 foi também constatada experimentalmente por Pessini et al. (2006) na indução de febre em ratos inoculados com veneno de *T. serrulatus* por via intraperitoneal, mostrando-se esses mediadores os mais importantes na resposta febril da SEE. Os

mecanismos exatos dos mediadores inflamatórios e farmacológicos no envenenamento escorpiano não estão definidos a contento, mas tais resultados lhes dão lugar de destaque e poderão explicar, conjuntamente à liberação de neurotransmissores, muitos sinais clínicos causados pelo veneno de escorpião, além de auxiliar na terapêutica da SEE.

Embora não se conheça a composição do veneno de *T. fasciolatus*, provavelmente a inoculação deste no tecido subcutâneo dos camundongos resultando em liberação de mediadores farmacológicos da dor, semelhante ao que ocorre após a inoculação do veneno de *T. serrulatus*.

Em humanos, as manifestações respiratórias incluem rinorréia, tosse, espirros, estertores pulmonares, sibilos, taquipnéia, dispnéia e bradipnéia, mas sem dúvida o edema pulmonar é o sinal mais grave e importante do acidente escorpiano (Campos et al., 1979; Cupo et al., 2003). Todos os animais dos grupos II e III, após a inoculação do veneno de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus*, apresentaram acentuada rinorréia.

O prurido facial apresentado pelos camundongos pode ter sido decorrente de reações de hipersensibilidade do tipo I, provocadas por histamina, anticorpos do tipo IgE, mastócitos, basófilos e eosinófilos. A combinação de IgE com antígeno na superfície de mastócitos causa a formação de moléculas vasoativas e a liberação de histamina dos grânulos dos mastócitos. A histamina provoca contração da musculatura lisa nos brônquios, trato gastrointestinal, e bexiga e aumenta a

permeabilidade vascular causando extravasamento de fluido, além de ser uma potente estimuladora das secreções exócrinas, estimulando a secreção de muco brônquico, lacrimejamento e salivação (Tizard, 2002). A constrição brônquica e secreção de muco são também consequências da estimulação de receptores muscarínicos pela acetilcolina (Rang et al., 2004), um dos neurotransmissores que podem ser liberados em função da ação neurotóxica do veneno de escorpião.

O veneno alcança níveis máximos de distribuição nos pulmões de ratos em 30 minutos (Revelo et al., 1996). Essa característica farmacocinética coincide com a forma aguda como os sinais que foram observados nos camundongos deste experimento. Não foi encontrada na literatura consultada relatos de toxinas de veneno escorpiano que lesem ou irrite a mucosa do trato respiratório superior, mas diante desses sinais apresentados, tal possibilidade deve ser considerada. O prurido facial pode ser justificado pela vasodilatação, aumento de permeabilidade e extravasamento de líquido, estimulados pela histamina.

Assim como a rinorréia, a salivação abundante foi causada por aumento de secreção. O trato gastrointestinal pode ter sido influenciado por efeitos parassimpáticos advindos da liberação de acetilcolina, que estimula as secreções exócrinas (Rang et al., 2004).

5.1.5. Alterações Hematológicas

O quadro clínico do envenenamento escorpiano está na dependência de fatores relacionados com o escorpião e

com a vítima. Os fatores relacionados ao escorpião são: espécie, condição do tétson no momento do acidente, número de picadas ou quantidade de veneno injetada. Em relação à vítima há idade, peso corporal, estado de saúde, doenças concomitantes e ineficácia do tratamento (Dehesa-Dávila e Possani, 1994). Assim, a realização dos exames laboratoriais é essencial, objetivando-se a monitoração do paciente e a reversão do quadro clínico de envenenamento escorpiônico.

Os parâmetros hematológicos em camundongos podem ser influenciados por vários fatores, como linhagem, idade, sexo, espécie, anestesia utilizada na coleta, método de contenção e estresse (Thrall, 2004). Com o objetivo de minimizar estes fatores, neste experimento foram escolhidos camundongos machos da mesma linhagem (*Swiss*), idade e peso (18 a 20g). Todos eram procedentes do mesmo biotério, criados nas mesmas condições de manejo e recebendo a mesma alimentação. No momento da coleta de sangue, todos receberam a mesma contenção, portanto, conseguiu-se assim, a padronização dos valores hematológicos.

Nas tabelas 11, 12, 13, 14 e gráficos 1, 2, 3 e 4 estão os valores do eritrograma dos camundongos após a inoculação dos venenos de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus*. Em relação ao número dos eritrócitos (Tab.11), não foi observada diferença significativa entre grupos e tempos ($P>0,05$). Houve um aumento significativo ($P<0,05$) da concentração de hemoglobina (Tab. 12) e do volume globular (Tab. 13) no grupo II, 8h após a inoculação do veneno de *T.*

fasciolatus quando comparado com outros grupos.

De forma semelhante, Ribeiro et al. (2009) observaram aumento do número de hemácias e da concentração de hemoglobina nas primeiras horas após inoculação do veneno de *Tityus serrulatus* em cães. Após 12 horas esses valores retornaram aos valores iniciais.

Neste experimento, existem duas possíveis causas do aumento do eritrograma. O discreto aumento do número dos eritrócitos e os significativos aumentos da concentração de hemoglobina e do volume globular podem ter sido decorrentes da dor e do estresse (efeito das catecolaminas), levando a uma contração esplênica. Porém, como os animais manifestaram abundante salivação e rinorréia, que poderiam levar a um quadro de desidratação, essa também pode ter sido responsável pela discreta hemoconcentração, já que os valores da proteína total também apresentaram discreto aumento.

A contração esplênica pode causar aumento no volume globular em decorrência do efeito simpato-adrenal evocado pelo veneno escorpiônico. Andrade et al. (2004), fizeram avaliação completa dos níveis plasmáticos de eletrólitos e do balanço ácido-básico em ratos e observaram aumento significativo de volume globular 60 minutos após a inoculação de veneno de *T. serrulatus*. O efeito da contração esplênica em cães, após o envenenamento escorpiônico, foi estudado por Tarasiuk e Sofer (1999), sendo impedida por meio de bloqueios de receptores adrenérgicos esplênicos e

ligaduras em vasos sanguíneos do baço, demonstrando-se que a contração esplênica ocorre em função do efeito das catecolaminas.

Cusinato et al. (2002) avaliaram as mudanças hematológicas causadas pelo veneno de *Tityus serrulatus* em ratos e observaram aumento de volume globular e hemoglobina devido a uma

hemoconcentração causada pela desidratação.

Bertazzi et al. (2003) avaliaram a hemoconcentração, em ratos, após a inoculação de veneno bruto de *T. serrulatus* e de sua toxina mais importante, TsTX-I, e atribuíram sua ocorrência às perdas de líquidos por salivação, lacrimejamento e micção.

Tabela 11 – Valores médios do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$)			
Tempo	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	8,60 ^{Aa}	8,81 ^{Aa}	8,86 ^{Aa}
T8h	8,41 ^{Aa}	9,01 ^{Aa}	8,44 ^{Aa}
T24h	8,48 ^{Aa}	8,47 ^{Aa}	8,52 ^{Aa}

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

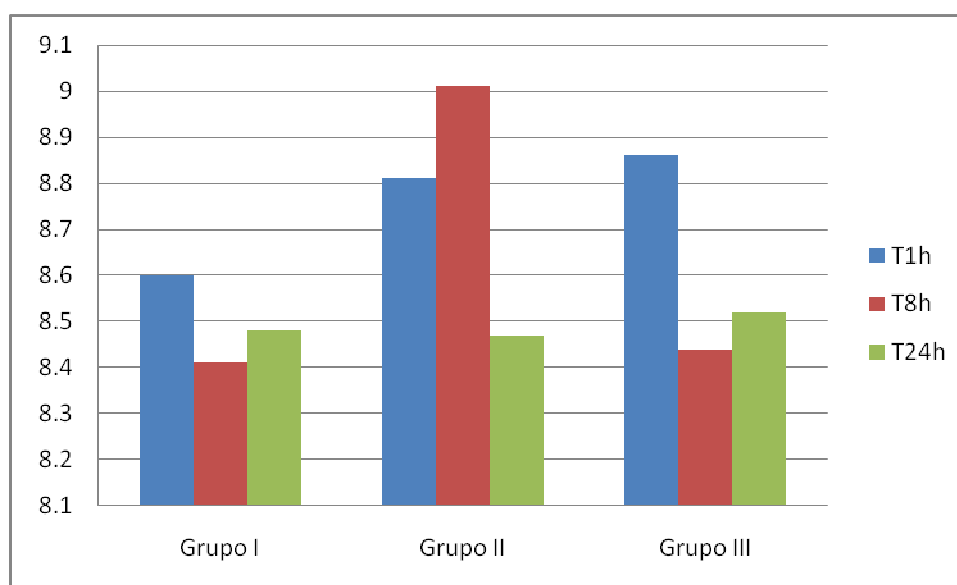


Gráfico 1- Valores médios do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tabela 12- Valores médios das concentrações de hemoglobina (g/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Hemoglobina (g/dl)			
Tempo	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	14,18 ^{Aa}	13,71 ^{Aab}	13,83 ^{Aa}
T8h	13,33 ^{Ba}	14,43 ^{Aa}	13,42 ^{Ba}
T24h	13,62 ^{Aa}	13,57 ^{Ab}	13,45 ^{Aa}

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

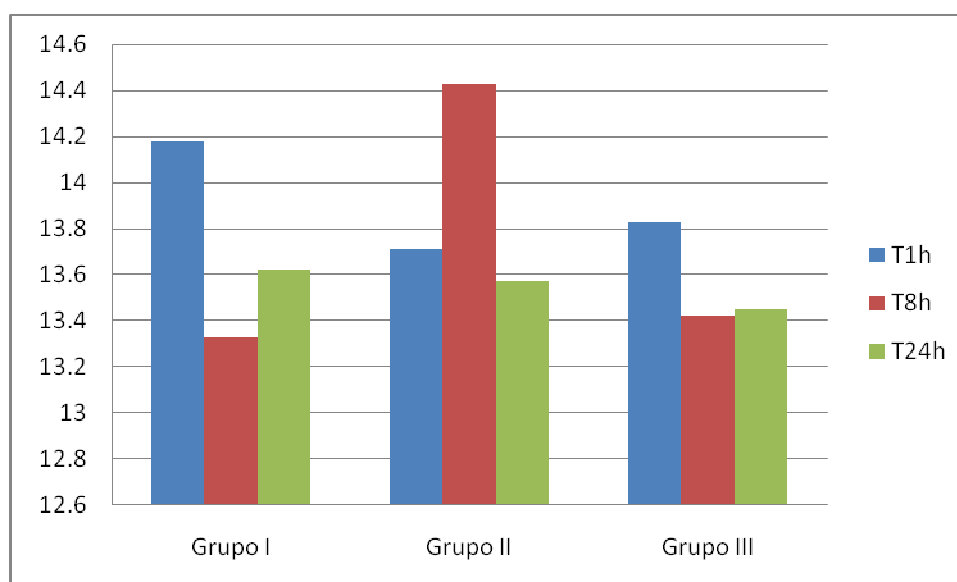


Gráfico 2- Valores médios das concentrações de hemoglobina (g/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tabela 13 - Valores médios do volume globular (%) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Volume globular (%)			
Tempo	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1	42,33 ^{Aa}	42,67 ^{Ab}	44,67 ^{Aa}
T8	41,67 ^{Ba}	45,67 ^{Aa}	42,67 ^{Bab}
T24	39,67 ^{Aa}	41,0 ^{Ab}	41,50 ^{Ab}

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

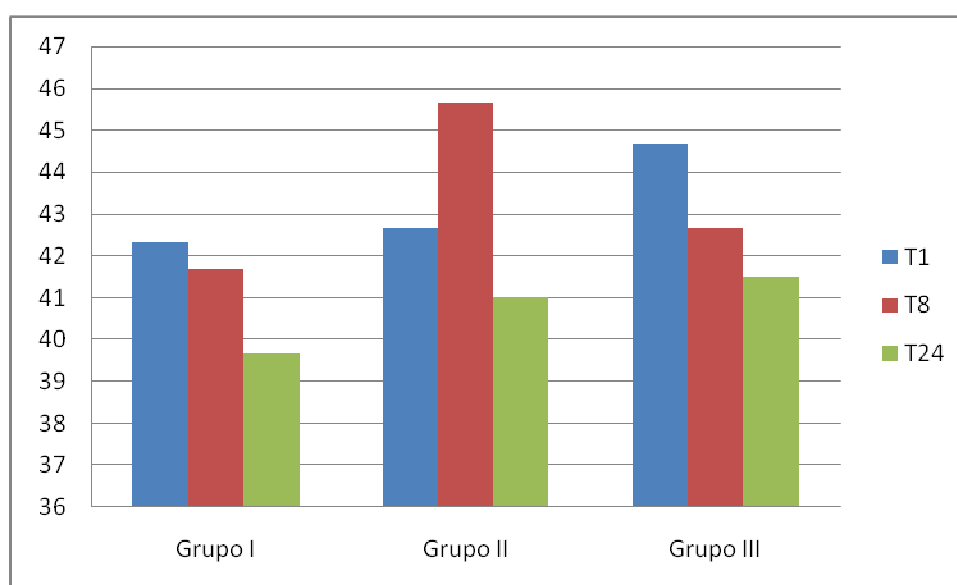


Gráfico 3- Valores médios do volume globular (%) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Como mostra a tabela 14, não houve diferença entre os valores de volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média. O veneno de escorpiões não é caracterizado na literatura científica

como causador de anemia, hemólise, lesões vasculares ou interferências na medula óssea, de modo que a manutenção da contagem de hemácias, da concentração de hemoglobina e do volume globular médio é coerente com esse fato.

Tabela 14– Valores médios de hemoglobina globular média, HGM (pg), volume globular médio, VGM (g/dl) e concentração de hemoglobina globular média, CHGM (fl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tempo	HGM (pg)			VGM (g/dl)			CHGM (fl)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	16,33 ^{Aa}	15,55 ^{Aa}	15,67 ^{Aa}	48,83 ^{Aa}	48,52 ^{Aa}	50,60 ^{Aa}	33,52 ^{Aab}	32,18 ^{Aba}	31,02 ^{Ba}
T8h	15,95 ^{Aa}	16,05 ^{Aa}	15,85 ^{Aa}	49,72 ^{Aa}	50,75 ^{Aa}	50,45 ^{Aa}	32,18 ^{Ab}	31,67 ^{Aa}	31,43 ^{Aa}
T24h	16,07 ^{Aa}	16,05 ^{Aa}	15,85 ^{Aa}	46,82 ^{Aa}	48,60 ^{Aa}	48,87 ^{Aa}	34,32 ^{Aa}	33,08 ^{Aba}	32,42 ^{Ba}

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

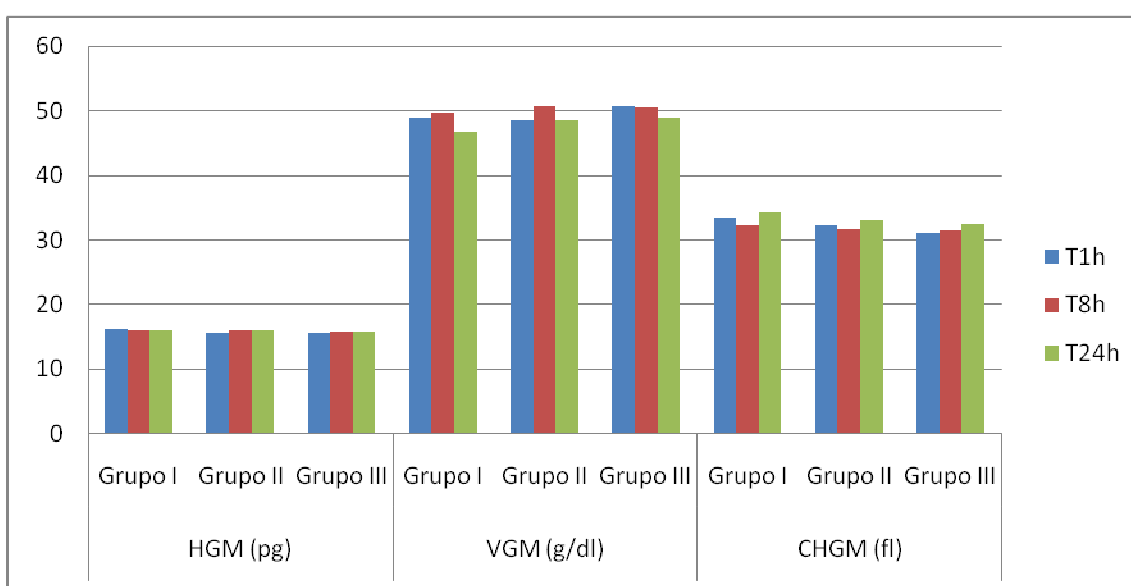


Gráfico 4- Valores médios de hemoglobina globular média, HGM (pg), volume globular médio, VGM (g/dl) e concentração de hemoglobina globular média, CHGM (fl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

A contagem de leucócitos totais está representada na tabela 15 e no gráfico 5. Observou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) da contagem total dos leucócitos no GII (*T. fasciolatus*) 8h após a inoculação do veneno, ultrapassando de forma discreta os

limites máximos para a espécie (2,61 a 10,05) (Thrall, 2004). Leucocitose também foi observada por Ribeiro et al. (2009) em cães envenenados com o veneno de *Tityus serrulatus*, retornado a normalidade após 24 horas.

Tabela 15- Valores médios do numero total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{l}$)			
Tempo	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	7,18 ^{Aa}	6,45 ^{Ab}	7,08 ^{Aab}
T8h	9,37 ^{Aba}	10,18 ^{Aa}	7,48 ^{Bb}
T24h	8,25 ^{Aa}	7,22 ^{Ab}	8,37 ^{Aa}

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

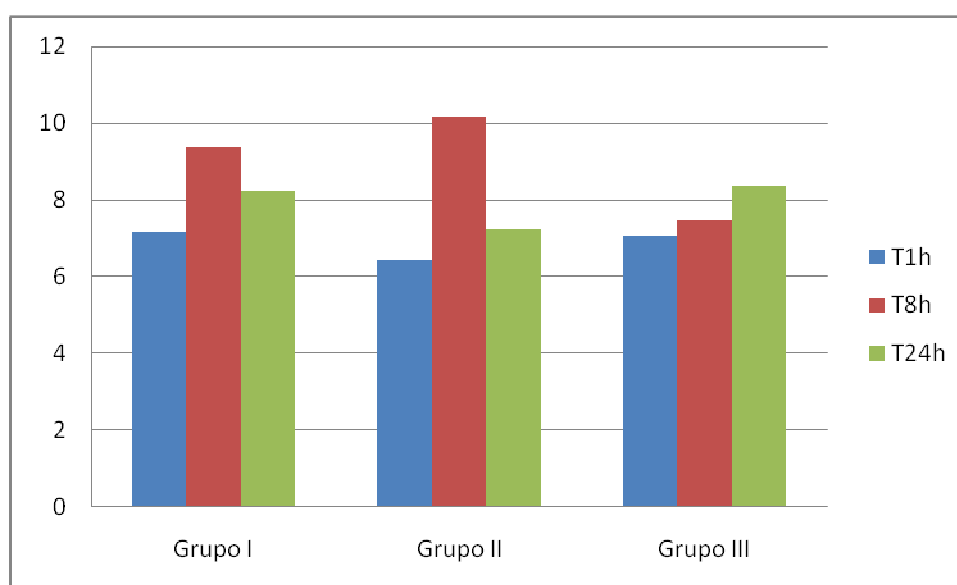


Gráfico 5- Valores médios do numero total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Os valores absolutos do número de neutrófilos e linfócitos estão representados na tabela 16 e no gráfico seis.

Leucocitose com neutrofilia é uma alteração comum, registrada em muitos casos clínicos humanos de envenenamento escorpiónico (Gueron et al., 1967; Bucarechi et al., 1995; Cupo e Hering, 2002; Melo et al., 2004) e também em cães (Cordeiro et al., 2006; Labarrère et al., 2007). Embora sejam

relatadas reações inflamatórias decorrentes das neurotoxinas presentes no veneno dos escorpiões, como miocardite e pancreatite, e a vasta participação de citocinas e mediadores inflamatórios (óxido nítrico, leucotrienos, catecolaminas, bradicininas e prostaglandinas) conforme descrito por Fukuhara et al., (2003 e 2004), o mecanismo mais provável é o estresse causado pela dor, que maximiza a descarga de adrenalina e provoca leucocitose fisiológica devido

ao desprendimento de leucócitos do *pool* marginal dos vasos sanguíneos

(Jain, 1993).

Tabela 16– Valores médios absolutos de neutrófilos e linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tempo	Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)			Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	0,95 ^{Aa}	1,04 ^{Aa}	1,33 ^{Aa}	5,84 ^{Aa}	5,10 ^{Ab}	5,50 ^{Aa}
T8h	0,82 ^{Aa}	1,10 ^{Aa}	1,45 ^{Aa}	7,89 ^{Aa}	8,50 ^{Aa}	5,60 ^{Ba}
T24h	0,97 ^{Aa}	0,86 ^{Aa}	1,30 ^{Aa}	6,60 ^{Aa}	5,97 ^{Ab}	6,53 ^{Aa}

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

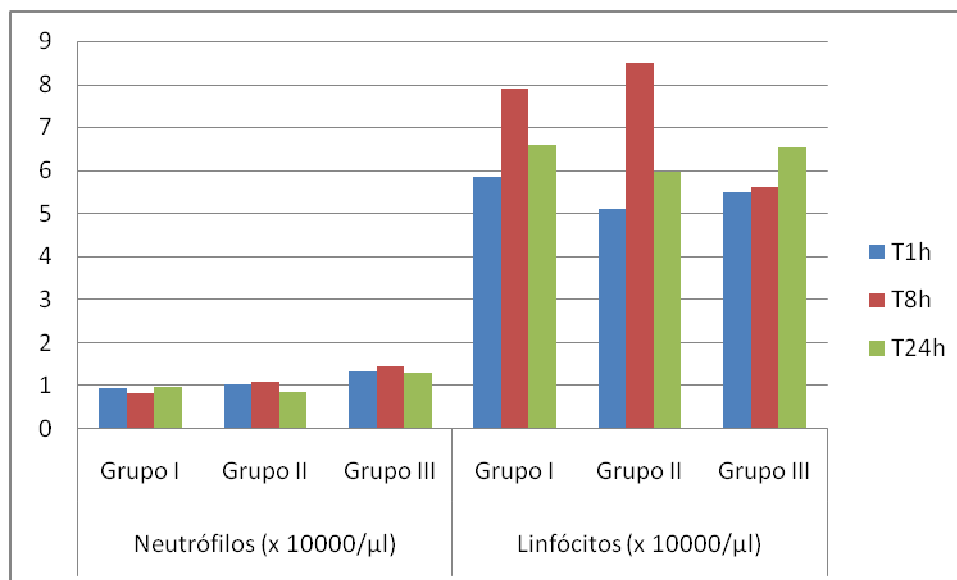


Gráfico 6- Valores médios absolutos de neutrófilos e linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Conforme observado na tabela 16, não houve alteração do número absoluto de neutrófilos entre grupos ou tempos. Em relação ao número de linfócitos, pode-se observar um aumento significativo ($P < 0,05$) nos animais do GII (*T. fasciolatus*) 8h após a inoculação do veneno.

Os linfócitos são as principais células circulantes dos camundongos. Portanto, a leucocitose fisiológica descrita anteriormente provavelmente foi decorrente da linfocitose.

As contagens do número absoluto de monócitos e eosinófilos estão apresentadas na tabela 17 e no gráfico 7.

Tabela 17– Valores médios absolutos de monócitos e eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tempo	Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)			Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	0,29 ^{Ab}	0,23 ^{Aa}	0,19 ^{Aa}	0,10 ^{Ab}	0,10 ^{Ab}	0,07 ^{Aa}
T8h	0,35 ^{Aab}	0,27 ^{Aa}	0,30 ^{Aa}	0,29 ^{Aa}	0,30 ^{Aa}	0,12 ^{Aa}
T24h	0,52 ^{Aa}	0,32 ^{Aa}	0,34 ^{Aa}	0,15 ^{Ab}	0,07 ^{Ab}	0,19 ^{Aa}

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

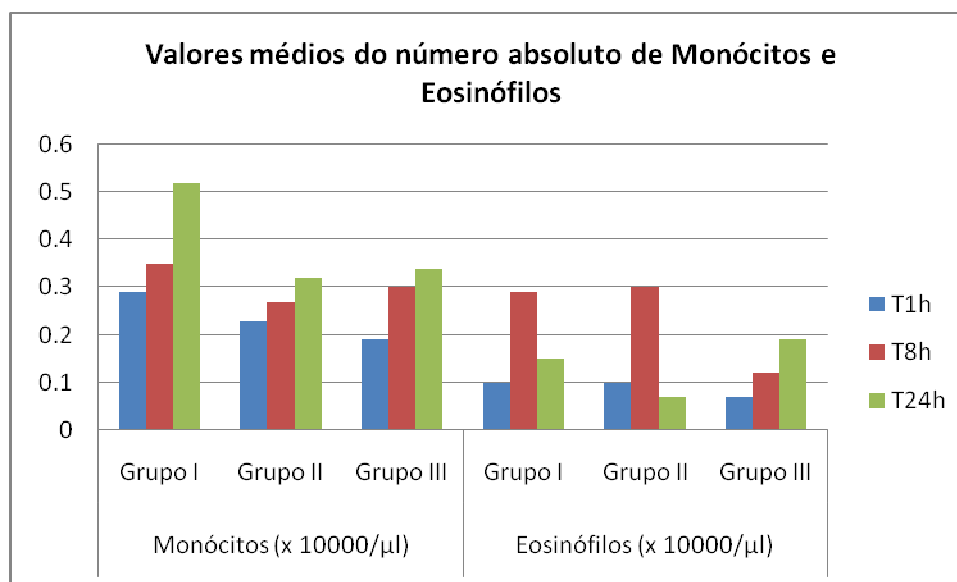


Gráfico 7- Valores médios absolutos de monócitos e eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Em relação ao número absoluto de monócitos e eosinófilos não houve diferença entre os grupos estudados. Ressalta-se que a eosinofilia ocorre em doenças alérgicas e nos processos de hipersensibilização (Jain, 1993), não observados neste experimento.

As tabelas 18, 19 e 20 e gráficos 8, 9 e 10 mostram os valores da concentração

plasmática de proteínas totais, albumina e as frações de globulina, respectivamente. Uma das funções das proteínas presentes no plasma é a manutenção da pressão osmótica. Assim, quando ocorre um aumento das proteínas plasmáticas por deficiência relativa de água, todas as frações, albumina e globulinas, aumentam aproximadamente na mesma proporção.

Quando o motivo do aumento não for por desidratação, apenas as frações globulinas aumentam enquanto a albumina se mantém inalterada ou diminui (Kaneko, 1997b). Determinadas glicoproteínas plasmáticas, normalmente presentes em quantidades diminutas no plasma, aumentam após injúrias ou lesões teciduais. Isto ocorre devido ao desencadeamento de uma série de reações complexas que tentam impedir a progressão dos danos teciduais, isolar e, quando possível, destruir o agente agressor, assim como parar a ativação dos processos de reparação da injúria. Esta complexa

reação culmina com a liberação de citocinas e consequente liberação das proteínas de fase aguda. O perfil eletroforético pode sugerir a ocorrência de processos inflamatórios agudos e crônicos, disfunções hepáticas, perdas protéicas, síndromes nefróticas e alterações das globulinas que ajudam o entendimento da resposta imunológica (Naoum, 1990).

Crispens, 1975, relatou que as concentrações das proteínas plasmáticas podem variar segundo a tabela 18.

Tabela 18 - Valores relativos normais para proteínas séricas de camundongos (%).

Proteína	Valores relativos
Albumina	60,8 a 65,7%
Alfa-globulinas	12,1 a 14,8%
Beta-globulinas	16,5 a 20,4%
Gama-globulinas	4,3 a 7%

Adaptado de: Crispens, 1975.

Neste experimento, observou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) das proteínas plasmáticas após 8 e 24 horas no GII (Tab. 19). Já no GIII, os valores de proteínas totais foram maiores no T8, quando comparado com T1 e T24.

Em relação à albumina, ocorreu um aumento significativo ($P < 0,05$) no GI (PBS), ficando os grupos I e II diferentes ($P > 0,05$) do GIII 24h após a inoculação (Tab. 20).

Tabela 19- Valores médios das concentrações de proteínas plasmáticas (g/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tempo	Proteínas Plasmáticas (g/L)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	5,60 ^{Ab}	5,33 ^{ABb}	5,10 ^{Bb}
T8h	5,80 ^{ABb}	6,10 ^{Aa}	5,50 ^{Ba}
T24h	6,17 ^{Aa}	6,27 ^{Aa}	5,13 ^{Bb}

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

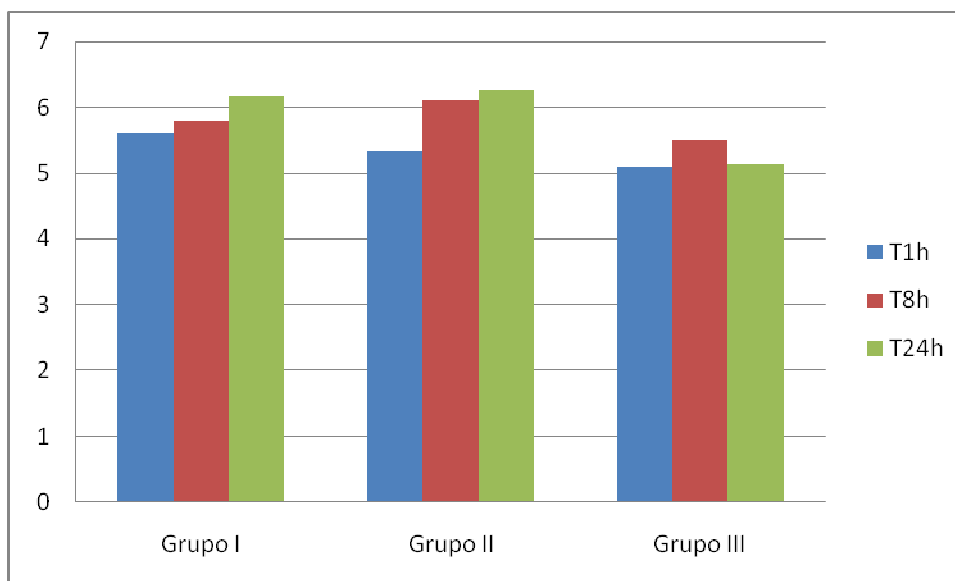


Gráfico 8- Valores médios das concentrações de proteínas plasmáticas (g/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tabela 20- Valores séricos médios de albumina (g/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Albumina (g/dl)			
Tempo	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	3,48 ^{Ab}	3,53 ^{Aa}	3,21 ^{Aa}
T8h	3,65 ^{Aab}	3,67 ^{Aa}	3,55 ^{Aa}
T24h	4,07 ^{Aa}	3,74 ^{Aa}	3,12 ^{Ba}

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

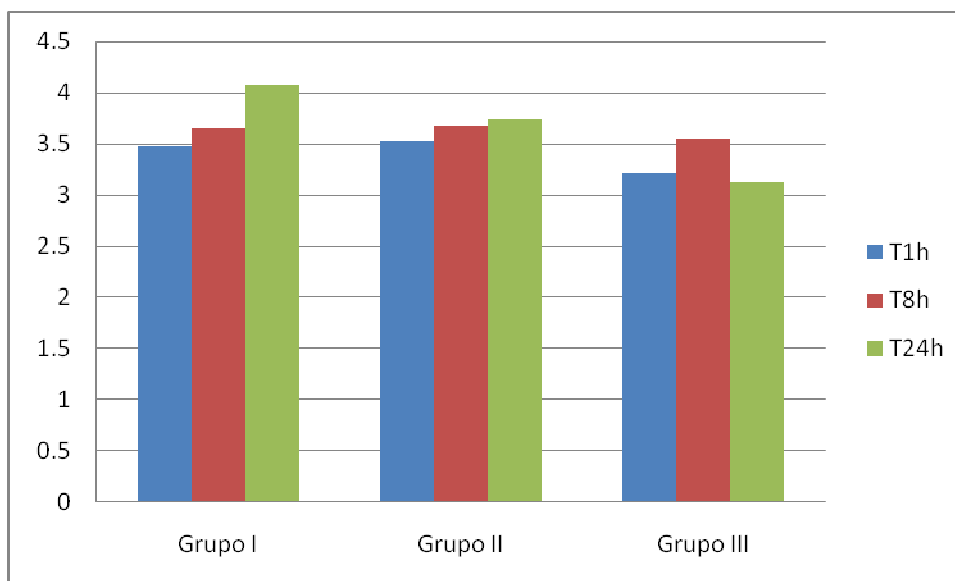


Gráfico 9- Valores séricos médios de albumina (g/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Os maiores valores da fração α -globulina foram observados em T24 no GII (*T. fasciolatus*). Como relatado anteriormente, a presença de leucocitose observada em T8 e o aumento de α -globulina revelaram uma reação

inflamatória causada pelo veneno escorpionic.

Também houve aumento de β -globulina em T8 e em T24 no GII (*T. fasciolatus*).

Tabela 21 – Valores médios das α , β e γ -globulina (g/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tempo	α -globulina (g/dl)			β -globulina (g/dl)			γ -globulina (g/dl)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	0,74 ^{Aab}	0,72 ^{Aa}	0,65 ^{Aa}	1,35 ^{Ab}	1,05 ^{Ab}	1,21 ^{Aa}	0,03 ^{Aa}	0,03 ^{Aa}	0,02 ^{Aa}
T8h	0,85 ^{Aa}	0,87 ^{Aa}	0,81 ^{Aa}	1,28 ^{Ab}	1,53 ^{Aa}	1,22 ^{Aa}	0,02 ^{Ba}	0,03 ^{ABa}	0,04 ^{Aa}
T24h	0,66 ^{Bb}	0,87 ^{Aa}	0,81 ^{ABa}	1,90 ^{Aa}	1,78 ^{Aa}	1,17 ^{Ba}	0,03 ^{Aa}	0,03 ^{Aa}	0,03 ^{Aa}

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

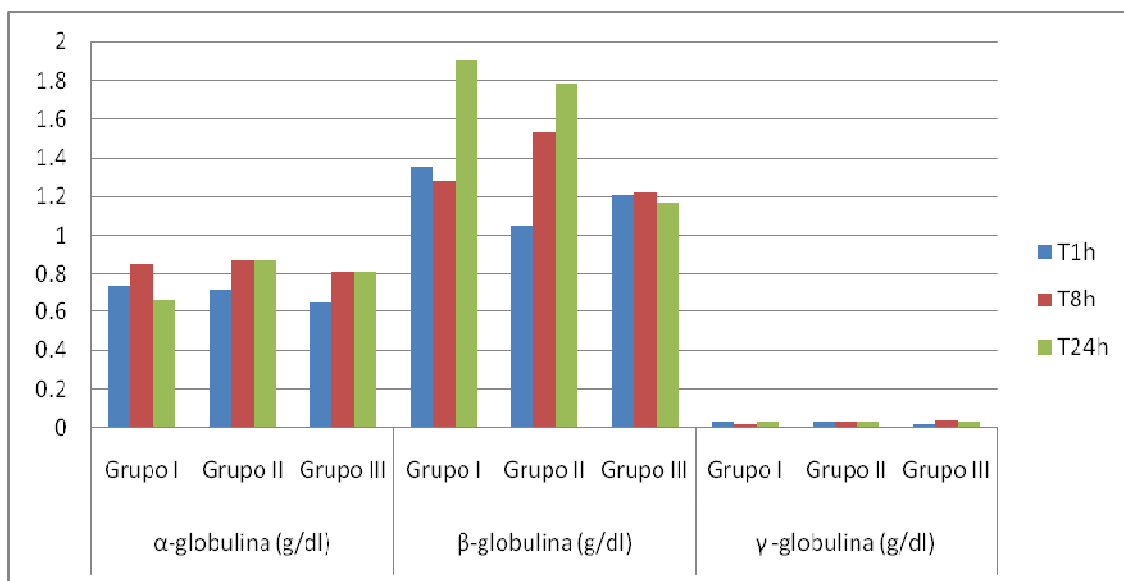


Gráfico 10- Valores médios das α , β e γ -globulinas (g/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

5.1.6. Bioquímica sérica

Na tabela 22 e gráfico 11 encontram-se os valores da enzima creatina quinase (CK) e sua isoenzima (CK-MB).

Tabela 22- Valores médios de CK (U/l) e CK-MB (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tempo	CK (U/l)			CK-MB (U/l)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	1110,33 ^{Aa}	1040,67 ^{Aa}	1491,17 ^{Aa}	244,17 ^{Aa}	243,67 ^{Aab}	334,17 ^{Aa}
T8h	1673,33 ^{Aa}	986,67 ^{Aa}	1181,83 ^{Aa}	150,00 ^{Ba}	363,33 ^{Aa}	335,67 ^{Aa}
T24h	1106,67 ^{Aa}	930,00 ^{Aa}	1524,50 ^{Aa}	236,67 ^{Ba}	150,00 ^{Bb}	422,17 ^{Aa}

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

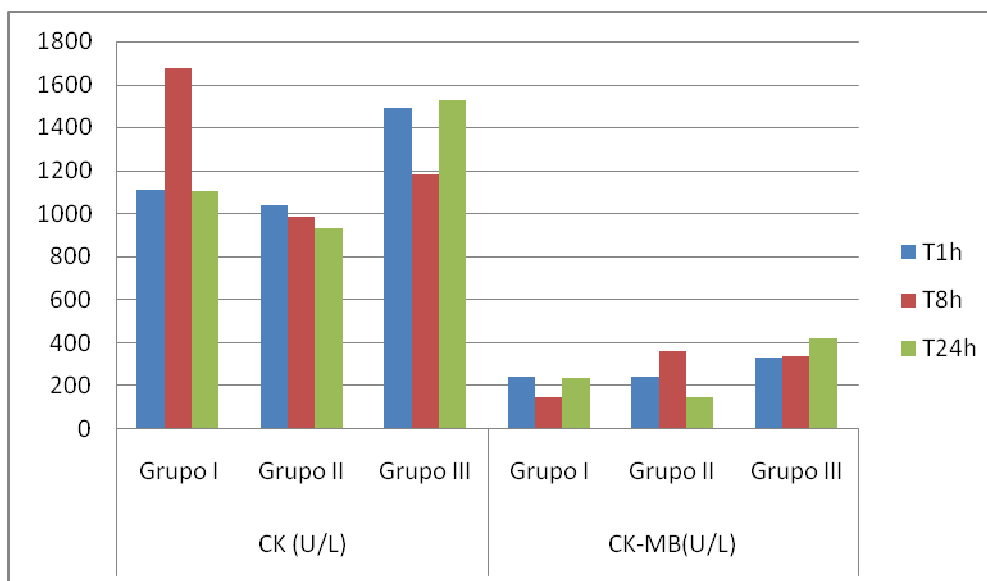


Gráfico 11- Valores médios de CK (U/L) e CK-MB (U/L) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Pode-se observar que não ocorreu diferença significativa da enzima CK entre grupos ou tempos estudados. Os resultados deste experimento se assemelham aos de Ribeiro (2008), que também não observou aumento de CK em cães, após a inoculação do veneno de *T. serrulatus*. Apenas grandes elevações nos níveis de CK têm significância clínica, pois injeções intramusculares, ferimentos e decúbito prolongado tendem a causar pequenos aumentos dessa enzima. A CK catalisa a fosforilação reversível de creatina em fosfocreatina, uma reserva de energia que participa da fosforilação de ADP em ATP, necessário para a contração muscular anaeróbia. As isoenzimas de CK são formadas por dois protômeros, M (músculo) ou B (cérebro). Assim, em humanos, a CK-BB está presente no cérebro, a CK-MM, nos músculos esquelético e cardíaco e a CK-MB principalmente no coração. Por sua presença no miócito e atuando na

contração muscular, a CK é a enzima mais sensível para indicar lesão muscular e tem meia vida curta, diferente da AST (Cardinet, 1997; Kramer e Hoffmann, 1997; Thompson, 1997). Em relação à isoenzima CK-MB, também não houve alteração nos diferentes tempos estudados dos grupos I (PBS) e III (*T. serrulatus*). Porém, no GII (*T. fasciolatus*) ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) 24h após a inoculação do veneno.

Quando ocorre necrose do miocárdio, há liberação da isoenzima CK-MB para o meio extracelular, sendo a sua dosagem um importante recurso para a detecção de tal problema (Kaneko, 1997). Entretanto, é importante considerar os valores de CK-MB em relação à CK total para determinar se está realmente aumentada. Ou seja, a porcentagem de CK-MB em relação ao valor total de CK fornece um dado confiável quando se avalia uma possível lesão do miocárdio, pois valores

aumentados de CK-MB acompanhados de aumento de CK podem ser resultantes de um esforço físico, por exemplo. Porém, quando se observa aumento de CK-MB não acompanhado de aumento da CK, altera-se a porcentagem dessa isoenzima,

permitindo-se verificar que houve discreta lesão no músculo cardíaco.

Quando se calculou a porcentagem da isoenzima CK-MB em relação a CK total, obtiveram-se os seguintes resultados (Tab. 23) e gráfico 12:

Tabela 23- Porcentagem da isoenzima CK-MB em relação a CK total de camundongos

Tempo	Porcentagem de CK-MB (%)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	21,99	23,41	22,41
T8h	8,96	36,82	28,40
T24h	21,39	16,00	27,69

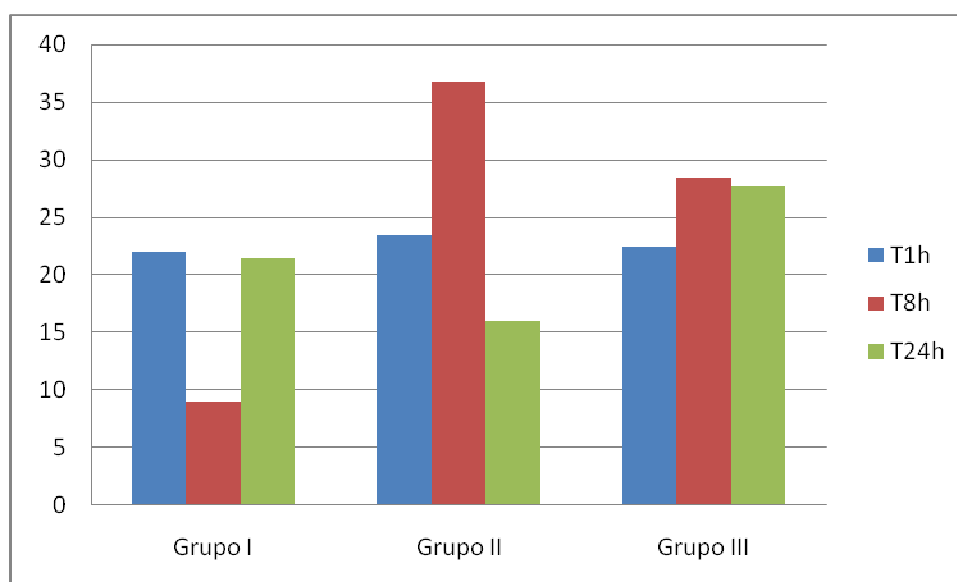


Gráfico 12- Porcentagem da isoenzima CK-MB em relação à CK total de camundongos

Ressalta-se que a porcentagem da fração CK-MB representa em torno de 20 a 30% da CK total (Camarozano e Henriques, 1996; Melo et al., 2008). Portanto, percebe-se que, 8h após a inoculação dos venenos de *T. fasciolatus* (GII) e *T. serrulatus* (GIII), ocorreu um aumento da porcentagem da isoenzima CK-MB, também observado

24h após a inoculação do veneno escorpiónico em GIII.

Outras enzimas que podem ser utilizadas para a avaliação do miocárdio são aspartato aminotransferase (AST) e lactato desidrogenase (LDH). Nas tabelas 24, 25 e gráficos 13 e 14 estão os valores de AST e LDH, respectivamente.

Tabela 24- Valores médios de AST (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tempo	AST (U/l)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	224,33 ^{Aa}	175,67 ^{Ba}	225,17 ^{Aa}
T8h	215,83 ^{Aa}	196,17 ^{Aa}	219,83 ^{Aa}
T24h	191,00 ^{Aa}	179,83 ^{Aa}	209,17 ^{Aa}

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

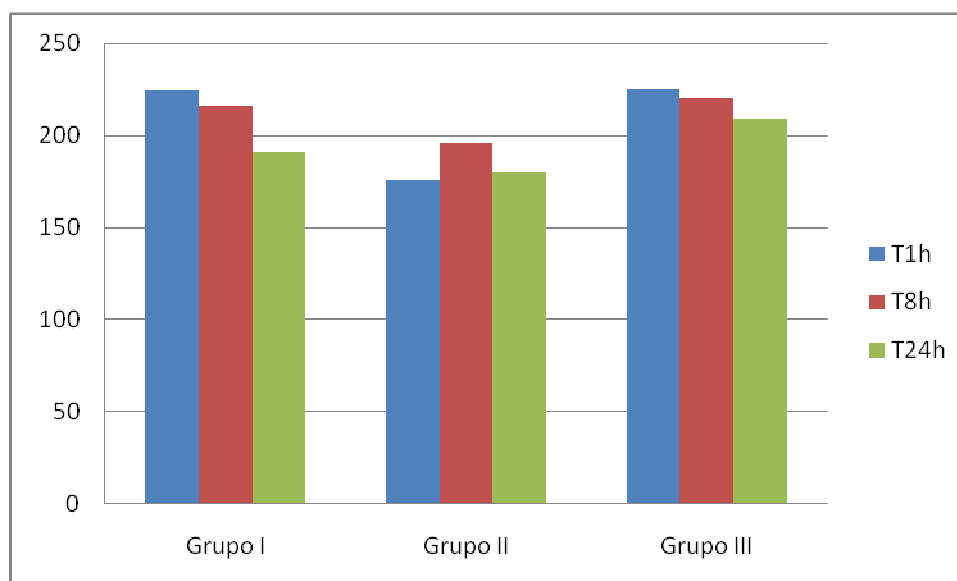


Gráfico 13 - Valores médios de AST (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Não houve diferença significativa dos valores de AST entre grupos e tempos estudados (Tab. 24).

Tabela 25- Valores médios de LDH (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tempo	LDH (U/l)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	1098,33 ^{Aa}	1292,67 ^{Aa}	975,33 ^{Aa}
T8h	952,50 ^{Aa}	405,00 ^{Bb}	930,67 ^{Aa}
T24h	672,00 ^{Aa}	763,50 ^{Ab}	1013,83 ^{Aa}

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

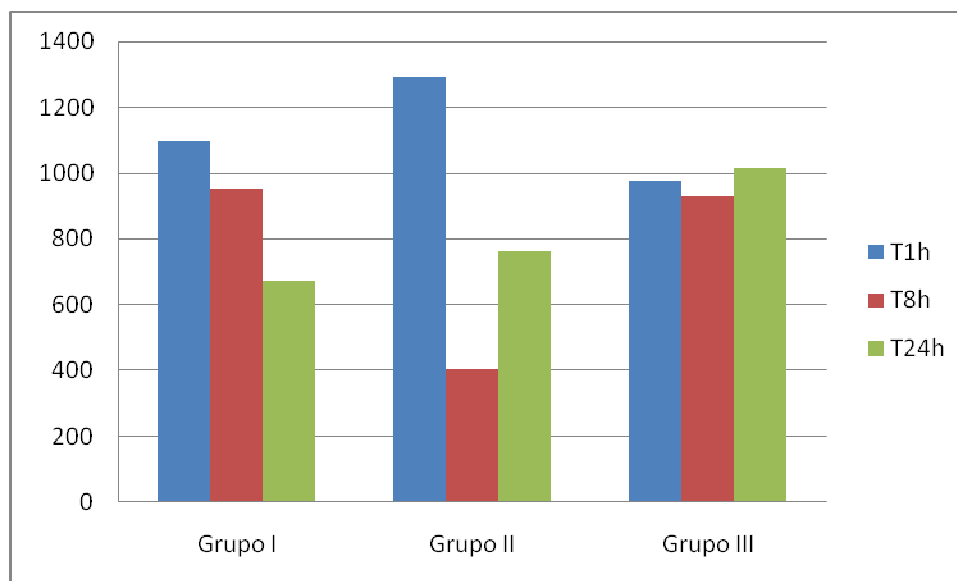


Gráfico 14- Valores médios de LDH (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Não houve alteração da enzima LDH nos diferentes tempos estudados dos grupos I e III. Porém, 8h após a inoculação do veneno de *T. fasciolatus*, ocorreu uma diminuição da enzima LDH.

A atividade total da lactato desidrogenase (LDH) é alta em músculos de contração rápida, porém pode-se modificar também nas afecções hepáticas e nas anemias (Kaneko, 1997).

As enzimas musculares têm diferentes meias-vidas no plasma. Por exemplo, a CK tem uma meia-vida de somente poucas horas enquanto a AST tem uma meia-vida muito mais longa. Como algumas enzimas também apresentam grande flutuação, dependendo da doença na forma subclínica ou na forma clínica, a combinação de testes tem uma sensibilidade maior do que somente uma enzima (Boyd, 1988).

A AST, por ser uma enzima mitocondrial e citosólica, necessita de uma lesão celular mais grave para ser liberada na corrente sanguínea. Motivo esse que talvez não tenha ocorrido uma lesão tão acentuada para que ocorressem alterações no aumento de AST nos camundongos. Porém CK e LDH por serem citosólicas e de tamanho pequeno, conseguem ultrapassar a membrana celular, mesmo que não exista um dano tecidual grande. Assim, de acordo com os resultados observados, pode-se afirmar que não ocorreu lesão muscular cardíaca significativa.

A complexidade da SEE gera divergências entre pesquisadores, sobretudo acerca do sistema cardiovascular. Gueron e Ovsyshcher (1987) levantaram questões relevantes sobre o tratamento das manifestações cardiovasculares do envenenamento

escorpiônico relativas às gêneses dos diferentes quadros clínicos. Assim, o envenenamento grave foi separado em cinco síndromes, que podem acontecer isoladas ou em conjunto: (1) hipertensão; (2) edema pulmonar com hipertensão; (3) hipotensão; (4) edema pulmonar com hipotensão e (5) distúrbios rítmicos, como taquicardia ou bradicardia sinusal, despolarização atrial e ventricular prematuras, taquicardias supraventriculares, bloqueio átrio-ventricular e taquicardia ventricular. Freire-Maia e Campos (1987), no entanto, salientaram que os resultados de várias pesquisas têm mostrado que o envenenamento escorpiônico é uma síndrome muito complexa, não sendo possível diferenciá-la naquelas cinco síndromes. Dependendo da dose de veneno usada, taquicardia sinusal e hipertensão arterial poderiam ser seguidas por bloqueio átrio-ventricular e hipotensão. Além disso, alterações de ritmo cardíaco não ocorrem sozinhas, sem efeito simultâneo sobre a pressão arterial sistêmica. Outra comprovação da complexidade foi a constatação de que a taquicardia sinusal é causada por estimulação β -adrenérgica, ao passo que a hipertensão é evocada pela estimulação de catecolaminas em receptores α .

Na tabela 26 estão os valores de uréia e creatinina e nos gráficos 15 e 16 estão os valores de uréia e creatinina, respectivamente, dos camundongos após a inoculação dos venenos de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus*. Foi observada diminuição significativa dos valores médios de uréia 8h após a inoculação dos venenos de *T. fasciolatus* (GII) e *T. serrulatus* (GIII).

Isto pode ter sido decorrente da menor ingestão de alimento nas primeiras horas após o envenenamento causado pela dor. Da mesma forma, quando se compara os tempos, os grupos II e III apresentaram valores menores ($P < 0,05$) quando comparados com o GI (PBS).

A elevação da uréia sanguínea está relacionada a mecanismos renais e extra-renais. Por ser originária do metabolismo hepático de proteínas, do catabolismo tecidual devido à febre, exercícios, inanição, uso de corticóides, assim como o aumento na ingestão de proteínas podem levar ao aumento de sua produção. A desidratação e a diminuição da função cardíaca, por sua vez, diminuem a sua excreção renal. A uréia é livremente filtrada pelos glomérulos renais, tendo a mesma concentração plasmática no filtrado glomerular e é passivamente reabsorvida pelos túbulos renais (Finco, 1997). Por esse motivo, a uréia não é por si só, um bom meio de avaliação da função renal.

A creatinina é oriunda da degradação de creatina, que por sua vez é produzida no fígado, a partir do aminoácido metionina e de acetato de guanidina. Liberada no plasma, a creatina é estocada nos músculos esqueléticos, onde constitui reserva de energia na forma de fosfocreatina. A degradação espontânea de creatina nos músculos com liberação de creatinina no sangue é um processo contínuo. A concentração de creatinina no sangue depende pouco da ingestão de carne, mas pode ser aumentado em função da massa muscular do animal, de lesões musculares e do esforço físico. Assim como a uréia, a creatinina é livremente

filtrada pelos glomérulos renais, sendo a sua concentração no filtrado a mesma do plasma, porém, não é reabsorvida pelos túbulos renais. Portanto, doenças renais que diminuam a função renal glomerular são identificadas por aumentos de creatinina, e posteriormente de uréia (Finco, 1997).

Em relação à creatinina, 8h após a inoculação dos venenos escorpiônicos, observou-se que o GIII apresentou valores médios superiores ($P < 0,05$) quando comparados com os valores de GI e GII. Ressalta-se que, os valores de creatinina se encontram dentro da normalidade para camundongos (0,5mg/dl) (Tab. 26).

Tabela 26– Valores médios de uréia (mg/dl) e creatinina (mg/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tempo	Uréia (mg/dl)			Creatinina (mg/dl)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	60,17 ^{Ab}	67,67 ^{Aa}	64,5 ^{Aa}	0,30 ^{Ab}	0,47 ^{Aa}	0,37 ^{Aa}
T8h	59,00 ^{Ab}	42,33 ^{Bb}	48,83 ^{ABb}	0,23 ^{Bb}	0,38 ^{Abab}	0,50 ^{Aa}
T24h	73,83 ^{Aa}	65,17 ^{Aa}	61,00 ^{Aab}	0,53 ^{Aa}	0,18 ^{Ab}	0,47 ^{Aa}

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

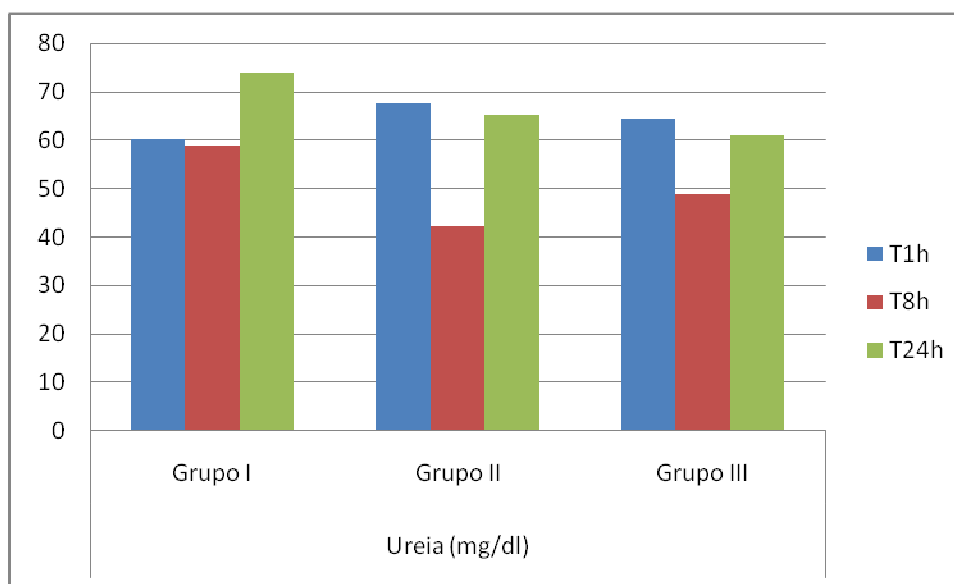


Gráfico 15- Valores médios de uréia (mg/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

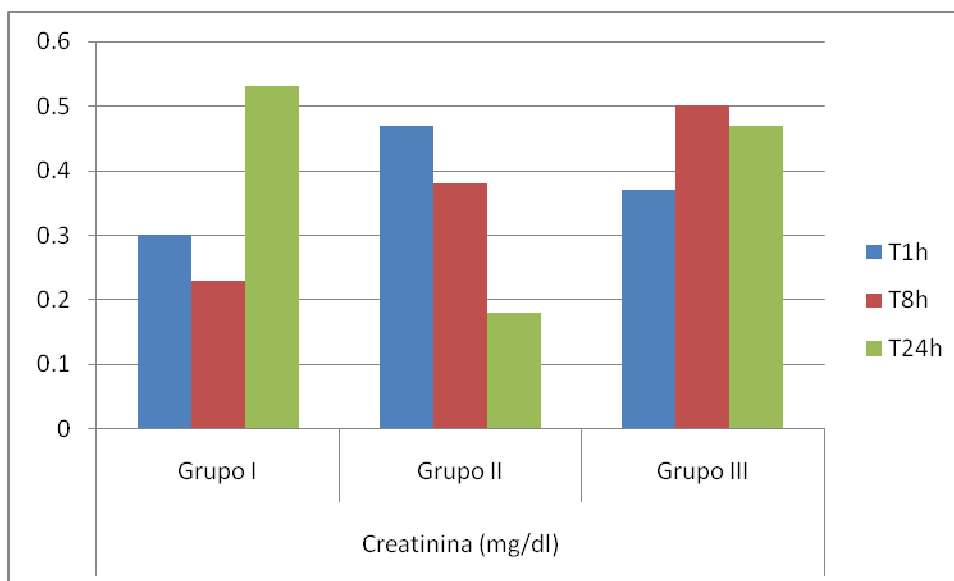


Gráfico 16- Valores médios de e creatinina (mg/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Estudos em ratos mostraram que o veneno de escorpiões distribui-se rapidamente do sangue para os tecidos e os rins são os órgãos que apresentam mais altas concentrações de toxinas cerca de 15 min após a inoculação (Ismail e Abd-Elsalam, 1988; Santana et al., 1996; Nunan et al., 2003, 2004). Esses achados são condizentes com resultados de experimentos e relatos clínicos de pacientes que apresentaram insuficiência renal aguda, aumento de uréia e ácido úrico, diminuição do volume urinário e diminuição da excreção de creatinina após envenenamentos envolvendo escorpiões dos gêneros *Androctonus*, *Leiurus*, e *Buthus* (Ismail e Abd-Elsalam, 1988). Quanto ao veneno de *T. serrulatus*, há relato, em ratos, de congestão e hemorragia renais (Corrêa et al., 1997) e aumento da pressão de perfusão, diminuição da taxa de filtração glomerular e do fluxo urinário,

deposição de proteína nos túbulos renais e edema renal por aumento de pressão hidrostática (Alves et al., 2005). A regularidade na excreção de uréia e creatinina dos camundongos deste trabalho evidenciada por suas concentrações séricas normais, indicaram que, os venenos de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus* não alteraram a função renal até 24h após.

Na tabela 27 e gráfico 17 estão expressos os valores séricos de amilase, onde se pode observar que não houve alteração nos diferentes tempos dos grupos estudados, resultados semelhantes aos de Ribeiro (2008), que estudou o efeito do veneno de *T. serrulatus* em cães.

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

formar maltose e glicose. É uma enzima altamente dependente de cálcio e que apresenta meia-vida muito alta, razão pela qual a margem de referência para suas concentrações plasmáticas é muito ampla. Sua secreção geralmente é aumentada na inflamação do pâncreas, que pode ser causada por fatores mecânicos, como obstrução de canalículos, doenças infecciosas, isquemia, deficiências nutricionais, intoxicação pelo zinco e na hipercalcemia (Brobst, 1997; Kramer e Hoffmann, 1997). No escorpionismo, a ocorrência de pancreatite é relatada sem, contudo, ser elucidado o seu mecanismo. Há indícios de ação direta das neurotoxinas sobre as células pancreáticas, da mesma forma que atuam sobre os neurônios, mas suspeita-se também do efeito neurogênico causado pela hiperestimulação colinérgica do sistema parassimpático (Sankaran et al., 1983; Possani et al., 1992; Bucarechi et al., 1995; Fletcher

et al., 1996; Cupo et al., 2003; Melo et al., 2004). Fukuhara et al. (2003, 2004) relacionaram níveis de cininas (bradicinina e caliceína), a produção de citocinas, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α e a estimulação hepática de proteínas de fase aguda, como consequências do envenenamento escorpiônico em paciente humanos. Está é uma informação relevante, pois o fluxo sanguíneo pancreático pode ser diminuído por histamina, prostaglandinas, fator ativador plaquetário, radicais livres e cininas, sendo a isquemia é uma das causas de pancreatite (Brobst, 1997). Apesar de vários autores observarem uma hiperamilasemia nos acidentados escorpiônicos (El-Asmar, 1984; D'Suze et al., 2003), nos camundongos deste experimento, a regularidade das concentrações de amilase indicam que não houve estímulo pancreático para o aumento de sua secreção.

Tabela 27- Valores médios de amilase (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tempo	Amilase (U/l)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	1212,00 ^{Aa}	1034,17 ^{Aa}	1027,17 ^{Aa}
T8h	1023,83 ^{Aa}	1149,17 ^{Aa}	1088,33 ^{Aa}
T24h	1212,67 ^{Aa}	1230,50 ^{Aa}	875,83 ^{Ba}

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

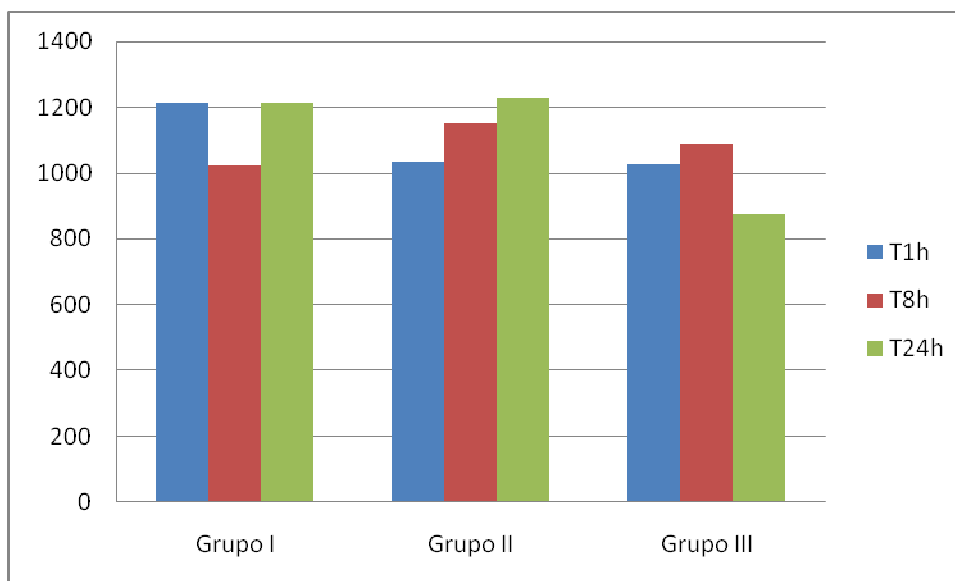


Gráfico 17- Valores médios de amilase (U/l) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Na tabela 28 e gráfico 18 estão os valores médios plasmáticos de glicose dos camundongos após inoculação dos

venenos de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus*.

Tabela 28- Valores médios de glicose (mg/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tempo	Glicose (mg/dl)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	126,50 ^{Ab}	173,67 ^{Aa}	145,33 ^{Aa}
T8h	190,83 ^{Aa}	190,33 ^{Aa}	123,00 ^{Ba}
T24h	165,33 ^{Aab}	146,83 ^{Aa}	115,67 ^{Aa}

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

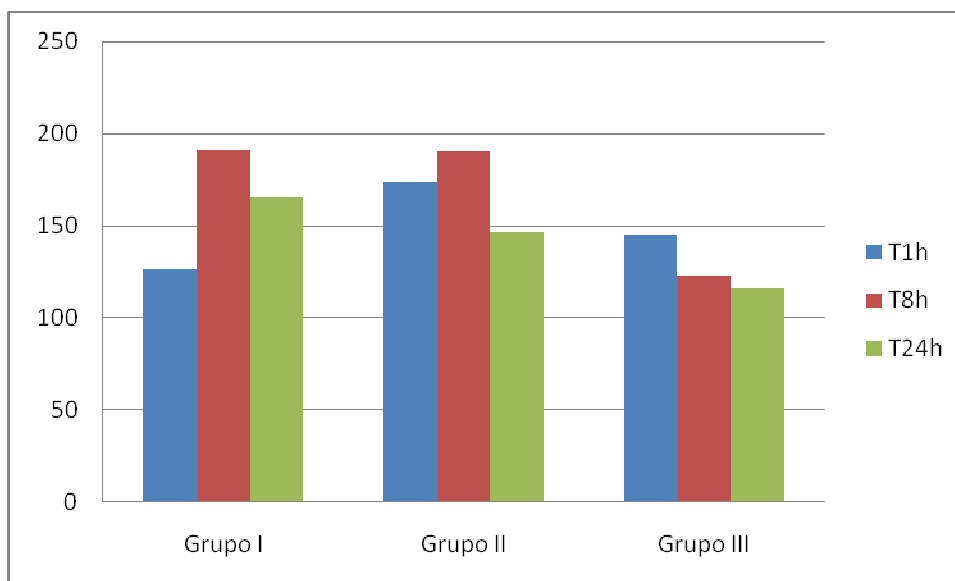


Gráfico 18- Valores médios de glicose (mg/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

O veneno de escorpião, além de ter uma ação central, tem também uma periférica, agindo como substância simpatomimética pós-ganglionar, semelhante à adrenalina, levando então a uma produção de hiperglicemia e hipertensão (Freire-Maia e Ferreira, 1960).

O efeito do veneno de escorpião no aumento dos níveis de glicose se dá pela liberação da secreção da insulina no pâncreas ou por uma lesão pancreática (D'Suze et al., 2003). Como observado anteriormente, não ocorreu uma lesão pancreática, justificando então a normalidade da concentração de glicose observada na tabela 27.

Estes resultados diferem de El-Asmar (1984), Ismail e Abd-Absalam (1988), Murthy e Hase 1994, Yugandhar et al. (1999), Bucharetschi et al. (1995) e Cupo e Hering (2002), que descreveram que a hiperglicemia é o efeito metabólico mais importante e relacionado a diversas espécies de escorpiões.

Na tabela 29 e gráfico 19 estão os valores médios do cortisol dos camundongos, após inoculação dos venenos de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus*.

Tabela 29- Valores médios de cortisol (ng/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Tempo	Cortisol (ng/dl)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
T1h	92,42 ^{Ab}	86,59 ^{Ab}	61,68 ^{Ba}
T8h	95,55 ^{Aab}	97,55 ^{Aa}	66,29 ^{Ba}
T24h	103,96 ^{Aa}	103,23 ^{Aa}	67,33 ^{Ba}

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

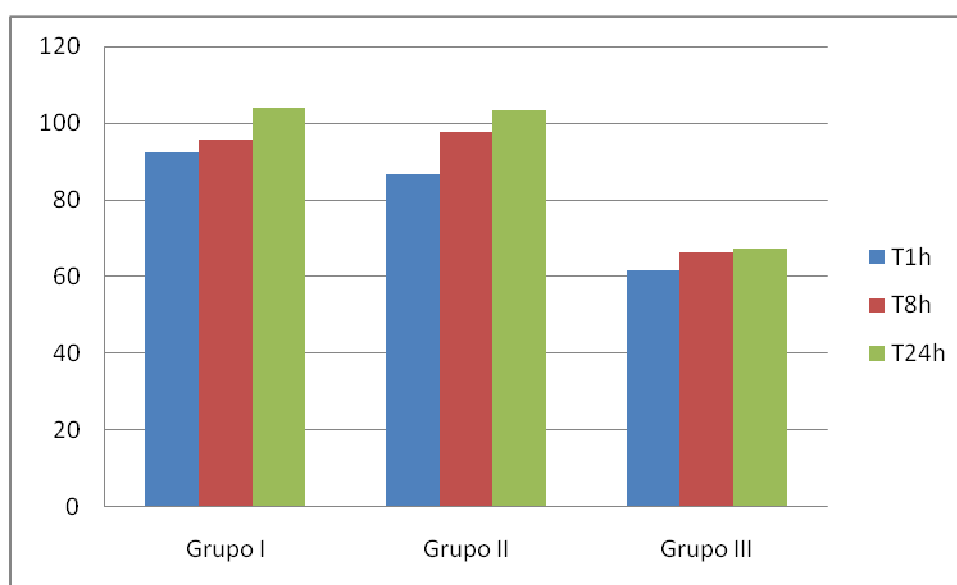


Gráfico 19 - Valores médios de cortisol (ng/dl) de camundongos inoculados com PBS (grupo I), veneno de *Tityus fasciolatus* (grupo II) e *Tityus serrulatus* (grupo III) em diferentes tempos.

Como observado na tabela 29, não houve alteração dos níveis de cortisol no grupo III após a inoculação do veneno de *T. serrulatus*. No GII, houve aumento significativo dos cortisol em T8h e T24h, e no GI (PBS) em T24h, quando comparado com T1h. Portanto, como os animais do GI (PBS) se comportaram de maneira semelhante ao GII, não pode ser atribuído o aumento do cortisol à ação do veneno de *T. fasciolatus*.

O metabolismo da glicose no organismo é influenciado pelo controle hormonal do cortisol, insulina e glucagon. O cortisol é um glicocorticóide, hormônio esteróide secretado pelas células das camadas fasciculada e reticular do córtex da glândula adrenal. O controle de sua secreção é feito por corticotrofina, um hormônio trófico produzido pela hipófise anterior, por meio de sistema de retroalimentação negativa em que altos níveis de glicocorticóides inibem a secreção do

hormônio hipotalâmico liberador da corticotrofina. Esse controle não mantém constantes os níveis de glicocorticóides, pois os padrões de sono e atividade sobrepõem-se ao sistema de retroalimentação negativa para que ocorra o ciclo circadiano, no qual as concentrações de glicocorticóides sejam diminuídas à noite e aumentem nas primeiras horas da manhã. Outro fator controlado pelo SNC e que eleva os níveis de glicocorticóides é o estresse. O cortisol é o mais potente dos glicocorticóides produzidos naturalmente. Sua principal ação é aumentar a glicemia por meio da indução de gliconeogênese (Cunningham, 2004).

O cortisol age sobre o fígado e induz a produção do glicogênio hepático e aumento de glicemia e a produção de enzimas que catalisam a conversão de aminoácidos em carboidratos. Nos músculos, inibe a síntese protéica, aumenta o catabolismo de proteínas para a liberação de aminoácidos e inibe a captação de glicose pelos tecidos muscular e adiposo. Tecido muscular e cérebro não sofrem os efeitos catabólicos dos glicocorticóides. (Rijnberk e Mol, 1997; Kaneko, 1997; Cunningham, 2004).

Apesar de todos os camundongos dos grupos II e III, inoculados com os venenos de *T. serrulatus* e *T. fasciolatus* apresentarem piloereção, comportamento nociceptivo descritos anteriormente, não houve alterações significativas dos níveis séricos do cortisol.

5.2. PARTE II – ESTUDO MOLECULAR

5.2.1. Caracterização Molecular

As toxinas presentes no veneno de escorpiões apresentam grande similaridade em suas sequências de aminoácidos, principalmente dentro de um mesmo gênero (Gomez, 1967; Possani et al., 1982; Sampaio et al., 1983; Martin-Eauclaire et al., 1985). Portanto, para se obter informações sobre a homologia das sequências gênicas que codificam as toxinas do veneno do *T. fasciolatus*, foram utilizados três pares de iniciadores, pré definidos, a partir das sequências de aminoácidos das toxinas do *T. serrulatus*: TsNTxP (Chávez-Olórtegui et al., 1996), TsTx (Coutinho Netto, 1975) e TsTx-I (Toledo e Neves, 1976).

Silvestre et al. (2005) citam que o problema no estudo dos artrópodes é a quantidade restrita de veneno durante a coleta, devendo, portanto, ser utilizada a glândula para a extração de veneno. Com a glândula do veneno pode-se usar de métodos em biologia molecular para isolamento de toxinas ou a produção de proteínas recombinantes reduzindo assim a utilização dos animais.

A genética molecular de toxinas foi introduzida com o objetivo de facilitar as etapas de purificação, identificação e caracterização necessárias ao estudo e utilização dos componentes presentes nos venenos em geral. Podem ser realizadas clonagem e caracterização de toxinas a partir de biblioteca de cDNA construída da glândula de veneno (Martin-Eauclaire et al., 1992; Guatimosin et al., 1999; Legros et al.,

1998) e clonagem e caracterização de toxinas a partir do estudo de DNA genômico (Becerril et al., 1993; Corona et al., 1996). As bibliotecas de cDNA construídas a partir do mRNA são também utilizadas para obtenção de uma grande variedade de proteínas expressadas (Silvestre, 2005; Borges et al., 2006; Zhijian et al., 2006). Entretanto essas técnicas necessitam de tempo e material específico para um resultado bom e satisfatório.

Foi realizado a RT-PCR e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, e posteriormente coradas com brometo de etídio. As bandas foram cortadas do gel com auxílio de um estilete, colocadas em um tubo de centrifuga de 1,5ml e purificadas. O resultado da purificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% posteriormente corado com brometo de etídio.

Os DNAs purificados foram inseridos no plasmídeo pCR2.1 TOPO. A ligação foi transformada em *E. coli* XL1 *Blue* quimicamente competente. Posteriormente, 30 clones foram escolhidos para purificação do plasmídeo, sendo 10 clones de cada par de iniciadores. Foi realizada uma PCR para confirmação da presença dos fragmentos de interesse no vetor de clonagem.

Os clones purificados e que continham os fragmentos de interesse foram sequenciados e as sequências obtidas foram analisadas (Fig. 14).

Utilizando os iniciadores oriundos de TsNTxP, observou-se uma grande semelhança entre a sequência obtida com a da única toxina isolada de *T. fasciolatus* neurotoxina 4 (Tf4) (Wagner et al., 2003), apresentando apenas um aminoácido diferente (sublinhado), que pode ser resultado de algum problema no sequenciamento ou uma real modificação (Fig. 14). Os clones obtidos a partir dos iniciadores da TsTx apresentam grande semelhança com a alfa-toxina Ts IV de *T. serrulatus*. Resultado semelhante foi obtido utilizando os iniciadores oriundos de TsTx-1, que apresenta semelhança com a beta neurotoxina TsVII de *T. serrulatus*. Portanto, a metodologia usada foi adequada para se obter novas sequências de aminoácidos de toxinas de *T. fasciolatus*.

Com isso foi obtida a sequência de nucleotídeos das novas toxinas de *T. fasciolatus*, embora o N-terminal e o C-terminal ainda estavam iguais aos da sequência de *T. serrulatus*, devido aos iniciadores utilizados. Assim, foi necessário desenhar novos iniciadores, com o objetivo de se obter o N-terminal e C-terminal das novas sequências.

A

CAT ATG CAG TTC ATT TGT AAA GGA ATT TCA GTG ATG ATA AAT TTA TTT TTT GCC ACA TTT ATT CGT
 AGC ACT GTC CCA AAC TGA CGC TGA ATC TGG AAG CCC GTA GCA GTA ACA CGC CGG CCA CGC GCA ATA
 GCC CGA TGA TGC CTT TTT CAG TTT GCA TTC TTT ATC GCA GTA TCC CAC ACC TGT AAA AAA ACA AGT
 AAC TTT GCA ACC TTT GGA ATC CGC TGG ATA ACC TTC TTT GCC TCC TAC GAC AAT GTC GAT CAG CAA
 TAA GCC ATA TG

gi|24638215|sp|P83435|SCX4_TITFA Neurotoxin 4 (Tf4)

Length=62 Score = 143 bits (361), Expect = 2e-33 Identities = 61/62 (98%), Positives = 61/62 (98%), Gaps = 0/62 (0%)

Frame = -3

Query 234 GKEGYPADSKGCKVTCFFFTGVGYCD ECKLKKASSGYCAWPACYCYGLPDSASVWDSATN 55
 GKEGYPADSKGCKVTCFFFTGVGYCD ECKLKKASSGYCAWPACYCYGLPDSASVWDSATN
 Sbjct 1 GKEGYPADSKGCKVTCFFFTGVGYCD ECKLKKASSGYCAWPACYCYGLPDSASVWDSATN 60
 Query 54 KC 49
 KC
 Sbjct 61 KC 62

B

CAT ATG GCT TAT TGA CCG CGG GCA CGG AGG GCA AGA AAG ACG GAT ATC CGG TGG AAG GCG ACA ACT
 GCG CCT TCG TTT GCT TCG GCT ACG ACA ACG CTT ACT GCG ATA AGC TGT GCA AGG ACA AGA AAG CCG
 ACA GCG GGT ATT GTT ACT GGG TTC ACA TCC TCT GCT ACT GCT ACG GGC TTC CCG ACA AGG AGC CGA
 CCA AGA CCA ACG GAA GAT GCA AAC CGG GTA AGA AGT AAA CCA GCC TCC CAT ATG

gi|546246|gb|AAB30413.1| Ts IV alpha-toxin precursor [Tityus serrulatus]

gi|1173395|sp|P45659|SCX4_TITSE Alpha-toxins precursor [Contains: Toxin-5 (Toxin V) (Tityustoxin

V) (Ts V) (TsV); Toxin-4 (Toxin IV) (Tityustoxin IV) (TsIV) (TsIv); Toxin-3 (Toxin III) (Tityustoxin III) (Ts III) (TsIII)]

Length=80 Score = 160 bits (405), Expect = 2e-38 Identities = 67/75 (89%), Positives = 71/75 (94%), Gaps = 0/75 (0%)

Frame = +3

Query 3 LLTAGTEGKKGYPVEGDNCAFCVCFGYDNAYCDKLCCKDKKADSGYCYVWHILCYCYGLPD 182
 LLTAGTEGKKGYPVE DNCA++C+ YDNAYCDKLCCKDKKADSGYCYVWHILCYCYGLPD
 Sbjct 6 LLTAGTEGKKGYPVEYDNCAIYCWNAYCDKLCCKDKKADSGYCYVWHILCYCYGLPD 65
 Query 183 KEPTKTNGRCKPGKK 227
 EPTKTNG+CK GKK
 Sbjct 66 SEPTKTNGKCKSGKK 80

C

CAT ATG GCT GAT CGG CAT TGT CGT AGA ATG TAA AGA AGG TTA CCT CAT GGA TCA CGA AGG TTG CAA
 ACT TAG TTG CTT TAT CAG ACC ATC GGG ATA CTG CGG CAG AGA ATG CGC AAT TAA AAA GGG CTC ATC
 GGG CTA TTG CGC CTG GCC AGC GTG TTA CTG CTA CGG GCT TCC AAA TTG GGT GAA AGT TTG GGA GAG
 AGC AAC GAA CAG ATG TGG CAA AAA ATA AAT TTG TTT CGC CAT ATG

gi|312022|emb|CAA46982.1| Ts VII; beta-neurotoxin precursor [Tityus serrulatus]

gi|453106|gb|AAB29128.1| toxin gamma; toxin VII [Tityus serrulatus]

gi|401073|sp|P15226|SCX7_TITSE Toxin VII precursor (TsTX-VII) (Tityustoxin VII) (Ts VII) (Toxin

II-11) (Toxin III-10) (Ts1) (Toxin gamma) (Toxin T2-IV) Length=84 Score = 164 bits (416), Expect = 9e-40 Identities = 69/72 (95%), Positives = 71/72 (98%), Gaps = 0/72 (0%)

Frame = +2

Query 2 LIGIVVECKEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECAIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVK 181
 LIGIVVECKEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGREC IKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVK
 Sbjct 13 LIGIVVECKEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVK 72
 Query 182 VWERATNRCGKK 217
 VW+RATN+CGKK
 Sbjct 73 VVDRATNRCGKK 84

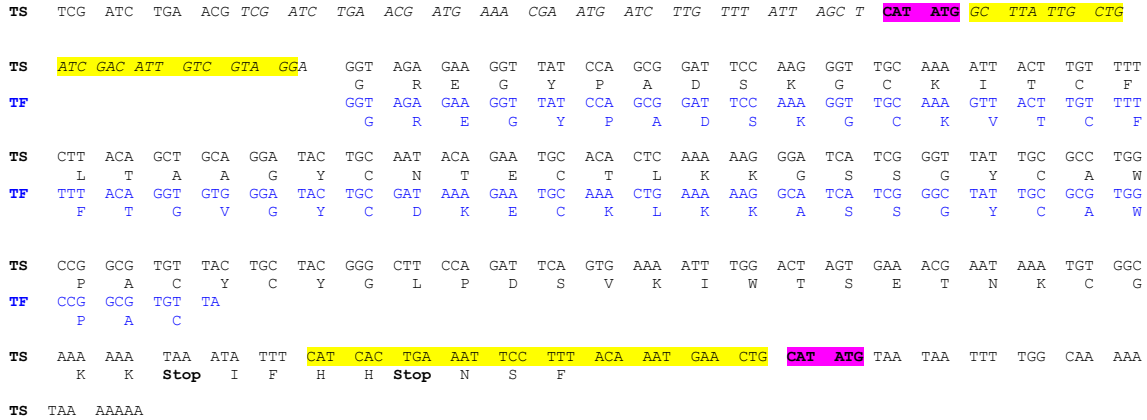
Figura 14 – Sequenciamento e análise das seqüências. Em A, B e C, seqüências obtidas no MegaBase semelhante a TsNTxP, TsIV e TsVII com resultado da análise no Blastx.

Para desenhar os novos iniciadores, utilizou-se a seqüência de nucleotídeos

do mRNA das toxinas de *T. serrulatus* (já descritos), que contém outras

sequências (peptídeo sinal, regiões não-traduzidas e aquelas que sofrem modificações pós-traducionais), além daquela que é traduzida como a proteína completa. Deste modo, os novos

iniciadores contêm a sequência imediatamente anterior e posterior à sequência da proteína completa de *Tityus fasciolatus* (Fig. 15, 16 e 17).



B

F 5' CATATGGCTTATTGCTGATCGACATTGTCGTAGG 3'

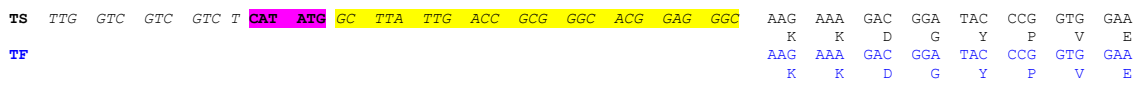
R 5' CAT CAC TGA AAT TCC TTT ACA AAT GAA CTG 3'
3' GTA GTG ACT TTA AGG AAA TGT TTA CTT GAC 5'

5' CATATGCAGTTCATTTGTAAAGGAATTCAGTGATG 3'

C

1 tcgatctgaa cgatgaaacg aatgatcttg tttattagct gcttattgct gatcgacatt
61 gtcgtaggag gtagagaagg ttatccagcg gattccaagg gttgcaaaat tacttgtttt
121 cttacagctg caggatactg caatacagaa tgcacactca aaaagggatc atcgggttat
181 tgcgcctggc cggcgtgta ctgctacggg cttccagatt cagtgaaaat ttggactagt
241 gaaacgaata aatgtggcaa aaaataaata tttcatcact gaaattcctt tacaaatgaa
301 ctgtaataat tttggcaaaa ataaaaaaa

Figura 15: Alinhamento da sequência de nucleotídeos de toxinas de *Tityus serrulatus* e *Tityus fasciolatus* para obtenção de novos iniciadores. Em preto, a sequência de DNA correspondente ao mRNA da toxina TsNTxP de *Tityus serrulatus*([AF039599](#)) (Chávez-Olórtegui et al., 1997) e em azul a sequência de nucleotídeos de *Tityus fasciolatus*. Em amarelo, a sequência escolhida para desenho dos iniciadores. Em lilás o sítio de restrição da enzima (NdeI). **B:** Desenho dos iniciadores. **C:** Sequência de nucleotídeos de mRNA da toxina TsNTxP de *Tityus serrulatus*. **TS:** *Tityus serrulatus* e **TF:** *Tityus fasciolatus*.



TS	TAC	GAT	AAC	TGC	GCC	TAC	ATT	TGC	TGG	AAC	TAC	GAC	AAC	GCT	TAC	TGC	GAT	AAG	CTG	TGC	AAA	GAC	AAG
	Y	D	N	C	A	Y	I	C	W	N	Y	D	N	A	Y	C	D	K	L	C	K	D	K
TF	GGC	GAC	AAC	TTG	CGC	CTT	CGT	TTG	CTT	CGG	CTA	CGA	CAA	CGC	TTA	CTG	CGA	CTA	AGC	TGT	GCA	AGG	ACA
	G	D	N	L	R	L	R	L	L	R	L	R	Q	R	L	L	R	L	S	C	A	R	T

TS	AAA	GCC	GAT	AGC	GGA	TAT	TGT	TAC	TGG	GTT	CAC	ATC	CTG	TGC	TAC	TGC	TAC	GGG	CTT	CCC	GAT	AGC	GAA
	K	A	D	S	G	Y	C	Y	W	V	H	I	L	C	Y	C	Y	G	L	P	D	S	E
TF	AGA	AAG	CCG	ACA	GCG	GGT	ATT	TGT	TAC	TGG	GTT	CAC	ATC	CTC	TGC	TAC	TGC	TAC	GGG	CTT	CCC	GAC	AAG
	R	K	P	T	A	G	I	C	Y	W	V	H	I	L	C	Y	C	Y	G	L	P	D	K

TS	CCG	ACC	AAG	ACC	AAC	GGA	AAA	TGC	AAA	TCC	GGT	AAG	AAG	TAA	ACC	AGC	CTC	C	CAT	ATG	TA	TTG	ATC	CCA
	P	T	K	T	N	G	K	C	K	S	G	K	K	Stop	T									
TF	GAN	GCC	GAC	CAA	GGA	CCA	ACG	GAA	AAG	TGC	AAA	TCC	GTC	GAC	AAG									
	X	A	D	Q	G	P	T	E	K	C	K	S	V	D	K									

TS	GAT	CCG	CCC	TGG	CGA	TAA	ATG	TTT	CTG	AAA	ACC	ATT	CCC	GAA	ATA	AAA	CTC	ATG	CCT	GCA	AAA	AAA	AAA
-----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

TS	AAA	AAA
-----------	-----	-----

B

F 5' CATATGGCTTATTGACCGGGCACGGAGGGC 3'

R 5' GGT AAG AAG TAA ACC AGC CTC C 3'
 3' CCA TTC TTC ATT TGG TCG GAG G 5'

5' CATATGGGAGGCTGGTTTACTTCTTACC 3'

C

```

1 ttggtcgtcg tctgcttatt gaccgcgggc acggagggca agaaagacgg atacccggtg
61 gaatacgata actgcgccta catttgctgg aactacgaca acgcttactg cgataagctg
121 tgcaaaagaca agaaagccga tagcggatat tgttactggg ttcacatcct gtgctactgc
181 tacgggcttc ccgatagcga accgaccaag accaacggaa aatgcaaatc cggtagaag
241 taaaccagcc tcctattgat cccagatccg ccctggcgat aaatgtttct gaaaaccatt
301 cccgaaataa aactcatgcc tgcaaaaaaa aaaaaaaa

```

Figura 16: Alinhamento da sequência de nucleotídeos de toxinas de *Tityus serrulatus* e *Tityus fasciolatus* para obtenção de novos iniciadores. Em preto, a sequência de DNA correspondente ao mRNA da toxina TsIV de *Tityus serrulatus* (S69808) (Martin-Eauclaire et al., 1994) e em azul a sequência de nucleotídeos de *Tityus fasciolatus*. Em amarelo a sequência escolhida para desenho dos iniciadores. Em lilás, o sítio de restrição da enzima (NdeI). TS: *Tityus serrulatus* e TF: *Tityus fasciolatus*.

TS	C	GAA	GAA	CAA	TCG	ATC	TGA	ACG	ATG	AAA	GGA	ATG	ATC	TTG	TTT	ATT	AGC	TGC	TTA	TT	CAT	ATG	G	CTG	ATC
TS	GGC	ATT	GTC	GTA	GAA	TG	T	AAA	GAA	GGT	TAT	CTC	ATG	GAT	CAC	GAA	GGT	TGC	AAA	CTT	AGT	TGC	TTT	ATC	
	K	E	G	Y	L	M	D	H	E	G	C	K	L	S	C	F	I								
TF	AGT	ACG	GCC	GCA	GTG	TGC	TGG	AAT	TCG	CCC	TTA	GCT	TAC	ATT	TGT	TCG	TCG								

S T A A V C W N S P L A Y I C S S

TS	AGA	CCA	TCG	GGA	TAC	TGC	GGC	AGA	GAA	TGC	GGA	ATT	AAA	AAG	GGC	TCA	TCG	GGC	TAT	TGC	GCC	TGG	CCC	GCG	
	R	P	S	G	Y	C	G	R	E	C	G	I	K	K	G	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	
TF	CTC	TAT	CCC	AAA	CTT	TCA	CCC	AAT	TTG	GAA	GCC	CGT	AGC	AGT	AAC	ACG	CTG	G-C	CAG	GCG	CAA	TAG	CCC	GAT	
	L	Y	P	K	L	S	P	N	L	E	A	R	S	S	N	T	L	S	Q	A	Q	Y	P	D	
TS	TGT	TAC	TGC	TAC	GGG	CTT	CCA	AAT	TGG	GTG	AAA	GTT	TGG	GAT	AGA	GCG	ACG	AAC	AAA	TGT	GGC	AAA	AAA	TAA	
	C	Y	C	Y	G	L	P	N	W	V	K	V	W	D	R	A	T	N	K	C	G	K	K	stop	
TF	GAG	CCC	TTT	TTA	ATT	GCG	CAT	TCT	CTG	CCG	CAG	TAT	CCC	GAT	GGT	CTG	ATA	AAG	CAA	CT-	-AA	GTT	TGC	AAC	
	E	P	F	L	I	A	H	S	L	P	Q	Y	P	D	G	L	I	K	Q	V	Stop	V	C	N	
TS	ATT	TGT	TTC	GC	CAT	ATG	T	GAA	AAT	CCT	TTA	CAA	ATG	AAC	TGT	AAT	AAG	TTT	GGC	AAA	AAT	AAA	AAA	ATG	TTC
TF	CTT	CGT	GAT	CAC	TGA	GAT	AAC	CTT	CTT	TAA	GCT	TAA	L	R	D	H	stop	D	N	L	L	stop	A	stop	

B

F 5' CATATGGCTGATCGGCATTGTCGTAGAATG 3'

R 5' GGC AAA AAA TAA ATT TGT TTC GC 3'
 3' CCG TTT TTT ATT TAA ACA AAG CG 5'

5' CATATGGCGAAACAAATTTATTTTTTGCC 3'

C

```

1 cgaagaacaa tcgatctgaa cgatgaaagg aatgatcttg tttattagct gcttattgct
61 gatcggcatt gtcgtagaat gtaaagaagg ttatctcatg gatcacgaag gttgcaaact
121 tagttgcttt atcagacat cgggatactg cggcagagaa tgcggaatta aaaagggctc
181 atcgggctat tgcgcctggc ccgcgtgtta ctgctacggg cttccaaatt gggatgaaagt
241 ttgggataga gcgacgaaca aatgtggcaa aaaataaatt tgtttcgctg aaaatccttt
301 acaaatgaac tgtaataagt ttggcaaaaa taaaaaatg ttc
  
```

Figura 17: Alinhamento da sequência de nucleotídeos de toxinas de *Tityus serrulatus* e *Tityus fasciolatus* para obtenção de novos iniciadores. Em preto a sequência de DNA correspondente ao mRNA da toxina TsVII de *Tityus serrulatus* (S69808) (Martín-Eauclaire et al., 1992) e em azul a sequência de nucleotídeos de *Tityus fasciolatus*. Em amarelo a sequência escolhida para desenho dos iniciadores. Em lilás, o sítio de restrição da enzima (NdeI). B: Desenho dos iniciadores. C: Sequência de nucleotídeos de mRNA da toxina TsVII de *Tityus serrulatus*. TS: *Tityus serrulatus* e TF: *Tityus fasciolatus*.

Com os novos iniciadores prontos foi realizado novamente todo o procedimento anterior a partir da extração e purificação do RNA da glândula de veneno. Foi utilizada a mesma metodologia anterior descrita no material e métodos desta tese.

As sequências de DNA foram chamadas de: Tf1, sequência homóloga a TsVII; Tf3, sequência homóloga a TsIV e Tf4a, a sequência homóloga a TsNTxP e Tf4 purificada por Wagner et al. (2003).

Após a realização do RT-PCR, purificação do DNA a partir do gel de agarose, ligação do produto purificado no vetor de clonagem e transformação química, os plasmídeos foram purificados e o DNA analisados em gel de agarose 1% para quantificação.

Os clones purificados foram sequenciados e as sequências das toxinas obtidas foram analisadas (Fig. 18).

A
 gi|24638215|sp|P83435|SCX4_TITFA Neurotoxin 4 (Tf4)

Length=62 Score = 143 bits (361), Expect = 2e-33 Identities = 61/62 (98%), Positives = 61/62 (98%), Gaps = 0/62 (0%)

Frame = -3

```
Query 234 GKEGYPADSKGCKVTCFFFTGVGYCDKECKLKKASSGYCAWPACYCYGLPDSASVWDSATN 55
          GKEGYPADSKGCKVTCFFFTGVGYCD ECKLKKASSGYCAWPACYCYGLPDSASVWDSATN
Sbjct 1 GKEGYPADSKGCKVTCFFFTGVGYCDTECKLKKASSGYCAWPACYCYGLPDSASVWDSATN 60
```

```
Query 54 KC 49
```

```
KC
```

```
Sbjct 61 KC 62
```

B

[gi|546246|gb|AAB30413.1](#) Ts IV alpha-toxin precursor [Tityus serrulatus]

[gi|1173395|sp|P45659|SCX4_TITSE](#) Alpha-toxins precursor [Contains: Toxin-5 (Toxin V) (Tityustoxin V) (Ts V) (TsV); Toxin-4 (Toxin IV) (Tityustoxin IV) (TsIV) (TsIV); Toxin-3 (Toxin III) (Tityustoxin III) (Ts III) (TsIII)]

Length=80 Score = 160 bits (405), Expect = 2e-38 Identities = 67/75 (89%), Positives = 71/75 (94%), Gaps = 0/75 (0%)

Frame = +3

```
Query 3 LLTAGTEGKKGYPVEGDNCAFVCFGYDNAYCDKLCCKKADSGYCYWVHILCYCYGLPD 182
          LLTAGTEGKKGYPVE DNCA++C+ YDNAYCDKLCCKKADSGYCYWVHILCYCYGLPD
Sbjct 6 LLTAGTEGKKGYPVEYDNCAYICWNYDNAYCDKLCCKKADSGYCYWVHILCYCYGLPD 65
```

```
Query 183 KEPTKTNGRCKPGKK 227
```

```
EPTKTNG+CK GKK
```

```
Sbjct 66 SEPTKTNGKCKSGKK 80
```

C

[gi|312022|emb|CAA46982.1](#) Ts VII; beta-neurotoxin precursor [Tityus serrulatus]

[gi|453106|gb|AAB29128.1](#) toxin gamma; toxin VII [Tityus serrulatus]

[gi|401073|sp|P15226|SCX7_TITSE](#) Toxin VII precursor (TsTX-VII) (Tityustoxin VII) (Ts VII) (Toxin II-11) (Toxin III-10) (Ts1) (Toxin gamma) (Toxin T2-IV)

Length=84 Score = 164 bits (416), Expect = 9e-40 Identities = 69/72 (95%), Positives = 71/72 (98%), Gaps = 0/72 (0%)

Frame = +2

```
Query 2 LIGIVVECKEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECAIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVK 181
          LIGIVVECKEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGREC IKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVK
Sbjct 13 LIGIVVECKEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVK 72
```

```
Query 182 VWERATNRCGKK 217
```

```
VW+RATN+CGKK
```

```
Sbjct 73 VVDRATNRCGKK 84
```

Figura 18- Resultado do segundo sequenciamento. Em A, sequência de aminoácidos obtida no MegaBase semelhante a TsNTxP com resultado da análise no Blastx. Em B sequências de aminoácidos obtidas no MegaBase semelhante a TsVII com resultado da análise no Blastx e em C sequências de aminoácidos obtidas no MegaBase semelhante a TsVII com resultado da análise no Blastx.

Posteriormente as seqüências foram alinhadas com o uso do programa DNA-star e analisadas (Fig. 19, 20 e 21).

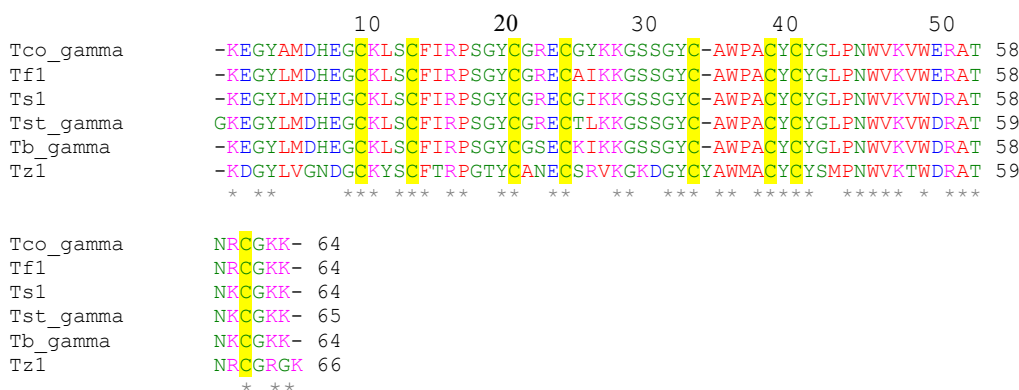


Figura 19- Alinhamento da seqüência de aminoácidos da toxina de *Tityus fasciolatus* (Tf1) com outras toxinas do tipo beta de escorpiões do gênero *Tityus*. Aminoácidos básicos estão em rosa, aminoácidos ácidos estão em azul, aminoácidos pequenos, hidrofóbicos e aromáticos estão em vermelho e os aminoácidos amino e hidroxil estão em verde. Espécies e o código de acesso das toxinas são: Tco_gamma (*Tityus costatus*-Q5G8B8), Ts1 (*Tityus serrulatus*-P15226), Tst_gamma (*Tityus stigmurus*-P56612), Tb_gamma (*Tityus bahiensis*-P56611) e Tz1 (*Tityus zulianus*-Q2NME3). Sequências obtidas de Swiss-Prot Database. As cisteínas estão indicadas em amarelo. Os aminoácidos homólogos em todas as seqüências estão indicados por (*).

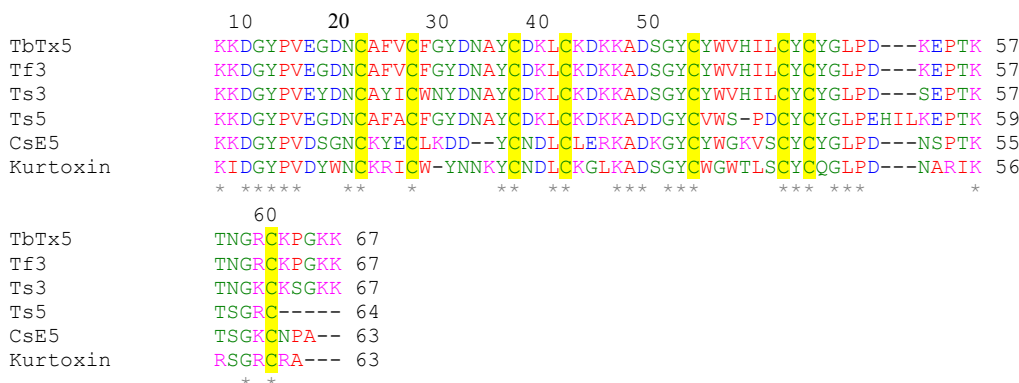


Figura 20- Alinhamento da seqüência de aminoácidos da toxina de *Tityus fasciolatus* (Tf3) com outras toxinas de escorpiões. Aminoácidos básicos estão em rosa, aminoácidos ácidos estão em azul, aminoácidos pequenos, hidrofóbicos e aromáticos estão em vermelho e os aminoácidos amino e hidroxil estão em verde. Nome das toxinas e o código de acesso são: TbTx5 (*Tityus bahiensis*-POC5K8), Ts3 (*Tityus serrulatus*- P01496), Ts5 (*Tityus serrulatus*- P46115), CsE5 (*Centruroides sculpturatus*- P46066), Kurtoxin (*Parabuthus transvalicus*- P58910). Sequências obtidas de Swiss-Prot Database. As cisteínas estão indicadas em amarelo. Os aminoácidos homólogos em todas as seqüências estão indicados por (*).

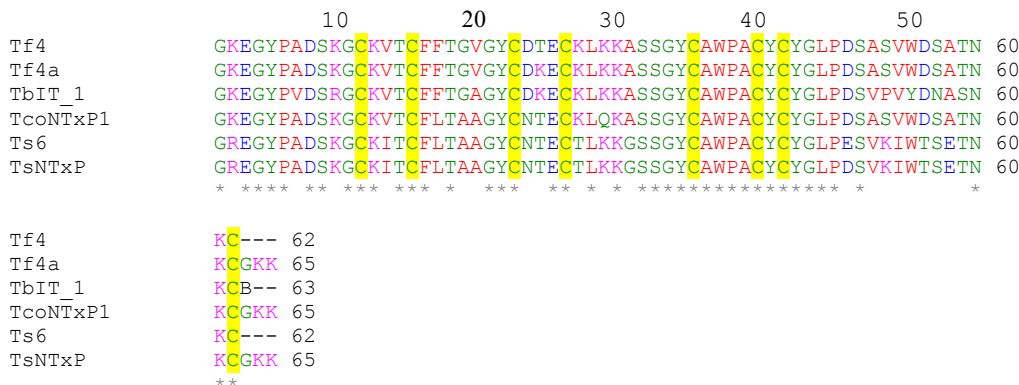


Figura 21- Alinhamento da sequência de aminoácidos da toxina de *Tityus fasciolatus* (Tf4a) com outras toxinas de escorpiões do gênero *Tityus*. Aminoácidos básicos estão em rosa, aminoácidos ácidos estão em azul, aminoácidos pequenos, hidrofóbicos e aromáticos estão em vermelho e os aminoácidos amino e hidroxil estão em verde. Nome das toxinas e o código de acesso são: Tf4 (*Tityus fasciolatus*- P83435), TbIT_1 (*Tityus bahiensis*- P60275), TcoNTxP1 (*Tityus costatus*- Q5G8A8), Ts6 (*Tityus serrulatus*- P45669), TsNTxP (*Tityus serrulatus*- 077463). Sequências obtidas de Swiss-Prot Database. As cisteínas estão indicadas em amarelo. Os aminoácidos homólogos em todas as sequências estão indicados por (*).

Com o intuito de se obter novas sequências de nucleotídeos de toxinas do veneno do escorpião *Tityus fasciolatus* e assim um estudo molecular do DNA que codifica as toxinas, foi utilizado nesse trabalho um estudo a partir da glândula de veneno e o cDNA foi sintetizado por meio de um RT-PCR utilizando iniciadores de *T. serrulatus*. As toxinas escolhidas foram a TsVII, a TsIV e a TsNTxP, todas elas são toxinas classificadas por agirem em canais de sódio, apesar de ainda não ter sido provado que a TsNTxP se ligue neste canal.

O veneno de escorpiões é uma mistura rica em peptídeos nocivos com baixo peso molecular, que afetam os canais iônicos alterando a permeabilidade das células excitáveis. São descritas quatro famílias de toxinas, com ação nos canais de sódio, potássio, cloro e cálcio (Possani, 1984; Vega e Possani, 2005). Devido à sua grande letalidade, as

toxinas que abrem e fecham os canais de sódio, também chamadas de α e β toxinas, foram primeiramente estudadas e hoje em dia são bem conhecidas (Pimenta et al., 2002).

Possani et al. (1992) descreveram que o veneno de *T. serrulatus* contém pelo menos três principais peptídeos; gamma, III-8 e IV-5. Outros autores chegaram à mesma conclusão (Sampaio et al., 1983, 1991), entretanto, Bechis et al. (1984) e Martin-Eaucaire et al. (1992) estudando as mesmas toxinas, observaram diferenças nas sequências das mesmas e as nomearam como toxina VII (gamma), toxina IV (toxina IV-5) e toxina II (toxina III-8). Alguns autores sugerem que a toxina IV-5 seja a tityustoxina (Martin-Euclaire et al., 1994), entretanto outros sugerem que a toxina IV-5 seja uma componente da tityustoxina (Possani et al., 1981; Sampaio et al., 1983). Toxina gamma ou VII é uma β -toxina e a toxina IV ou

IV-5 é uma α -toxina (Becerril et al., 1997).

Chavez-Olórtegui et al. (1996) purificaram e sequenciaram um peptídeo nomeado de proteína não-tóxica (TsNTxP), que contém uma glicina adicional no C-terminal e um ácido aspartâmico no lugar do ácido glutâmico na posição 50.

As toxinas TsNTxP, toxina IV-5 e a toxina VII têm grande importância nos estudos científicos tanto para produção de soro como importância médica, elas apresentam similaridade funcional pela modificação da permeabilidade dos canais de sódio das células excitáveis (Becerril et al., 1997).

Além da importância das três toxinas selecionadas, outro fator que influenciou nesta escolha, foi o fato de toxinas homólogas a estas toxinas de *T. serrulatus* já terem sido descritas em outros escorpiões do gênero *Tityus* (Batista et al., 2007). Homologia na sequência de toxinas de escorpião é comum dentro de um mesmo gênero, como já foi bem descrito para o gênero *Centruroides* (Gao et al., 2008).

Analisando as figuras 19, 20 e 21, pode-se confirmar esta homologia. A toxina Tf1 tem 60% de similaridade com outras toxinas do tipo beta de escorpiões do gênero *Tityus*, a Tf3 tem 42% similaridade com outras do tipo alfa de escorpiões do mesmo gênero e a Tf4a tem 63% de similaridade com as proteínas não-tóxicas.

Portanto, neste trabalho, descreveu-se uma nova metodologia útil para se obter sequência de nucleotídeos de toxinas

homólogas a outras já descritas pertencentes a escorpiões de um mesmo gênero.

No caso da Tf4a, ao verificar as diferenças no alinhamento (Fig. 20) observa-se apenas a diferença de um aminoácido (posição 26), onde há uma lisina (K) no lugar de treonina (T). Essa lisina também é verificada na sequência da toxina de *T. bahiensis* (TbIt-1), sugerindo-se que a Tf4a seja uma isoforma de Tf4.

Encontrar isoformas das principais toxinas de escorpião é um fato bastante comum. A análise de sequências das isoformas tem mostrado que muitas delas ocorrem por substituição, depleção e inserção ao nível de DNA genômico. Cerca de 20 anos atrás o grupo de Rochat'z encontrou variação de polimorfismo e quantitativa de toxinas do escorpião *Androctonus australis* (Zhijian et al., 2006).

Treze toxinas do escorpião *Centruroides exilicauda* foram obtidas da glândula de veneno. A sequência de 13 peptídeos deduzidas de cDNA são altamente homólogas umas com as outras e são possivelmente resultado de um polimorfismo (Valdez-Cruz et al., 2007).

A kurttoxina de *Parabuthus transvalicus* é uma toxina rara, pois age em canais de sódio e de cálcio e apresenta similaridade de sequência de aminoácidos com as toxinas que agem em canais de sódio do tipo alfa (Possani et al., 2000). A existência desta toxina demonstra que pode haver outras que agem em mais de um tipo de canal iônico. E sua semelhança com a Tf3

pode indicar que esta toxina também tem a mesma ação e novos experimentos devem ser realizados para comprovar esta hipótese.

A nova metodologia descrita neste trabalho também possibilita a obtenção da sequência genômica das toxinas homólogas obtidas. Uma vez conhecida a sequência de nucleotídeos das novas toxinas pode-se usá-la para a construção de sondas para serem utilizadas em bibliotecas genômicas. A sequência genômica é importante para melhorar o estudo molecular de um veneno, trazendo novas informações valiosas.

Martin-Eauclaire et al. (1992) descreveram que a sequência da toxina gama (toxina VII) é sintetizada por um precursor de 84 aminoácidos, peptídeo sinal de 20 aminoácidos e três carboxilas (COOH), as quais são removidas pós-tradução.

No final das sequências três aminoácidos (GKK) são removidos pós-tradução (Fig. 19, 20 e 21). Esse fato também foi observado por Possani et al. (2000) que estudaram mais de 202 sequências obtidas de 30 diferentes espécies de escorpiões, 27 da família Buthidae e três da família Scorpionidae.

Os genes que codificam as toxinas de *Tityus* são apresentados na forma de dois exons interrompidos por um intron. O intron interrompe a região que codifica o peptídeo sinal (Becerril et al., 1997).

Outro ponto que se pode são as posições conservadas dos resíduos de cisteínas observar (Figuras 19, 20 e 21). As oito cisteínas estão marcadas em amarelo e

são elas que definem a região da toxina que é estabilizada pelas pontes dissulfeto.

Todas as toxinas de escorpião têm uma estrutura semelhante, formada por uma α -hélice e três fitas β -folhas, que são mantidas por dois pares de pontes dissulfeto feitas entre duas sequências constantes de Cys-X-X-Cys na região α -hélice e Cys-X-Cys na região β -folha, onde X é um aminoácido variável (Couraud et al., 1982; Becerril et al., 1997). As outras duas pontes estabilizam o N- e o C-Terminal das toxinas.

A proximidade na árvore filogenética e as regiões de cisteínas que são encontradas nas toxinas de escorpiões sugerem que a variabilidade dos peptídeos dos venenos de escorpião envolva um ancestral comum (Possani et al., 2000). Zhijian et al., 2006 também sugerem que, todos os peptídeos do veneno de escorpião com funções divergentes podem estar envolvidos com um gene ancestral comum através de mecanismos como polimorfismo, duplicação gênica, transligação ou ligação alternativa.

A rica biodiversidade de peptídeos existente devido à função biológica que eles exercem. Alguns caminhos metabólicos e componentes não funcionais são eliminados por seleção natural. Alguns peptídeos de escorpião não apresentam função comprovada, podendo ser talvez devido a nossa falta de pesquisa e estudo, por ainda não saber qual a molécula alvo que eles foram selecionados (Possani et al., 2000). Da mesma forma muitas funções dos componentes do veneno de

escorpião têm sido estudadas. Portanto, muitos estudos ainda são necessários, nesse sentido.

5.3. PARTE III – ESTUDO IMUNOLÓGICO

5.3.1. SDS-PAGE e Western Blotting

Alguns testes imuno diagnósticos são utilizados para identificar e quantificar os antígenos tóxicos no sangue das vítimas picadas por animais peçonhentos (Lima et al., 1993). Esses testes também podem ser utilizados para o conhecimento dos componentes protéicos (Kalapothakis et al., 2001) do veneno, como foi utilizado neste experimento.

A toxicidade do veneno dos escorpiões da família Buthidae se deve às proteínas neurotóxicas de baixo peso molecular presentes em pouca quantidade no veneno total (Delori et al., 1981). Por isso, estas são as mais estudadas e mais bem caracterizadas.

A caracterização bioquímica do veneno de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus* teve início com o perfil obtido através de SDS-PAGE corado com Azul de Coomassie (Fig. 22). Para essa análise foram aplicadas 8µg de veneno de *T. fasciolatus* e 28µg do veneno de *T. serrulatus*. Pode-se observar a presença de várias bandas de proteínas com diferentes pesos moleculares no veneno de *T. serrulatus*. Para uma melhor interpretação, foi realizado outro SDS-PAGE com veneno bruto de *Tityus fasciolatus* com a mesma concentração de veneno que foi utilizada para o *Tityus serrulatus* onde se observa

também várias bandas de proteínas com diferentes pesos moleculares (Fig. 23).

O veneno de escorpiões é letal para vertebrados através da ação de toxinas de cadeia longas (6-8 kDa) e curta (3-4 kDa), que afetam principalmente os canais de sódio e potássio (Borges et al., 2008). Observou-se uma grande quantidade de proteínas abaixo de 15kDa em ambos os venenos, confirmando assim a presença das proteínas letais de baixo peso molecular.

Além das toxinas que agem em canais iônicos, existem outras proteínas de baixo peso molecular presentes no veneno de escorpiões. A classe das serino-proteases é a mais estudada, possuindo as enzimas melhor caracterizadas e as mais versáteis fisiologicamente. Essas enzimas têm a massa molecular relativamente pequena entre 12 a 15 kDa, e já foram encontradas em venenos de escorpiões (Schwartz et al., 2007). Gao et al. (2008) descreveram uma proteína tipo serino protease com 33kDa.

O veneno de *T. fasciolatus* mostrou bandas similares ao veneno de *T. serrulatus* na região das toxinas letais (abaixo de 6kDa). Os principais componentes desses se encontram nessa região. Esses resultados foram semelhantes aos resultados encontrados por Borges et al. (2008), que observaram que, os componentes principais do veneno de *T. zulianus*, *T. funestus*, *T. discrepans* e a toxina TsVIII de *T. serrulatus* também se encontram na mesma região.

Em ambos os venenos encontram-se bandas de aproximadamente 30-40kDa (Fig. 22 e 23). Nishikawa et al. (1994) relataram uma quantidade maior de proteína com peso molecular de 30kDa e demonstraram que as espécies mais tóxicas, *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus* e *T. costatus*, possuem componentes com reação antigênica cruzada.

As fosfolipases são enzimas compostas por duas subunidades, sendo que o heterodímero é ligado por pontes dissulfetos; são amplamente relatadas nos venenos de serpentes e apresentam um peso molecular de aproximadamente 30 kDa. Elas possuem ação citotóxica, neurotóxica, miotóxica, causam edema e distúrbios na coagulação sanguínea. Recentemente, pesquisadores encontraram fosfolipases no veneno de escorpiões; elas também são heterodímeros ligadas por pontes dissulfeto, mas parece que são um pouco menores (20 kDa) do que as encontradas nos venenos de serpentes (Conde et al., 1999; Valdez-Cruz et al., 2007; Schwartz et al., 2007, 2008).

Outra enzima também encontrada no veneno de escorpiões é a lisozima que possui um peso molecular de aproximadamente 30kDa (Batista et al., 2007).

Pode-se notar que ambos os perfis protéicos apresentaram duas bandas fortes de peso molecular de aproximadamente 40kDa e 80kDa. A hialuronidase é uma proteína já encontrada no veneno de escorpiões (Possani et al., 1992). Já foram relatadas hialuronidases de escorpiões com peso molecular entre 40-50kDa (Pessini et al., 2001; Morey et al., 2006; Batista et al., 2007) e com 80-100kDa (Possani et al., 1977; Ramanaiah et al., 1990). A hialuronidase pode contribuir para toxicidade do veneno e ajudar a distribuir as toxinas pelos tecidos.

Na figura 22, nota-se que o veneno de *T. serrulatus* apresenta fracas bandas de aproximadamente 25kDa. Zouari et al. (2007) relataram uma nova classe de proteínas de peso molecular de 25-28kDa, que foram chamadas de lipases digestivas de escorpião.

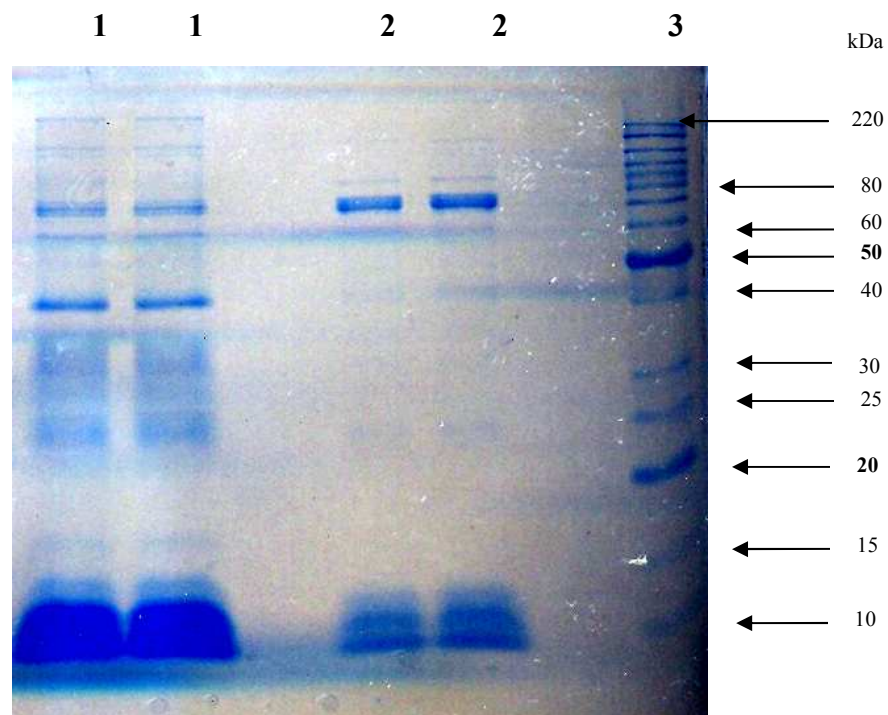


Figura 22- SDS-PAGE dos principais componentes do veneno de *Tityus fasciolatus* e *Tityus serrulatus*. 1= Veneno bruto de *Tityus serrulatus* (28µg de proteína) 2=Veneno bruto de *Tityus fasciolatus* (8µg) 3= Padrão de tamanho molecular Bench-Marck™ protein Ladder (10-220 kDa), Invitrogen.

Antes de se instituir um protocolo de terapia para o acidente escorpiônico deve-se pesquisar a composição, imunogenicidade e toxicidade do veneno (Nishikawa et al.; 1994).

Vários estudos de testes de soroneutralização com algumas espécies

de escorpiões do gênero de *Tityus* têm sido realizados (Borges et al., 2004, 2006, 2008). Esses estudos sugerem a existência de variadas regiões (espécie-específicas) dos epítopos neutralizantes das toxinas de do gênero *Tityus* da América do Sul que agem nos canais de sódio (Borges et al., 2008).

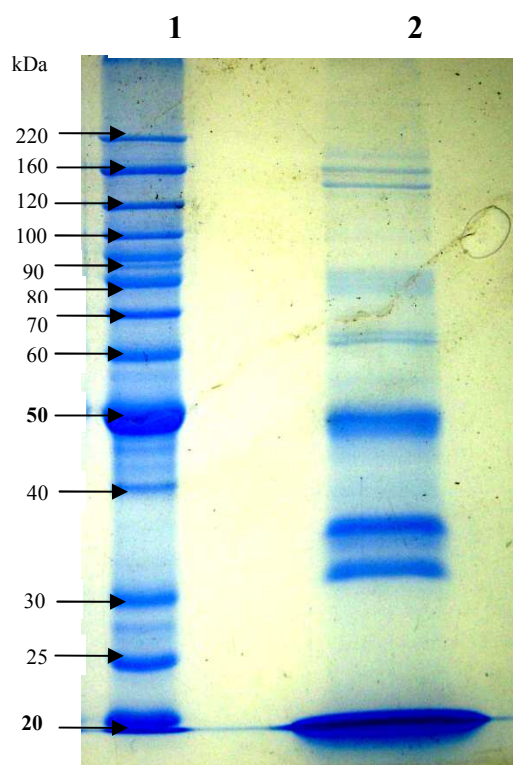


Figura 23- SDS-PAGE dos principais componentes do veneno de *Tityus fasciolatus*. Canaleta 1= Padrão de tamanho molecular Bench Marck Protein Ladder, Invitrogen, canaleta 2=Veneno bruto de *Tityus fasciolatus* (28µg)

Nesse estudo, a reatividade antigênica cruzada entre os venenos de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus* foi demonstrada no ensaio de Western Blotting, no qual o antiveneno de *T. serrulatus* reconheceu as toxinas de *T. fasciolatus* como apresentado na Fig. 24.

Também, foi vista uma forte reatividade cruzada com os componentes de tamanho molecular de aproximadamente 6kDa, em ambos os venenos.

Como apresentado na Fig. 24A, o soro anti-*T. fasciolatus* diluído 1:5000 reconheceu várias proteínas presente no veneno de *T. fasciolatus*. As proteínas se encontram nos tamanhos moleculares de 6,0; 25,9; 37,1; 64,2 e 115,5 kDa. O mesmo soro reconheceu mais proteínas

no veneno de *T. serrulatus*, proteínas essas com o peso de 6,0; 25,9; 37,1; 64,2; 115,5 e 181,8 kDa.

Na Fig. 24B, o soro anti-*T. serrulatus*, diluído 1:10000 reconheceu algumas proteínas no veneno de *T. fasciolatus*: proteínas com 6,0; 25,9; 37,1; 64,2 kDa. Entretanto, o mesmo soro reconheceu várias toxinas no veneno de *T. serrulatus*.

As únicas proteínas do veneno de *T. fasciolatus* no ensaio de Western blotting que também aparecem no SDS-PAGE são as toxinas que estão com aproximadamente 10 kDa e 80 kDa, mas isso pode ser devido a pouca quantidade de veneno aplicada no gel. Quando se analisa cuidadosamente o gel, pode-se verificar outras bandas bem fracas de aproximadamente 20, 30 e 50

kDa. Já no veneno de *T. serrulatus*, as proteínas com tamanho molecular de aproximadamente 10, 40, 60 e 70 aparecem também no SDS-PAGE.

Lima et al. (1993) demonstraram que há reação cruzada entre toxinas do mesmo escorpião. Nishikawa et al. (1994) observaram que a grande taxa de reação cruzada entre os antígenos presentes nos venenos de *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* se deve aos componentes elevada imunogenicidade, que estimulam alta produção de anticorpos,

mesmo quando inoculados em pequenas quantidades.

Borges et al. (2008) realizaram um estudo de comparação entre as propriedades antigênicas e funcionais e a composição eletroforética dos venenos de escorpiões do gênero *Tityus* da Venezuela e do Brasil (reação cruzada), onde observaram que todas as espécies estudadas apresentaram reação cruzada com anticorpos contra o veneno total de *T. serrulatus* em vários graus.

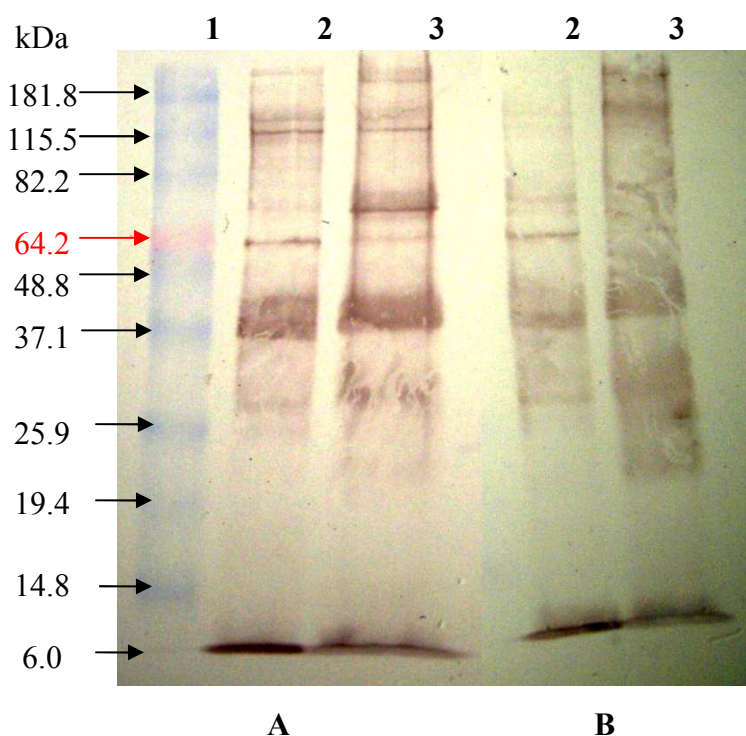


Figura 24- Identificação da antigenicidade por Western blotting entre os componentes presente no veneno de *Tityus fasciolatus* e *Tityus serrulatus*. 1= Padrão de peso molecular Bench Marck Prestain Protein Ladder-Invitrogen. 2= Veneno bruto de *Tityus fasciolatus*. 3= Veneno bruto de *Tityus serrulatus*. A= soro anti-*T. fasciolatus* 1:5000, B= contra soro anti-*T. serrulatus* 1:10000.

Vários pesquisadores têm realizado estudos fazendo comparação entre proteínas e suas sequências de aminoácidos e têm mostrado grande correlação entre o grau de diferentes sequências e o de diferença antigênica.

O número de sítios antigênicos entre as toxinas homólogas é importante, bem como suas sequências de aminoácidos o estabelecimento de uma possível correlação entre substituições e diminuição do número de sítios

antigênicos comuns. Assim se tem um melhor entendimento sobre a ligação dos sítios antigênicos no mecanismo de neutralização, qual a relação entre os sítios antigênicos e sítios farmacológicos das toxinas e qual a importância da seleção de peptídeos para síntese de vacinas. Estudos com anticorpos marcados em microscopia eletrônica permitiram visualizar que a ação de um ou mais sítios antigênicos provavelmente não interferem com a ligação da toxina no receptor (Ayeb e Delori, 1984).

As espécies pertencentes ao gênero *Tityus* são altamente diversas do ponto de vista de antigenicidade dos componentes do veneno. O mecanismo dessa diversidade antigênica entre as espécies do gênero *Tityus* ainda não está muito clara, mas isso não pode ser explicado apenas pela distância geográfica entre os habitats (Borges et al., 2008).

A relevância da diversidade taxonômica é influenciada pelas diferenças da atividade, composição e/ou antigenicidade entre as toxinas de espécies de importância medicamentosa (Borges et al., 2008). Entretanto há a necessidade de pesquisa dos venenos das espécies do gênero *Tityus* através de estudos sobre suas proteínas, componentes semelhantes e epitopos específicos para o estudo da similaridade entre eles e assim chegar há uma melhor terapia.

Nesse trabalho, foram produzidos anticorpos anti-*T. fasciolatus* e anti-*T. serrulatus* utilizando a ovelha para imunização. Mendes et al. (2004) estudaram diferentes modelos animais,

como camundongos, coelhos e ovelhas, para a produção de antivenenos contra o veneno total de *Tityus serrulatus*, comparando a habilidade da toxina TsNTxP e a TsNTxP recombinante na geração de anticorpos neutralizantes. Assim, revelou um padrão específico de reconhecimento do peptídeo pelos anticorpos gerados em cada animal, além de haver diferença entre os imunógenos de TsNTxP e a proteína recombinante, devido à diferença na conformação da estrutura secundária e terciária da proteína. Esses autores concluíram também que, a ovelha é o modelo animal mais eficaz para produção de anticorpos anti-*Tityus serrulatus*, e os anticorpos produzidos em cada modelo animal podem identificar alvos diferentes presentes nas toxinas do veneno total e/ou diferentes epitopos de uma toxina individual.

5.3.2. Soroneutralização *in vivo*

Com o intuito de observar a capacidade do soro antiescorpiônico (anti-*T. serrulatus*) de neutralizar os efeitos letais do veneno de *T. fasciolatus*, foi realizado um teste de soroneutralização *in vivo*.

Para o cálculo da dose utilizada no procedimento de soroneutralização, no grupo utilizando veneno de *T. fasciolatus* foi levada em consideração a maior dose da DL₅₀ onde morreram todos os animais (134,2µg/camundongo). Para o cálculo da dose utilizada com o veneno de *T. serrulatus* (52,65µg/camundongo) utilizou-se raciocínio semelhante, ou seja, 2,25DL₅₀ de *T. serrulatus* (23,4µg/camundongo).

Para a realização da soroneutralização foi utilizada a via subcutânea, pois é a que mais mimetiza a via natural da picada do escorpião. Mendes et al. (2008) utilizaram a mesma via também com o intuito de se aproximar da forma mais natural.

O soro anti-*T. serrulatus* juntamente com o veneno foram posteriormente

incubados durante uma hora a 37°C. Os ensaios foram realizados com 100 e 200µl de soro antiescorpiônico no grupo com o veneno de *T. fasciolatus* e no grupo com o veneno de *T. serrulatus*.

Após 48 horas, foi verificada a sobrevivência dos animais inoculados. Os resultados estão no quadro 3 abaixo.

Quadro 3- Resultados da soroneutralização *in vivo*.

Grupos	Descrição	Sobrevivência	%
G1	134,2µg veneno <i>T. fasciolatus</i> +100µl soro anti- <i>T. serrulatus</i>	1/2	50
G1b	134,2µg veneno <i>T. fasciolatus</i> +100µl PBS	0/2	0
G2	134,2µg veneno <i>T. fasciolatus</i> +200µl soro anti- <i>T. serrulatus</i>	2/2	100
G2b	134,2µg veneno <i>T. fasciolatus</i> +200µl PBS	0/2	0
G3	52,65µg veneno <i>T. serrulatus</i> +100µl soro anti- <i>T. serrulatus</i>	2/2	100
G3b	52,65µg veneno <i>T. serrulatus</i> +100µl PBS	0/2	0
G4	52,65µg veneno <i>T. serrulatus</i> +200µl soro anti- <i>T. serrulatus</i>	2/2	100
G4b	52,65µg veneno <i>T. serrulatus</i> +200µl PBS	0/2	0
G5	100µl de soro anti- <i>T. serrulatus</i>	2/2	100
G5b	200µl de soro anti- <i>T. serrulatus</i>	2/2	100

Todos os animais dos grupos onde se utilizou PBS (1b, 2b, 3b e 4b) apresentaram os sintomas clássicos do envenenamento, como dor local imediata e intensa, prurido na região do focinho, forte dispnéia, rinorréia e agitação como citado na literatura (Dias et al., 2001; Pardal et al., 2003; Ribeiro, 2008), vindo a óbito em torno de 30 minutos após a inoculação.

Os animais do grupo 1 que receberam veneno de *T. fasciolatus* e 100µl de soro anti-*T. serrulatus* também apresentaram os sintomas do envenenamento, sendo

que um deles veio a óbito aproximadamente após 90 minutos. O outro animal ficou prostrado nas horas seguintes e sobreviveu após as 48 horas.

No grupo 2, onde foi utilizado veneno de *T. fasciolatus* e 200µl do soro anti-*T. serrulatus* ocorreu 100% de sobrevivência.

Administração do soro anti-*T. serrulatus* pode prevenir efetivamente a morte em indivíduos picados por escorpião, mas sua ação depende da qualidade do soro e do tempo de

administração com melhores resultados ocorrendo quando administrado dentro das três horas após o acidente (Santana et al., 1996; Maria et al., 2005; Mendes et al., 2007). Observou-se nesta pesquisa que a dose de 200µl de soro antiescorpiônico foi capaz de neutralizar os efeitos da dose de 134,2µg de veneno de *Tityus fasciolatus* (dose máxima letal do estudo da DL₅₀).

Nos grupos 3 e 4, onde foi utilizado veneno de *Tityus serrulatus* e 100 e 200µl de soro anti-*T. serrulatus*, respectivamente, ocorreu 100% de sobrevivência. Uma ampola do soro produzida pela FUNED é capaz de neutralizar 5mg do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (1mg/1ml)³¹.

No passado, a soroterapia sempre teve bons resultados nos acidentes com serpentes e aranhas, mas no caso de escorpiões, a eficácia era questionada devido à viabilidade de outros tratamentos (Ismail, 1995). Atualmente, o papel dos antivenenos no tratamento escorpiônico ainda permanece controverso e sua eficiência depende de sua potência (Ozkan et al., 2008). Porém, muitos autores consideram que o tratamento específico no envenenamento escorpiônico é a utilização do antiveneno (Freire-Maia e Campos, 1987; Hassan, 1984). Outros, entretanto, questionam a eficácia deste contra a prevenção e tratamento para as manifestações cardiovasculares (Gueron e Ovsyshcher, 1987; Gueron et al., 1992). Ismail, (1994) concluiu que a soroterapia na SEE, utilizando um

antiveneno em doses corretas é eficaz na redução da mortalidade das vítimas.

Foi observada a proteção cruzada dos soros antiescorpiônicos, mas, ainda não está claramente demonstrado se qualquer antiveneno é eficaz na neutralização de um grande número de diferentes venenos de uma mesma espécie (Delori et al, 1981).

Nishikawa et al. (1994) concluíram que um antiveneno monovalente contra um dos dois mais perigosos escorpiões (*Tityus serrulatus* ou *Tityus bahiensis*) pode ser usado como terapia nos acidentes nos acidentes escorpiônicos.

Mendes et al. (2004) demonstraram que a proteína não tóxica TsNTxP e a TsNTxP-recombinante podem elevar o título de anticorpos circulantes o suficiente para neutralizar os efeitos tóxicos do veneno bruto.

Ozkan et al. (2008) observaram o poder neutralizante de 400µl de antiveneno de *Androctonus crassicauda* contra 40 doses letais mínimas (DLM) do escorpião *Androctonus crassicauda* e 10 DLM de *Leiurus quinquestriatus*.

6. CONCLUSÕES

A DL₅₀ do veneno de *T. fasciolatus* para camundongo foi de 59,65µg por camundongo.

O veneno do escorpião *T. fasciolatus* causou congestão e hemorragias no coração, pulmão e cérebro dos camundongos.

Após administração de 24µg de veneno de *T. fasciolatus*, os camundongos

³¹ www.funed.mg.gov.br/produtos_servicos/imunobiologicos/bulas/Bula_Soro_Antiescorpionico_ver.04.pdf

apresentaram piloereção, comportamento nociceptivo, secreção nasal e oral acentuada, dispnéia, prurido na face e reflexos exacerbados, policitemia, leucocitose com linfocitose e aumento da porcentagem de CK-MB.

O perfil protéico do veneno de *T. fasciolatus* mostrou similaridade ao veneno de *T. serrulatus*.

Ocorreram reatividade e neutralização cruzadas entre os venenos de *T. fasciolatus* e *T. serrulatus*.

Foram isolados e obtidos clones contendo sequências correspondentes aos transcritos de mRNA presentes na glândula de veneno de *T. fasciolatus*, identificados como Tf1, Tf3 e Tf4a.

O veneno de *Tityus fasciolatus* possui moderada toxicidade e letalidade e o soro anti-*T. serrulatus* é capaz de neutralizar o veneno de *T. fasciolatus* no estudo *in vivo*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento dos efeitos tóxicos do veneno de *T. fasciolatus* fornece informações básicas para estudos futuros, tanto na área de fisiologia como na área clínica.

As novas sequências de proteínas de *Tityus fasciolatus* podem servir de instrumentos de estudos futuros com a obtenção de proteínas recombinantes.

Os resultados descritos neste trabalho reforçam a importância deste tipo de estudo na geração de novos conhecimentos, o que possibilitou o conhecimento do veneno do escorpião *T. fasciolatus* bem como alternativa na geração de novos produtos.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOTTALEB, Y.; CORONAS, F. V.; ROODT, A. de R. et al. A novel toxin from the venom of the scorpion *Tityus trivittatus*, is the first member of a new α -KTX subfamily. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v. 580, p. 592-596, 2006.
- ALTSCHUL, S.F.; LIPMAN, D.J. Protein database searches for multiple alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.87, n.14, p.5509-13. 1990.
- ALVARENGA, L.M.; DINIZ, C.R.; GRANIER, C. et al. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. *Toxicon*, v.40, n.1, p.89-95. 2002.
- ALVARENGA, L.M.; MACHADO DE AVILA, R.A.; AMIM, P.R. et al. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v.46, n.6, p.664-71. 2005.
- ALVES, R.S.; NASCIMENTO, N.R.F.; BARBOSA, P.S.F. et al. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, v.46, n.3, p.271-276, 2005.
- ANDRADE, M.V.; CARAMAZ, M.P.; ABREU, E.M.N.N. et al. Lung compliance, plasma electrolyte levels and acid-base balance are affected by scorpion envenomation in anesthetized rats under mechanical ventilation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, n. 138, p. 97-104, 2004.
- ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; SAMPAIO, S.V. et al. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. *Toxicon*, v.27, n.8, p.907-16. 1989.
- ARANTES, E.C.; RICCIOPPO NETO, F.; SAMPAIO, S.V. et al. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1199, n.1, p.69-75. 1994.
- AVILA, R.A.M.; ALVARENGA, L. M.; TAVARES, C.A.P. et al. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon*, v. 44, p. 233-241, 2004.
- AYEB, M.E.; DELORI, P. Immunology and Immunochemistry of Scorpion Neurotoxins. In: TU, A. T (Ed.). *Handbook of natural toxins, insects, poisons, allergens and other invertebrate venoms*. New York:Marcel Dekker, 1984.v.2, p. 607-638.
- BARBOSA, J.A.R.G.; WAGNER, S.; CASTRO, M.S. et al. The 3D homology model of the first neurotoxic peptide (Tf4) from the scorpion *Tityus fasciolatus*. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 7., 2002. Pirenópolis.

Anais... Pirenópolis: Cruzeiro, 2002. p.317.

BARTHOLOMEW, C. Acute scorpion pancreatitis in Trinidad. *British Medical Journal*, v.1, p. 666-668, 1970.

BATISTA, C.V.; DEL POZO, L.; ZAMUDIO, F. Z. et al. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 803, n.1, p. 55-66, 2004.

BATISTA, C. V.; D'SUZE, G.; GÓMEZ-LAGUNAS, F. et al. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. *Proteomics*, v.6, n. 12, p. 3718-3727. 2006.

BATISTA, C.V.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; LUCAS, S. et al. Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K⁺-channels. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v. 486, p. 117-120, 2000.

BATISTA, C.V.; ROMÁN-GONZÁLEZ, S.A.; SALAS-CASTILLO, S.P. et al. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, v.146, n.1-2, p.147-57, 2007.

BECERRIL, B.; CORONA, M. MEJÍA, M. C. et al. The genomic region

encoding toxin gamma from the scorpion *Tityus serrulatus* contains an intron. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v. 335, n. 1, p. 6-8, 1993.

BECERRIL, B.; MARANGONI, S.; POSSANI, L. D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*, v.5, n. 6, p. 821-835, 1997.

BECHIS, G.; SAMPIERI, F.; YUAN, P. M. et al. Amino acid sequence of toxin VII, a beta-toxin from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.122, n.3, p.1146-53. 1984.

BENVENUTI, L.A.; DOUETTS, K.V.; CARDOSO, J.L.C. Myocardial necrosis after envenomation by the scorpion *Tityus serrulatus*. *The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, p. 275-276, 2002.

BERTAZZI, D. T.; ASSIS-PANDOCHI, A. I.; TALHAFERRO, V. L. et al. Activation of complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Internacional Immunopharmacology*, v. 5, p. 1077-1084, 2005.

BERTAZZI, D.T.; ASSIS-PANDOCHI, A.I.; SEIXAS, A.E.C. et al. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon*, v. 41, p. 501-508, 2003.

BORGES, A.; ALFONZO, M.J.; GARCIA, C.C. et al. Isolation, molecular cloning and functional

characterization of a novel beta-toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. *Toxicon*, v. 43, n. 6, p. 671-684, 2004.

BORGES, A.; GARCIA, C.C.; LUGO, E. et al. Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones, Buthidae): molecular, immunological, and mass spectral analyses. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 142, n.3-4, p. 240-252, 2006.

BORGES, A.; SOUZA, L.; ESPINOZA, J. et al. Characterization of *Tityus* scorpion venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian Antivenoms. *Toxicon*, v. 51, p.66-79, 2008.

BOYD, J.W. Serum enzymes in the diagnosis of disease in man and animals. *Journal Comparative Pathology*, v.98, p.381-404, 1988.

BRAZIL, V. Soro anti-escorpiônico. *Memórias do Instituto de Butantan*, v. 1, n.1, p.47-52, 1918.

BROBST, D. F. Pancreatic function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego:Academic Press, 1997. p.353-366.

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

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

CAMARAZANO, A.C.A.; HENRIQUES, L.M.G. Uma macromolécula capaz de alterar o resultado da CK-MB e induzir ao erro no diagnóstico da infarto agudo do miocárdio. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v.66, p.143-147, 1996.

CAMPOLINA, D. *Georreferenciamento e estudo clínico-epidemiológico dos acidentes escorpiônicos atendidos em Belo Horizonte, no serviço de toxicologia de Minas Gerais*. 2006. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

CAMPOS, J.A.; SILVA, O.A.; LOPEZ, M. et al. Signs, symptoms and treatment of severe scorpion sting in children. *Toxicon*, v.17, Suplemento n.1, p. 1-214, 1979.

CARDINET, G. H. Skeletal muscle function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5ed. San Diego:Academic Press, 1997. p. 407-440.

CARDOSO, J.L.; FAN, W.H.R.; ARAÚJO, A.A. et al. Óbitos por escorpionismo no Brasil (1990-1993). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.28, p.10, 1995.

CARDOSO, M.J.L.; SAKATE, M.; CIAMPOLINI, P.; et al. Envenomation by scorpion in dog – case report.

Journal Venom Animal Toxins incl. Tropical Disease, n.10, v.1, p.99. 2004.

CASTRO, M. S.; LARGURA, S. W. R.; FONTES, W. et al. Purification and partial characterization of a 6.6 kDa neurotoxin from *Tityus fasciolatus* venom. In: XIIITH WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY, 13., 2000. Paris. *Anais...* Paris, 2000. p.273.

CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; FERREIRA, A. M.; CORDEIRO, M. N. et al. Immunological and chemical properties of a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello Campos, 1922). In: C. BON E M. GOYFFON. *Envenoming and their treatment*. Paris: Fundation Marcel Mérieux, 1996. p.183-195.

CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; FONSECA, S. C. G.; CAMPOLINA, D. et al. ELISA for detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v. 32, n. 12, p. 1649-1656, 1994.

CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E.; FERREIRA, A. M. B. M. et al. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v. 35, n. 2, p. 213-221, 1997.

CHUANG, R. S.; JAFFE, H.; CRIBBS, L. et al. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nature Neuroscience*, v.1, n.8, Dec, p.668-74. 1998.

COELHO, F. M.; PESSINI, A. C.; COELHO, A. M. et al. Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, v. 50, p. 420-427, 2007.

CONDE, R.; ZAMUDIO, F.Z.; BECERRIL, B. et al. Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A₂ from *Pandinus imperator* scorpion venom. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v. 460, n. 3, p. 447-450, 1999.

CORDEIRO, F. F.; SAKATE, M.; FERNANDES V. et al. Clinical and cardiovascular alterations produced by scorpions envenomation in dogs. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. v. 12, n. 1, p. 19-43, 2006.

CORONA, M.; ZURITA, M.; POSSANI, L. D. et al. Cloning and characterization of the genomic region encoding toxin IV-5 from the scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Toxicon*, v.34, n.2, p.251-6. 1996.

CORRÊA, M. M.; SAMPAIO, S. V.; LOPES, R. A. et al. Biochemical and histopatological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. *Toxicon*, v.35, p. 1053-1067, 1997.

COURAUD, F.; JOVER, E.; DUBOIS, J. M. et al. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activations the other to the inactivation

of the action potential sodium channel. *Toxicon*, v.20, n.1, p. 9-16, 1982.

COUTINHO-NETTO, J. Purificação e caracterização parcial da tityustoxina. Belo Horizonte: Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, 1975.

CRISPENS, C.G. *Handbook on the laboratory mouse*. Springfield: Thomas Books – Charles C. Thomas Publisher, 1975.

CUNNINGHAM, J. G. *Tratado de fisiologia veterinária*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 579p.

CUPO, P. Scorpion Envenomation-Fatal cases. In: SIMPÓSIO-SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 52., 2002. Pirenópolis. *Anais...* Pirenópolis: Goiás, 2002, p.39.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Escorpiões de importância médica. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W. et al. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Salvier, 2003, p. 198-208.

CUPO, P.; HERING, S.E. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v.40, n. 6, p. 823-830, 2002.

CUPO, P.; JURCA, M.; AZEVEDO-MARQUES, M.M. et al. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratorial and

anatomopathological aspects. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 36, n. 1, p. 67-76, 1994.

CUSINATO, D. A. C.; SOUZA, A. M.; GREGÓRIO, Z.M.O. et al. Hematological changes induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. In: SIMPÓSIO-SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 52., 2002. Pirenópolis. *Anais...* Pirenópolis: Goiás, 2002, p.39.

DAISLEY, H.; ALEXANDER, D.; PITT-MILLER, P. Acute myocarditis following *Tityus trinitatis* envenoming: morphological and pathophysiological characteristics. *Toxicon*, v. 37, p. 159-165, 1999.

DÁVILA, C. A. M.; DÁVILA, D. F.; DONIS, J. H. et al. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon*, v. 40, p. 1339-1346, 2002.

DEHESA-DÁVILA, M.; POSSANI, L. D. Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon*, v. 32, n. 9, p. 1015-1018, 1994.

DELORI, P.; VAN RIETSCHOTEN, J.; ROCHAT, H. Scorpion venoms and neurotoxins: an immunological study. *Toxicon*, v.19, n.3, p.393-407. 1981.

DEVAUX, C.; FOURQUET, P.; GRANIER, C. A conserved sequence region of scorpion toxins rendered immunogenic induces broadly cross-reactive, neutralizing antibodies. *European Journal of Biochemistry*, v.242, p.727-735. 1996.

- DIAS, M. B.; CAMPOLINA., D.; GUERRA, S. D. et al. Escorpionismo In: FILHO, A. A. *Toxicologia na prática clínica*. Belo Horizonte: Folium, 2001.p. 155-165.
- DIEGO-GARCIA, E.; BATISTA, C. V.; GARCIA-GOMEZ, B. I. et al. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon*, v.45, n.3, p.273-83. 2005.
- DINIZ, C. R. Chemical and pharmacological action aspects of *Tityinae* venoms. In: HANDBOOK of experimental pharmacology-arthropods venoms, v.48, Berlin: Springer, 1978, p. 379-394.
- D'SUZE, G.; COMELLAS, A.; PESCE, L. et al. *Tityus discrepans* venom produces a respiratory distress syndrome in rabbits through and indirect mechanism. *Toxicon*, v. 37, p. 173-180, 1999.
- D'SUZE, G. D.; MONCADA, S.; GONZÁLEZ, C. et al. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon*, v. 41, p. 367-375, 2003.
- EICKSTEDT, V.R.D. Escorpionismo por *Tityus stigmurus* no Nordeste do Brasil (Scorpiones, Buthidae). *Memórias do Instituto Butantan*, v.47/48, p.133-137, 1983/1984.
- EL-ASMAR, M. F. Metabolic effect of scorpion venom. In: TU, A. T (Ed.). HANDBOOK of natural toxins, insects, poisons, allergens and other invertebrate venoms. New York:Marcel Dekker, 1984. V.2, p. 551-575.
- FATANI, A. J.; FURMAN, B. L.; ZEITLIN, I. J. The involvement of plasma kinins in the cardiovascular effects of *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom in anaesthetized rabbits. *Toxicon*, v. 36, n. 3, p. 523-536, 1998.
- FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.; MAGALHÃES, L.M. *Patologia clínica veterinária*. 2.ed. Belo Horizonte: Rabelo, 1982. 279p.
- FINCO, D. R. Kidney Function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego:Academic Press, 1997. p. 441-484.
- FINNEY D.J. *Probit analysis*. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.
- FINNEY D.J. *Statistical method in biological assay*. London: Charles Griffin & Co, 1978.
- FLETCHER, P. L.; FLETCHER, M.; FAINTER, L. K. et al. Action of new world scorpion venom and its neurotoxins in secretion. *Toxicon*, v.34, n. 11/12, p. 1399-1411, 1996.
- FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A. On the treatment of the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon*, v. 25, n. 2, p. 125-130, 1987.
- FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A.; AMARAL, C. F. S. Approaches to the

treatment of scorpion envenoming. *Toxicon*, v. 32, n. 9, p. 1009-1014, 1994.

FREIRE-MAIA, L.; FERREIRA, M. C. Estudo do mecanismo da hiperglicemia e da hipertensão arterial produzidas pelo veneno de escorpião no cão. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 59, n. 1, p. 11-22, 1960.

FUKUHARA, Y. D. M.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; CUNHA, F. Q. C. et al. The kinin system in the envenomation caused by the *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicology and Applied Pharmacology*, n. 196, p. 390-395, 2004.

FUKUHARA, Y. D. M.; REIS, M. L.; DELLALIBERA-JOVILIANO. et al. Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*, v. 41, n. 1, p. 49-55, 2003.

GAO R.; ZHANG Y.; GOPALAKRISHNAKONE P. Purification and N-terminal sequence of a serine proteinase-like protein (BMK-CBP) from the venom of the Chinese scorpion (*Buthus martensii* Karsch). *Toxicon*, v.52, n.2, p.348-353, 2008.

GAZARIAN, K.G.; GAZARIAN, T.; HERNÁNDEZ, R. et al. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine*, v.23, n.26, p.3357-3368, 2005.

GOMEZ, M. V. *Purificação e caracterização da toxina do escorpião Tityus serrulatus*. Belo Horizonte:

Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, 1967.

GOMEZ M.V., DINIZ C.R. Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. *Memórias do Instituto Butantan*, v.33, n.3, p.899-902, 1966.

GORDON, D.; GUREVITZ, M. The selectivity of scorpion alpha-toxins for sodium channel subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface. *Toxicon*, v.41, n.2, p.125-8. 2003.

GUATIMOSIN, S. C.; PRADO, V. F.; DINIZ, C. R. et al. Molecular cloning and genomic analysis of TsNTxp: an immunogenic protein from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v.37, n.3, p.507-17. 1999.

GUERON, M.; ILIA, R. Non-cardiogenic pulmonary oedema after scorpion envenomation: a true entity? *Toxicon*, v. 34, n. 4, p. 393-395, 1996.

GUERON, M.; ILIA, R.; SHAHAK, E. et al. Renin and aldosterone levels and hypertension following envenomation in humans by the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon*, v. 30, n. 7, p. 765-767, 1992.

GUERON, M.; OVSYSHCHER, I. Cardiovascular effects of scorpion venoms. In: TU, A. T (Ed.). *HANDBOOK of natural toxins, insects, poisons, allergens and other invertebrate venoms*. New York:Marcel Dekker, 1984. V.2, p. 639-657

GUERON, M.; OVSYSHCHER, I. What is the treatment for the

cardiovascular manifestations of scorpion envenomation? *Toxicon*, v. 25, n. 2, p. 121-124, 1987.

GUERON, M.; STERN, J.; COHEN, W. Severe myocardial damage and heart failure in scorpion sting. *The American Journal of Cardiology*, v. 19, p. 71-726, 1967.

GUERON, M.; YARON, R. Cardiovascular manifestations of severe scorpion sting: clinicopathologic correlations. *Chest*, v. 57, n.2, p. 156-162, 1970.

HASSAN, F. Production of scorpion anivenin. In: TU, A. T (Ed.). *HANDBOOK of natural toxins, insects, poisons, allergens and other invertebrate venoms*. New York:Marcel Dekker, 1984. V.2. p. 577-605.

ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*, v.33, n.7, p.825-858, 1995.

ISMAIL, M. The treatment of the scorpion envenoming syndrome: the Saudi experience with serotherapy. *Toxicon*, v. 32, n. 9, p. 1019-1026, 1994.

ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, M. A. Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration? *Toxicon*, v. 26, n. 3, p. 233-256, 1988.

ISMAIL, M.; GHAZAL, A.; EL-FAKAHANY, E. E. Cardiovascular effects of venom from the scorpion *Buthus occitanus*, Amoreux. *Toxicon*, v. 18, p. 327-337, 1980.

ISMAIL, M.; OSMAN, O. H.; PETKOVIC, D. Eletrocardiographic studies with scorpion (*Buthus minax*, L. Koch) venom. *Toxicon*, v. 14, p. 79-83, 1976.

JAIN, N. C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea &Febiger. 1993, 417p.

KALAPOTAKIS, E. Spiders and scorpions, biology, venom and toxins. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 6, 2000. São Pedro. *Anais...* São Pedro: Cruzeiros, 2000. p.270.

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

KALAPOTHAKIS, E.; JARDIM, S.; MAGALHAES, A.C. et al. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Ttityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, v. 39, p. 679-685, 2001.

KANEKO, J. J. Carbohydrate metabolism e its diseases. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5ed. San Diego:Academic Press, 1997a. p.45-81.

KANEKO, J. J. Serum proteins and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5ed. San Diego:Academic Press, 1997b. p.117-138.

- KARNAD, D. R.; DEO, A. M.; APTE, N. et al. Captopril for correcting diuretic induced hypotension in pulmonary oedema after scorpion sting. *British Medical Journal*, v. 298, p. 1430-1431, 1989.
- KARSCH, F. Scorpionologische Beitrage. II. *Mitt. Munch. Ent.Ver.* v. 3, p. 97-136, 1879.
- KLAASSEN, C.D.; ROZMAN, K. Absorption, distribution and excretion of toxicants. In: *Casarett and doull's toxicology: the basic science of poisonous*. 4.ed. 1994. Cap.3, p.50-87.
- KRAMER, J. W.; HOFFMANN, W. E. Clinical Enzimology. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5ed. San Diego:Academic Press, 1997. p. 303-325.
- LABARRÈRE, C. R.; MELO, M. M.; RIBEIRO, E. L. et al. Leucograma de cães submetidos ao envenenamento escorpiônico experimental. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, 16, 2007. Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte : Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.5259, p.680-5. 1970.
- LEGROS, C.; CEARD, B.; BOUGIS, P. E. et al. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v.431, n.3, p.375-80. 1998.
- LIMA, M. E de.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. et al. *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins display a complex pattern of antigenic reactivity. *Toxicon*, v.31, n.2, p.223-7. 1993.
- LIRA-DA-SILVA, R. M.; AMORIM, A. M.; BRAZIL, T. K. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n. 3, p. 239-245, 2000.
- LOURENÇO, G. A.; LEBRUN, I. DORCE, V. A. C. Neurotoxin effects of fractions isolated from *Tityus bahiensis* scorpion venom (Perty, 1834). *Toxicon*, v.40, p. 149-157, 2002.
- LOURENÇO, W. R. Description of a new species of *Tityus* (Scorpiones, Buthidae) from Serra do Cipo in the State of Minas Gerais, Brazil. *Revue Suisse de Zoologie*, v. 110, n. 2, p. 427-435, 2003.
- LOURENÇO, W. R. The scorpion families and their geographical distribution. *Journal of Venomous and Animal Toxins*, v.7, n.1, p. 3-23, 2001.
- LOURENÇO, W. R. The scorpions (chelicerata, scorpiones) from ecuador, with some considerations on biography and diversity of species. *Revue Suisse de Zoologie*, v.102, n.1, p. 61-88, 1995.
- LOURENÇO W. R.; CLOUDSLEY-THOMPSON J. L.; CUELLAR O. et al. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. *Journal of Venomous*

- Animals and Toxins*, v. 2, n.2, p. 1-9, 1996.
- LOURENÇO, W. R.; KNOX, M. B.; MAGALHAES, E. D. Redescription of *Tityus blaseri* (Scorpiones: Buthidae) from Goiás, Brazil. *Revista de Biologia Tropical*, v.45, n. 4, p. 1579-1582, 1997.
- LOURENÇO, W. R.; EICKSTEDT, V. R. D. Escorpiões de importância médica. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W. et al. *Animais peçonhentos no Brasil biologia clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Salvier, 2003. p. 182-197.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. et al. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUCAS, S. O Laboratório de artrópodes do Instituto Butantan e os aracnídeos peçonhentos. IN: *História, ciências, saúde* . Mangueiras: Rio de Janeiro. vol. 10, n.3, 2003, p. 1025-35.
- MACHADO, J.C.; SILVEIRA FILHO, J.F. Indução de pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico de *T. serrulatus*. *Memórias do Instituto Butantan*, v.40/41, p.1-9, 1976/1977.
- MAGALHÃES, M. M.; PEREIRA, M. E. S.; AMARAL, C. F. S. et al. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*, v. 37, n. 8, p. 1155-1164, 1999.
- MANSUELLE, P.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. et al. The beta-type toxin Ts II from the scorpion *Tityus serrulatus*: amino acid sequence determination and assessment of biological and antigenic properties. *Natural Toxins*, v.1, n.2, p.119-25. 1992.
- MANUAL de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 2001.
- MARIA, W. S.; VELARDE, D. T.; ALVARENGA, L. M. et al. Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon*, v.46, n.2, p.210-7. 2005.
- MARANGONI, S.; GHISO, J.; SAMPAIO, S. V. et al. The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Journal of Protein Chemistry*, v.9, n.5, p.595-601. 1990.
- MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F.; BECHIS, G.; EL AYEB, M. et al. Purification and characterization of eight toxins from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v.23, p.594.1985.
- MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F.; CEARD, B.; RIBEIRO, A. M. et al. Biochemical, pharmacological and genomic characterisation of Ts IV, an alpha-toxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v.342, n.2, p.181-4. 1994.

- MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CEARD, B.; RIBEIRO, A. M. et al. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a CDNA encoding the main β -neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v.302, n.3, p.220-222, 1992.
- MEKI, A. R. M. A.; EL-DEAN, Z. M. M. Serum interleukin-1 β , interleukin-6, nitric oxide and α 1-antitrypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon*, v. 36, n.12, p. 1851-1859, 1998.
- MELO, M.M.; SILVA JÚNIOR, P. G. P.; VERÇOSA JÚNIOR, D. et al. Escorpionismo. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.44, p.90-97, 2004.
- MELO, M. M. ; VERCOSA JUNIOR, D. ; PINTO, M. C. L. et al. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em camundongos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, p. 631-640, 2008.
- MENDES, T. M. *Antígeno para a produção de soro contra o veneno do escorpião Tityus serrulatus*. 2007. 78f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MENDES, T.M.; DIAS, F.; HORTA, I.F. et al. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1. *Toxicon*, v.52, p. 787-793, 2008.
- MENDES, T. M.; MARIA, W. S.; GRANIER, C. et al. Epitope mapping of the antigenic protein TsNTxP from *Tityus serrulatus* scorpion venom using mouse, rabbit and sheep antibodies. *Toxicon*, v. 44, n. 6, p. 617-624, 2004.
- MOREIRA-FERREIRA, A. M.; KALAPOTHAKIS, E.; DINIZ, C. R. et al. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization of mice with a non-toxic protein. *Toxicon*, v.36, n.2, p.333-9,1998.
- MOSBAH, A.; KHARRAT, R.; FAJLOUN, Z. et al. A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. *Proteins*, v.40, n.3, p.436-42. 2000.
- MOREY, S.S.; KIRAN, K.M.; GADAG, J.R. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon*, v.47, n.2, p.188-195, 2006.
- MURTHY, K.R. K.; HAGHNAZARI, L. The blood levels of glucagon, cortisol and insulin following the injection of venom by the scorpion (*Mesobuthus tamulus concanesis*, POCOCK) in dogs. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v. 5, n.1, p. 47-55, 1999.
- MURTHY, K. R. K.; HASE, N. K. Scorpion envenoming and the role of insulin. *Toxicon*, v. 32, n. 9, p. 1041-1044, 1994.
- NAOUM, P.C. *Eletroforese: técnicas e diagnósticos*. São Paulo: Livraria Santos. 1990. 174p.

- NASCIMENTO JÚNIOR, E. B.; COSTA, K. A.; BERTOLLO, C. M. et al. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v. 45, n. 7, p. 585-593, 2005.
- NISHIKAWA, A.K.; CARICATI, C.P.; LIMA, M.L. et al. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon*, v.32, p. 989-998, 1994.
- NOVAES, G.; CATANZARO, O. L.; BERALDO, W. T.; FREIRE-MAIA, L. Effect of purified scorpion toxin (tityustoxin) on the pancreatic secretion of the rat. *Toxicon*, v. 20, n. 5, p. 847-853, 1982.
- NOVAES, G.; QUEIROZ, A. C.; QUEIROZ, A. P. et al. Estudo histopatológico do pâncreas de ratos intoxicados pelo veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2002.
- NOVELLO, J. C.; ARANTES, E. C.; VARANDA, W. A. et al. TsTX-IV, a short chain four-disulfide-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca²⁺-activated K⁺channels. *Toxicon*, v.37, n.4, p.651-60. 1999.
- NUNAN, E. A.; ARYA, V.; HOCHHAUS, G. et al. Age effects on the pharmacokinetics of tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 385-390, 2004.
- NUNAN, E. A.; MORAES, M. F. D.; CARDOSO, V. N. et al. Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Life Sciences*, v. 73, p. 319-325, 2003.
- OZKAN, O.; ADIGUZEL, S.; INCEOGLU, B. et al. Evaluation of the neutralizing capacity of *Androctonus crassicauda* (Oliver, 1807) antivenom against *Leiurus quinquestriatus* (Ehrenberg, 1928) venom (Scorpiones: Buthidae). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 14, n. 3, p. 481-496, 2008.
- PARDAL, P.P.O.; CASTRO, L.C.; JENNINGS, E. et al. Aspectos epidemiológicos e clínicos do escorpionismo na região de Santarém, Estado do Pará, Brasil. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical*, v.36, n.3, p.349-353, 2003.
- PESSINI, A.C.; KANASHIRO, A.; MALVAR, D. C. et al. Inflammatory mediators involved in the nociceptive and oedematogenic responses induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom injected into rat paws. *Toxicon*, v. 52, p. 729-736, 2008.
- PESSINI, A.C.; SANTOS, D. R.; ARANTES, E. C. et al. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Toxicon*, v. 48, n. 5, p. 556-566, 2006.
- PESSINI, A.C.; TAKAO, T.T.; CAVALHEIRO, E.V. et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation,

characterization and inhibition by flavonoids . *Toxicon*, v.39, n.10, p.1495-1504, 2001.

PETRICEVICH, V. L.; CRUZ, A.H.; CORONAS, F. I. V. et al. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom play an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon*, v. 50, n. 5, p. 666-675, 2007.

PIMENTA, A. M. C.; MANSUELLE, P.; STOCKLIN, R. et al. A proteomic approach to prospect new structural families of bioactive peptides in *Tityus serrulatus* scorpion venom. In: SIMPÓSIO-SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 52., 2002. Pirenópolis. *Anais...* Pirenópolis: Goiás, 2002, p.36.

PIMENTA, A. M. C.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.; ROCHAT, H. et al. Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins with anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). *Toxicon*, v. 39, p. 1009-1019, 2001.

PLAZZI, M.I.A.; STUTZ, W.H.; PLAZZI SOBRINHO, A. *Acidentes escorpionicos em Ituiutaba, Minas Gerais, Brasil: Um estudo epidemiológico retrospectivo*. 2000. <<http://www.escorpiao.vet.br/ituiutaba.html>> - Acessado em 29/12/07

POCOCK, R.I. Descriptions of some news species of scorpions of the genus *Tityus*, with notes upon some forms allied to *T. americanus* (Linn.). *Annals and Magazine of Natural History*, v. 19, n. 6, p.510-521, 1897.

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

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

POSSANI, L. D.; MARTIN, B. M. e SVENDSEN, I. The primary structure of noxiustoxin:a K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg research communications*, v.47, p.285- 289. 1982.

POSSANI, L. D.; MARTIN, B. M.; SVENDSEN, I. et al. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. *Biochemical Journal*, v.229, n.3, p.739-50. 1985.

POSSANI, L. D.; MERINO, E.; CORONA, M. et al. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie*, v. 82, p. 861-868, 2000.

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

- POSSANI, L.D.; MARTIN, B.M.; FLETCHER, M.D. et al. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *tityus-serrulatus* scorpion-venom. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n.5, p.3178-3185, 1991.
- POSSANI, L. D; MARTIN, B. M.; MOCHCA-MORALES, J. et al. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Melo. *Carlsberg Research Communications*, v. 46, p. 183-194, 1981.
- POSSANI, L. D. Structure of scorpion toxins. In: TU, A. T (Ed.). *HANDBOOK of natural toxins, insects, poisons, allergens and other invertebrate venoms*. New York:Marcel Dekker, 1984. v.2, p. 513-550.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B. et al. *Afip laboratory methods in histotechnology*. Washington: AM Registry of Pathology, 1992. 278p.
- RAMANAIAH, M.; PARTHASARATHY, P.R.; VENKAIAH, B. Isolation and characterization of hyaluronidase from scorpion (*Heterometrus fulvipes*) venom. *Biochemistry International*, v. 20, n.2, p.301-310, 1990.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- REVELO, M.P.; BAMBIRRA, E.A.; FERREIRA, A.P. et al. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon*, v.34, n.10, p.1119-1125, 1996.
- REZENDE, N. A.; AMARAL, F. S.; FREIRE-MAIA, L. Immunotherapy for scorpion envenoming in Brazil. *Toxicon*, v. 36, n. 11, p. 1507-1513, 1998.
- REZENDE, N. A.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; AMARAL, C. F. S. Is the severity of *Tityus serrulatus* scorpion envenoming related to plasma venom concentrations? *Toxicon*, v.34, n. 7, p. 820-823, 1996.
- RIBEIRO, E. L.; *Avaliação clínica e laboratorial de cães submetidos ao envenenamento por tityus serrulatus lutz e mello, 1922 (scorpiones, buthidae)*. 2008. 92f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- RIBEIRO, E.L.; MELO, M.M.; GUIMARÃES, P.T.C. et al. Hemograma de cães submetidos ao envenenamento experimental por *Tityus serrulatus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.1, 2009. (in press)
- RIJNBERK, A. D.; MOL, J. A. Adrenocrotical function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5ed. San Diego:Academic Press, 1997. p. 553-570.
- RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, L. D. Overview of scorpion

- toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure function relationships and evolution. *Toxicon*, v.46, n.8, p.831-44, 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Col Spring Harbor Laboratory Press. 1989. v.1-3.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 264p.
- SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; PRADO, W. A. et al. Further characterization of toxins T1IV (TsTX-III) and T2IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v.29, n.6, p.663-72. 1991.
- SAMPAIO, S. V.; COUTINHO-NETTO, J.; ARANTES, E. C. et al. TsTX-VII, a new toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom able to induce the release of neurotransmitters from rat brain synaptosomes not blocked by tetrodotoxin. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v.41, n.6, p.1255-63. 1997.
- 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*, v.21, n.2, p.265-77. 1983.
- SANKARAN, H.; DEVENNEY, C. W.; BARTHOLOMEW, C. et al. Action of the venom of the scorpion *Tityus trinitatis* on pancreatic insulin secretion. *Biochemical Pharmacology*, v. 32, n. 6, p. 1001-1004, 1983.
- SANTANA, G. C.; FREIRE, A. C. T.; FERREIRA, A. P. L. et al. Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the rat. *Toxicon*, v. 34, n. 9, p. 1063-1066, 1996.
- SCHWARTZ, E.F.; CAMARGOS, T.S.; ZAMUDIO, F.Z. et al. Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon*, v.51, n.8, p.1499-1508, 2008.
- SCHWARTZ, E.F.; DIEGO-GARCIA, E.; RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R.C.; et al. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC Genomics*, v. 16, n. 8, p.119, 2007.
- SILVESTRE, F. G. *Caracterização parcial bioquímica, imunológica e molecular do veneno das aranhas *Loxocles similis*, *L. gaucho*, *L. anomala* e *Lasiadora* sp.* 2005. 183f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- SILVESTRE, F.G.; CASTRO, C.S.; MOURA, J.F. et al. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon*, v. 46, p. 927-936, 2005.

- SMITH, C. G.; VANE, J. R. The discovery of Captopril. *The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal*, v. 17, p. 788-789, 2003.
- SOARES, M.R.M.; AZEVEDO, C.S.; MARIA, M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, n.4, p.359-363, 2002.
- SOFER, S.; GUERON, M.; WHITE, R. M. et al. Interleukin-6 release following scorpion sting in children. *Toxicon*, v. 34, n. 3, p. 389-392, 1996.
- SOFER, S.; SHALEV, H.; WEIZMAN, Z. et al. Acute pancreatitis in children following envenomation by the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon*, v. 29, n.1, p. 125-128, 1991.
- TARASIUK, A.; SOFER, S. Effects of adrenergic-receptor blockade and ligation of spleen vessels on the hemodynamics of dogs injected with scorpion venom. *Critical Care Medicine*, v. 25, p. 365-372, 1999.
- TEIXEIRA JÚNIOR, A. L.; FONTOURA, B. F.; FREIRE-MAIA, L. et al. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon*, v. 39, p. 703-709, 2001.
- THOMPSON, J. P. Moléstias imunológicas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Tratado de medicina interna veterinária*. 4ed. São Paulo: Manole, 1997. p.2616-2666.
- THRALL, M. A. Veterinary hematology and clinical chemistry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 518p.
- TIZARD, I. R. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 6 ed. São Paulo: Roca. 2002. 532p.
- TOLEDO, D. e NEVES, A. G. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v.55, n.2, p.249-53, 1976.
- VALDEZ-CRUZ, N. A.; SEGOVIA, L.; CORONA, M. et al. Sequence analysis and phylogenetic relationship of genes encoding heterodimeric phospholipases A2 from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Gene*, v.396, n.1, p.149-58. 2007.
- VASCONCELOS, F.; LANCHOTE, V. L.; BENDHACK, L. M. et al. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 141, n.4, p. 85-92, 2005.
- VEGA, R. C. R.; POSSANI, L. D. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*, v. 46, n. 8, p. 831-844, 2005.
- WAGNER, S.; CASTRO, M.S.; BARBOSA, J.A.R.G. et al. Purification and primary structure determination of Tf4, the first bioactive peptide isolated

from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. *Toxicon*, v. 41, p.737-745, 2003.

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

YUGANDHAR, B.; MURTHY, K. R. K.; SATTAR, S. A. Insulin administrations in severe scorpion envenoming. *Journal of venomous*

animals and toxins, v. 5, n. 2, p.200-219, 1999.

ZHIJIAN, C.; FENG, L.; YINGLIANG, W. et al. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon*, v. 47, n. 3, p. 348-355, 2006.

ZOUARI, N.; MILED N.; ROUIS, S. et al. Scorpion digestive lipase: a member of a new invertebrate's lipase group presenting novel characteristics. *Biochimie*, v. 89, n.3, p.403-409, 2007.

9.ANEXO



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 131/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Caracterização bioquímica, imunológica e molecular do veneno de *Tityus fasciolatus***", que tem como responsável **Marília Martins Melo**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **20/ 12/2006**.

Este certificado expira-se em **20/ 12 / 2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 131/2006**, related to the project entitled "**Biochemistry, immunology and molecular characterization of *Tityus fasciolatus* venom**", under the supervision of **Marília Martins Melo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 20, 2006**.

This certificate expires in **December 20, 2011**.

Belo Horizonte, 22 de Dezembro de 2006.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

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

(Mod.Cert. v1 0)