

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**TOXICIDADE DA PEÇONHA DE *Tityus serrulatus* PROCEDENTE DO DISTRITO
FEDERAL POR MEIO DA AVALIAÇÃO DA DL₅₀, EFEITOS DA PEÇONHA E
EDEMA PULMONAR INDUZIDO**

FAGNER NEVES OLIVEIRA

Brasília, 2011

FAGNER NEVES OLIVEIRA

**TOXICIDADE DA PEÇONHA DE *Tityus serrulatus* PROCEDENTE DO DISTRITO
FEDERAL POR MEIO DA AVALIAÇÃO DA DL₅₀, EFEITOS DA PEÇONHA E
EDEMA PULMONAR INDUZIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Ferroni
Schwartz

Brasília, 2011

FAGNER NEVES OLIVEIRA

**TOXICIDADE DA PEÇONHA DE *Tityus serrulatus* PROCEDENTE DO DISTRITO
FEDERAL POR MEIO DA AVALIAÇÃO DA DL₅₀, EFEITOS DA PEÇONHA E
EDEMA PULMONAR INDUZIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 28 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz – Presidente da Banca Examinadora
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Vitor Laerte Pinto Junior – Membro Titular Externo
Fundação Osvaldo Cruz – Brasília

Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos - Membro Titular Externo
Departamento de Genética e Morfologia, IB, UnB

Profa. Dra. Márcia Renata Mortari - Membro suplente
Departamento de Ciências Fisiológicas, IB, UnB

*Dedico este trabalho ao Sr. Leonardo Paiva Oliveira (in memoriam), meu pai.
Pai, tenho certeza que você está muito orgulhoso de mim, observando cada avanço
que tenho dado na minha carreira profissional.
A toda minha família que permaneceu na torcida durante esse processo.
Ao Anderson por todo apoio e compreensão que me foi dado.
Esta vitória também é de vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus que me permitiu a realização desse grande sonho, a ti Deus seja toda honra, toda glória e todo louvor.

Ao Anderson por todo apoio, carinho, preocupação, incentivo e acima de tudo paciência durante todo esse período. Obrigado Anderson, você também é parte dessa vitória e ela também é sua.

Aos meus familiares, que mesmo de longe estiveram sempre na torcida se alegrando por cada passo que foi dado rumo ao meu crescimento profissional e Acadêmico. Em especial a minha avó (Severina) e a minha tia (Nalva).
Obrigado pelo apoio.

À *Profa. Dra. Elisabeth Schwartz*, pelas orientações, incentivos, presteza, dedicação, paciência, apoio, compreensão e acima de tudo, pelo aprendizado que adquiri durante o desenvolvimento dessa pesquisa, que servirá para toda minha vida acadêmica e pessoal. Muito obrigado Beth, esse trabalho tem muito de você.

À *Profa. Dra. Márcia Renata Mortari*, por toda a atenção que me foi dada desde a minha chegada no Laboratório de Toxinologia (UnB) e por todo o auxílio, incentivo e preocupação durante a realização desse trabalho. Obrigado Márcia, sei que minha continha com você cresce a cada dia, um dia a pagarei, provavelmente não será a ti, mas aos meus futuros alunos que receberão parte de todo esse conhecimento que adquiri durante esses dois anos e você foi parte desse processo.

Aos Professores: *Dr. Carlos Schwartz, Dr. Osmindo Junior, Dr. Antonio Sebben, e Dra. Mariana Castro*, do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília que também foram auxílio em vários momentos durante esses dois anos de esforço.

À *Profa. Dra. Fabiana Pirani* do Laboratório de Patologia da Faculdade de Saúde – (UnB) e ao *Bráulio*, técnico deste laboratório, por todo auxílio no processamento do material histológico e análises dos mesmos.

À Profa. *Dra. Consuelo Latorre Fortes-Dias*, da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, que gentilmente nos cedeu a peçonha de *T. serrulatus* procedente de Minas Gerais.

À Lilian Perin pela amizade e incentivo desde a minha chegada a Brasília e também pela ajuda na contagem dos leucócitos. Lilian muito obrigado.

Aos Técnicos do laboratório de Toxinologia (UnB), *Washington* e *Valter César (Cezinha)*.

Ao *Pedro Ivo*, Laboratório de Anatomia Comparada (UnB), pelo auxílio na dissecação dos ratos.

A todos os colegas e amigos que conquistei durante esses dois anos no laboratório de Toxinologia, em especial a:

Andréa Carvalho pela amizade e apoio que a mim foram dedicados em vários momentos aqui em Brasília. Sou muito grato a tudo que fizestes por mim, e pelo companheirismo que me dedicastes. Obrigado.

Natiela Oliveira por me acompanhar nas árduas coletas de escorpiões no sol escaldante de setembro em Brasília, além, das tardes e tardes de extrações de peçonha. Nati, nós vamos fazer extração de peçonha de quantos escorpiões hoje? 100? 200? Obrigado Nati, essa foi umas das parcerias mais valiosas que encontrei em Brasília, obrigado pela amizade e carinho.

Jimmy Guerreiro (o Colombiano), grande amigo! Obrigado por tudo cara, não vou listar a quantidade de coisas que tenho a te agradecer, pois posso esquecer algo, só não posso esquecer que terei que pagar cachaças e cervejas para você pelo resto da vida. Jimmy valeu pela grande parceria durante o decorrer dessa pesquisa, foi um prazer trabalhar junto com você, obrigado por todo aprendizado.

Solange Rego, fotógrafa particular dos meus experimentos, e ao grande *Hugo Silva* (Hugano), sou muito grato a vocês dois, pelo companheirismo, amizade, fidelidade e por toda ajuda e apoio principalmente nos últimos dias de conquista dessa vitória.

Sol, obrigado pelas belas fotos que auxiliaram na composição deste trabalho.

Hugano, obrigado pela formatação, correções e sugestões sempre muito bem vindas. Obrigado amigos

À Caroline Barbosa (Carol), Thalita, Rafael Melani, Christiano, Jéssica, Rosa, Lucianna, Leandro, Lucélia, Tainã, Flávia, Lilian, Cecília e Marianne. Obrigado amigos, vocês também fizeram parte de todo esse processo.

Aos amigos Emiliano e Cláudio que mesmo de longe sempre estiveram na torcida e incentivo a cada passo dado durante a realização deste trabalho.

À Rosinha (Rosa Santana) pela amizade, incentivo e torcida.

À minha família por adoção em Brasília, Mãe (D. Florisa) uma verdadeira flor na minha vida e Aline (Nina) grande mana. Obrigado por todo apoio durante a minha chegada em Brasília.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

O escorpião *Tityus serrulatus*, espécie endêmica do Brasil, é responsável pelos acidentes mais graves frequentemente registrados no país, particularmente na região Sudeste. A principal causa de morte por este agravo é o edema pulmonar agudo (EPA). A incidência desta espécie no DF tem aumentado, porém, não existem registros de escorpionismo grave nesta região. Diante disso, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a toxicidade da peçonha de *T. serrulatus* do DF (TS-DF), por meio da avaliação da DL₅₀ e das alterações induzidas pela peçonha em camundongos; avaliar a capacidade de indução de EPA em ratos por meio da relação entre a massa úmida do pulmão e a massa corpórea de ratos tratados e não tratados com peçonha; avaliar a permeabilidade vascular pulmonar (PVP), utilizando o protocolo de azul de Evans (AE); realizar análises histológicas do pulmão e do coração dos animais experimentados; e determinar as dosagens séricas de CK e CK-MB, além da contagem total de leucócitos no lavado bronco-aveolar (LBA) dos ratos. Todos esses ensaios foram também conduzidos com a peçonha de *T. serrulatus* de MG (TS-MG) para fins de comparação. A peçonha de TS-DF apresentou-se duas vezes menos tóxica a camundongos (51,6 µg/kg) que a peçonha de TS-MG (26 µg/kg). Foi verificado um aumento significativo na relação massa úmida dos pulmões / massa corpórea e um aumento na PVP nos ratos do grupo TS-MG ($p > 0,001$) em relação ao controle e ao TS-DF, sendo que, entre esses dois últimos grupos, essas diferenças não foram observadas ($p < 0,05$). As análises histológicas mostraram EPA intra-alveolar multifocal apenas em animais do grupo TS-MG. Os tecidos cardíacos de todos os animais apresentaram-se normais. No entanto, as dosagens séricas de CK e CK-MB e a quantidade de leucócitos encontrados no LBA foram maiores apenas nos animais do grupo TS-MG ($p > 0,05$). Os perfis cromatográficos obtidos para as peçonhas de *T. serrulatus* das duas populações estudadas foram qualitativamente semelhantes. Algumas diferenças quantitativas foram observadas e podem explicar as diferenças na toxicidade e nas atividades biológicas dessas peçonhas. Assim, a peçonha de TS-DF é duas vezes menos tóxica a camundongos que a peçonha de TS-MG e não é capaz de induzir EPA em ratos, ao contrário do que é observado para a peçonha de TS-MG. É possível que a peçonha de TS-DF possua uma menor quantidade de peptídeos que

atuam em canais para Na^+ , que são considerados os principais responsáveis pela maioria dos sintomas apresentados no escorpionismo. Estes resultados corroboram com os sintomas descritos para o escorpionismo no DF causado por esta espécie de escorpião e confirmam a variação na peçonha das duas populações estudadas.

Palavras-chave: Toxicidade; Edema Pulmonar Agudo; Peçonha de Escorpião; *Tityus serrulatus*; Distrito Federal.

ABSTRACT

The scorpion *Tityus serrulatus*, endemic specie from Brazil, is responsible for the most frequent and serious registered accidents in the country, particularly in the Southeast, with their main cause of death being the lung edema (LE). The incidence of this species has increased in Distrito Federal, however, it is not responsible for severe scorpionism in this region. Therefore, the main objectives of this study were: 1) to evaluate the toxicity of the *T. serrulatus* venom from DF (TS-DF), by determining the LD₅₀ and the changes induced by the venom in mice; 2) to evaluate the induction of LE in rats through the relationship between lung wet weight and body mass of rats inoculated or not with venom; 3) to evaluate the pulmonary vascular permeability (PVP) using the protocol of Evans blue (EA); 4) performing histological analysis of lung and heart of rats; 5) to determine the serum CK and CK-MB; and 6) counting total leukocytes in bronchoalveolar fluid of envenomed rats. All these tests were also conducted with the *T. serrulatus* venom from MG (TS-MG) for comparison purposes. The TS-DF venom was two times less toxic to mice (51.6 mg / kg) than the TS-MG venom (26 mg / kg). There were a significant increase in the ratio of lung wet weight / body mass and an increase in PVP in the rats in group TS-MG ($p > 0.001$) compared to control and TS-DF, and, between these two groups, these differences were not observed ($p < 0.05$). Histological analysis showed multifocal intra-alveolar LE only in animals of TS-MG group. Cardiac tissues of all animals were normal. However, serum CK and CK-MB and the amount of leukocyte found in bronchoalveolar fluid were higher only in TS-MG group ($p > 0.05$). The chromatographic profiles obtained from *T. serrulatus* venoms of the two populations studied were qualitatively similar. Some quantitative differences were observed and may explain differences in toxicity and biological activities found on these venoms. Thus, the TS-DF venom was two times less toxic to mice than the TS-MG venom and was not able to induce LE in mice, unlike it was observed for the TS-MG venom. It's possible that the TS-DF venom has a smaller amount of peptides that act on Na⁺ channels, which are considered as primarily responsible for most symptoms in the scorpionism. These results agree with the symptoms described for the scorpionism in

the DF caused by this species and confirm the venom variation of the two populations.

Keywords: Toxicity, Lung Edema; Scorpion Venom; *Tityus serrulatus*; Distrito Federal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Morfologia externa geral do escorpião <i>T. serrulatus</i> proveniente do Distrito Federal. Em (A) vista dorsal e em (B) vista ventral.....	23
Figura 2:	<i>Tityus serrulatus</i> Lutz & Melo, 1922 (escorpião amarelo), procedente de Brasília – DF.....	25
Figura 3:	Metassoma de <i>Tityus serrulatus</i> Lutz & Melo, 1922 (Escorpião Amarelo), procedente de Brasília – DF.....	26
Figura 4:	Extração da peçonha de <i>T. serrulatus</i> por estimulação elétrica.....	62
Figura 5:	Esquema geral representativo da estratégia metodológica empregada na realização deste estudo.....	75
Figura 6:	Curvas dose-resposta obtidas a partir de injeções i.p. da peçonha de <i>T. serrulatus</i> procedente do Distrito Federal e de Minas Gerais.....	77
Figura 7:	Avaliação do Edema Agudo Pulmonar dos grupos Controle, TS-MG e TS-DF.....	81
Figura 8:	Fotomicrografia representante da histologia do pulmão de ratos 1 h após a injeção i.v. da peçonha.....	82
Figura 9:	Fotomicrografia representativa da histologia do coração de ratos 1 h após a injeção i.v. da peçonha.....	83
Figura 10:	Dosagem de Creatina Quinase (CK) em soro de ratos dos grupos Controle, TS-MG e TS-DF.....	84
Figura 11:	Dosagem da Isoenzima (CK-MB) em soro de ratos dos grupos Controle, TS-MG e TS-DF.....	85
Figura 12:	Quantificação do Azul de Evans no Pulmão de ratos dos grupos Controle, TS-MG e TS-DF.....	86
Figura 13:	Quantificação do Azul de Evans no Lavado Bronco Alveolar de ratos dos grupos Controle, TS-MG e TS-DF.....	87
Figura 14:	Quantificação de leucócitos totais no Lavado Bronco Alveolar de ratos dos grupos Controle, TS-MG e TS-DF.....	88
Figura 15:	Perfis cromatográficos obtidos do fracionamento de 1 mg da peçonha de <i>T. serrulatus</i> procedente de MG e do DF.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Estrutura primária de Na-toxinas isoladas da peçonha de escorpiões brasileiros do gênero <i>Tityus</i>	32
Tabela 2:	Estrutura primária de K-toxinas da subfamília α -KTx isoladas da peçonha de escorpiões do gênero <i>Tityus</i>	33
Tabela 3:	Estrutura primária de K-toxinas da subfamília β -KTx isoladas da peçonha de escorpiões do gênero <i>Tityus</i>	34
Tabela 4:	Número absoluto de acidentes escorpiônicos registrados no Brasil, notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) do Ministério da Saúde por UF de ocorrência e ano do acidente, no período compreendido entre 2007 e 2010 (Apenas 1º semestre).....	44
Tabela 5:	Número absoluto de Óbitos por escorpionismo registrados no Brasil, por região e UF de ocorrência notificados no Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), nos anos de 2007 e 2008.....	45
Tabela 6:	Principais respostas dos órgãos efetores aos estímulos adrenérgicos e colinérgicos.....	48
Tabela 7:	Definição das alterações comportamentais e fisiológicas.....	65
Tabela 8:	Alterações visualizadas em camundongos (n=8) nas três primeiras horas após injeção i.p. de diversas doses de peçonha do escorpião <i>T. serrulatus</i> proveniente de Minas Gerais.....	78
Tabela 9:	Alterações visualizadas em camundongos (n=8) nas três primeiras horas após injeção i.p. de diversas doses de peçonha do escorpião <i>T. serrulatus</i> proveniente do Distrito Federal.....	79
Tabela 10:	Avaliação do Edema Agudo Pulmonar por meio do índice determinado pela relação entre a massa do pulmão e a massa corpórea dos ratos dos grupos Controle, TS-MG e TS-DF.....	80
Tabela 11:	Valores de Creatina Quinase (CK) e sua isoenzima (CK-MB) no soro de ratos. Grupo controle, TS-MG e TS-DF.....	84

LISTA DE QUADRO

Quadro 1:	Classificação e tratamento do escorpionismo.....	56
------------------	--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
AE	Azul de Evans
BPPs	Peptídeos Potencializadores de Bradicinina
CK	Enzima creatina Quinase
CK-MB	Isoenzima da creatina Quinase
DL₅₀	Dose Letal capaz de matar 50% dos animais experimentados
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EA	Evans Blue
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EPA	Edema Pulmonar Agudo
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais
KC	Quimiocinas derivadas de queratinócitos
LBA	Lavado Bronco-Aveolar
LE	<i>Lung Edema</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight</i>
MPO	Mieloperoxidase e óxido nítrico
Nav	Canais para Na ⁺ voltagem-dependentes
PVP	Permeabilidade Vascular Pulmonar
SNC	Sistema Nervoso Central
TFA	Ácido Trifluoroacético
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TS-DF	<i>T. serrulatus</i> procedente do Distrito Federal
TS-MG	<i>T. serrulatus</i> procedente de Minas Gerais (TS-MG)
Uniprot	<i>Universal Protein Resource</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	CLASSIFICAÇÃO, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, ECOLOGIA E BIOLOGIA DOS ESCORPIÕES.....	19
1.2	O GÊNERO <i>TITYUS</i>	24
1.3	PEÇONHA ESCORPIÔNICA.....	28
1.3.1	Canais de Na⁺ e Toxinas Moduladoras de Canais Seletivos a Na⁺	29
1.3.2	Canais de K⁺ e Toxinas Bloqueadoras de Canais Seletivos a K⁺	30
1.3.3	Canais Para Cl⁻ e Toxinas que se Ligam a Esses Canais	34
1.3.4	Canais Para Ca²⁺ e Toxinas que se Ligam a Esses Canais	35
1.3.5	Peptídeos sem pontes dissulfeto	36
1.4	PEÇONHA DE <i>Tityus serrulatus</i>	37
1.5	ESCORPIONISMO.....	39
1.5.1	Escorpionismo no Distrito Federal	41
1.6	EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES ESCORPIÔNICOS.....	42
1.7	QUADRO CLÍNICO DO ESCORPIONISMO.....	46
1.7.1	Quadro Clínico Local	47
1.7.2	Quadro Clínico Sistêmico	49
1.7.2.1	Manifestações Gastrointestinais.....	49
1.7.2.2	Manifestações Respiratórias e Cardiocirculatórias.....	51
1.7.2.2.1	<i>Edema Pulmonar Agudo</i>	52
1.7.2.3	Manifestações Neurológicas.....	54
1.8	Classificação do Escorpionismo	55
2	RELEVÂNCIA CIENTÍFICA	57
3	OBJETIVOS	59

3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	59
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.1 COLETA DOS ESPÉCIMES DE ESCORPIÃO.....	61
4.2 MANUTENÇÃO EM CATIVEIRO.....	61
4.3 EXTRAÇÃO DA PEÇONHA.....	62
4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE.....	63
4.4.1 Determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀).....	63
4.4.2 Determinação dos Efeitos da Peçonha.....	64
4.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE EDEMA AGUDO PULMONAR.....	65
4.5.1 Preparação dos Órgãos para Análise Morfológica.....	67
4.5.2 Coletas de Sangue e dosagens séricas de Creatina Quinase (CK) e de sua isoenzima CK-MB.....	69
4.5.3 Avaliação das Alterações da Permeabilidade Vascular.....	70
4.5.4 Contagem Total de Leucócitos.....	71
4.6 PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PEÇONHA DE <i>T. serrulatus</i> PROCEDENTE DE MINAS GERAIS E DO DISTRITO FEDERAL.....	72
4.7 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS.....	73
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
5 RESULTADOS.....	76
5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE.....	76
5.1.1 Determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀).....	76
5.1.2 Determinação dos Efeitos da Peçonha.....	77
5.2 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE EDEMA AGUDO PULMONAR.....	80
5.2.1 Análise Morfológica.....	81
5.2.2 Dosagens séricas de CK e CK-MB.....	83
5.2.3 Avaliação das Alterações da Permeabilidade Vascular.....	86
5.2.3.1 Quantificação de Azul de Evans no pulmão.....	86

5.2.3.2 Quantificação de Azul de Evans no Lavado	
Bronco Alveolar.....	87
5.2.4 Contagem Total de Leucócitos.....	88
5.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PEÇONHA BRUTA.....	89
6 DISCUSSÃO.....	91
7 CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS.....	102
ANEXO A – Declaração de avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) UnB.....	125

1 INTRODUÇÃO

1.1 CLASSIFICAÇÃO, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, ECOLOGIA E BIOLOGIA DOS ESCORPIÕES

Os escorpiões são considerados os mais antigos artrópodes terrestres conhecidos, com registros fósseis que datam desde o período Siluriano. No Siluriano e no Devoniano esses animais eram aquáticos, possuíam brânquias e não tinham garras társicas. Os terrestres só apareceram no Carbonífero superior e acredita-se que tenham evoluído a partir dos euripterídeos (HICKMAN *et al.*, 2004).

Graças à sua capacidade evolutiva e adaptativa, os escorpiões sobrevivem na superfície da Terra ao longo de aproximadamente 400 milhões de anos, mantendo durante todo esse tempo a sua morfologia praticamente inalterada (LOURENÇO *et al.*, 2004).

Os escorpiões pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida e a ordem Scorpiones e estão geograficamente distribuídos em todos os continentes, exceto na Antártida, sendo mais encontrados em áreas tropicais e subtropicais e, muitas vezes, próximos a habitações (LOURENÇO, 2001; LOURENÇO *et al.*, 2004; BARNES, 2005).

Nas Américas, ocorrem desde o oeste do Canadá até a Patagônia; na região Paleártica estão distribuídos desde a Europa Ocidental até a Rússia e China. Estão presentes em todas as zonas tropicais do mundo e, recentemente, foram introduzidos na Nova Zelândia (LOURENÇO, 1988; SISSOM, 1990; LOURENÇO, 2001; LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).

Estão distribuídos em 21 famílias, sendo uma delas fóssil do cretáceo inferior e são conhecidas cerca de 1500 espécies desses artrópodes (LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).

Todas as espécies de escorpiões consideradas perigosas para o homem e conhecidas como de importância médica pertencem à família Buthidae, amplamente distribuída pelo mundo em todos os continentes colonizados pela ordem, além de ser a maior em número de gêneros e espécies, com aproximadamente 80 e 550, respectivamente. No entanto, do total de espécies deste gênero apenas 25 estão relacionadas a acidentes graves em humanos (LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).

A escorpiofauna brasileira é representada por 4 famílias, 15 gêneros e 86 espécies. A família Buthidae é representada por 5 gêneros: *Isometrus* (1 espécie), *Ananteris* (9 espécies), *Microtityus* (1 espécie), *Rhopalurus* (8 espécies) e *Tityus* (31 espécies ou 37, considerando-se as espécies polimórficas). O último gênero citado é o principal responsável pelos casos de escorpionismo grave em humanos e o maior em número de espécies (CUPO, AZEVEDO-MARQUES & HERING, 2009; LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).

Os escorpiões são animais geralmente discretos e noturnos, escondendo-se durante o dia sob troncos de árvores, pedras e fendas de rochas, buracos no solo, entulhos, esgotos ou quaisquer locais onde exista farta alimentação, a qual é composta principalmente por insetos como as baratas. No entanto, existem espécies associadas à vegetação, mesmo a árvores (BARNES, 2005; MELO *et al.*, 2004).

A maioria das espécies de escorpiões é incluída na categoria de especialista, com padrões ecológicos e biogeográficos previsíveis e localizados; exigências muito específicas tanto em relação ao habitat e micro-habitat, quanto em relação às condições do meio ambiente. Bons exemplos de escorpiões especialistas são as espécies do gênero *Rhopalurus* que vivem exclusivamente em formações vegetais abertas (LOURENÇO E EICKSTEDT, 2009).

No entanto, uma pequena parcela do total de espécies de escorpiões é incluída na categoria de oportunista ou generalista, apresentando uma alta plasticidade, capacidade de dispersão e padrões irregulares de distribuição geográfica. Um bom exemplo de escorpião pertencente a esta categoria é a espécie *T. serrulatus*, encontrada em ambientes perturbados ou modificados pela ação do homem, principalmente em ambiente urbano (LOURENÇO E EICKSTEDT, 2009).

A reprodução destes animais pode ser sexuada, com fecundação interna, mas sem copulação verdadeira e, neste caso, o macho deposita o espermátóforo em um substrato e conduz a fêmea a este local depositado para que ocorra a transferência do espermatozóide e posteriormente a fecundação. Este tipo de reprodução ocorre, por exemplo, com *T. fasciolatus*, que possui dimorfismo sexual. No entanto, em *T. serrulatus*, a reprodução é assexuada, por partenogênese, porém, há registros de machos no Estado de Minas Gerais (LOURENÇO *et al.*, 1996; LOURENÇO & CLOUDSLEY-THOMPSON, 1999; MELO *et al.*, 2004).

Os escorpiões são vivíparos e o período de gestação depende da espécie, podendo variar de 2 a 18 meses e cada fêmea pode gerar de 6 a 90 filhotes por parição que ocorre durante todo o ano, ou sazonalmente a depender da espécie e de sua distribuição geográfica. Estes animais vivem até cinco anos (LOURENÇO *et al.*, 1996; MELO *et al.*, 2004).

Geralmente, as espécies especialistas produzem uma única prole após cada processo de inseminação e não possuem nenhum mecanismo para estocagem de esperma e, conseqüentemente, possuem uma reduzida densidade populacional e dispersão de indivíduos (LOURENÇO, 1991).

As espécies oportunistas ou generalistas apresentam curtos períodos de desenvolvimento embrionário e pós-embrionário e costumam produzir várias proles com uma única inseminação, pois possuem mecanismos elaborados para estocagem do esperma que servirá durante toda a vida reprodutiva da fêmea. Como conseqüência, essas espécies apresentam expressivas densidades populacionais, padrões ecológicos e de distribuição geográfica aleatórios (KOVOOR *et al.*, 1987; LOURENÇO, 1991).

Assim como todos os componentes do filo Arthropoda, os escorpiões possuem um exoesqueleto rico em uma substância denominada quitina que recobre todo o seu corpo. Eles movimentam-se graças a placas, que são divisões da cutícula, conectadas por uma membrana delgada e flexível permitindo assim os movimentos dos apêndices do corpo através dessas articulações (HICKMAN *et al.*, 2004).

A cutícula dos escorpiões é fluorescente a luz ultravioleta e, com uma lanterna especial, é possível em uma noite escura, localizar um exemplar que se encontra, a até 15 m de distância. Durante a vida, os escorpiões trocam periodicamente a cutícula que lhes envolve o corpo, processo que permite o seu crescimento e adaptações ao ambiente (SISSOM *et al.*, 1990).

Os escorpiões são aracnídeos que, em geral, medem de 3 a 9 cm de comprimento. A espécie *Typhlochactas mitchelli* é considerada a menor com cerca de 9 mm de comprimento e a espécie africana *Hadogenes troglodytes*, que atinge 21 cm, é considerada a maior (BARNES, 2005).

Possuem o corpo dividido em duas partes: cefalotórax (prossoma) e abdômen (opistosoma). Seu abdômen é dividido em 12 metâmeros, sendo os sete primeiros componentes do messosoma (ou pré-abdômen) e os 5 últimos compondo o metassoma (cauda). Após o último segmento da cauda encontra-se o télson, que contém um par de glândulas produtoras de peçonha e um acúleo (agulhão) onde, perto do ápice, abrem-se dois orifícios através dos quais a peçonha é inoculada (FIGURAS 1 e 3) (CANDIDO, 1999; BARNES, 2005; LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).

Apresentam também seis pares de apêndices conectados ao prossoma: 1) um par de quelíceras, estrutura de grande importância na alimentação; 2) um par de pedipalpos, cujos artículos terminais formam as mãos com um dedo fixo e um dedo móvel (usado como pinças para apreender as presas e durante o acasalamento pelos machos para segurar as fêmeas), onde estão localizadas as tricobótrias, que são pêlos sensoriais utilizados na detecção e captura de presas) quatro pares de pernas com sete segmentos, bastante importantes na locomoção desses animais (FIGURA 1-A) (CANDIDO, 1999; BARNES, 2005; LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).

No dorso, o prossoma é recoberto pela placa prossomial, que contém dois olhos medianos e, em geral, dois a cinco pares de olhos laterais, muito sensíveis a luz, o que pode ser útil na orientação desses animais. Nos esternitos III a VI do mesossoma existem quatro pares de aberturas respiratórias conhecidas como estigmas pulmonares (FIGURA 1-B) (LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).

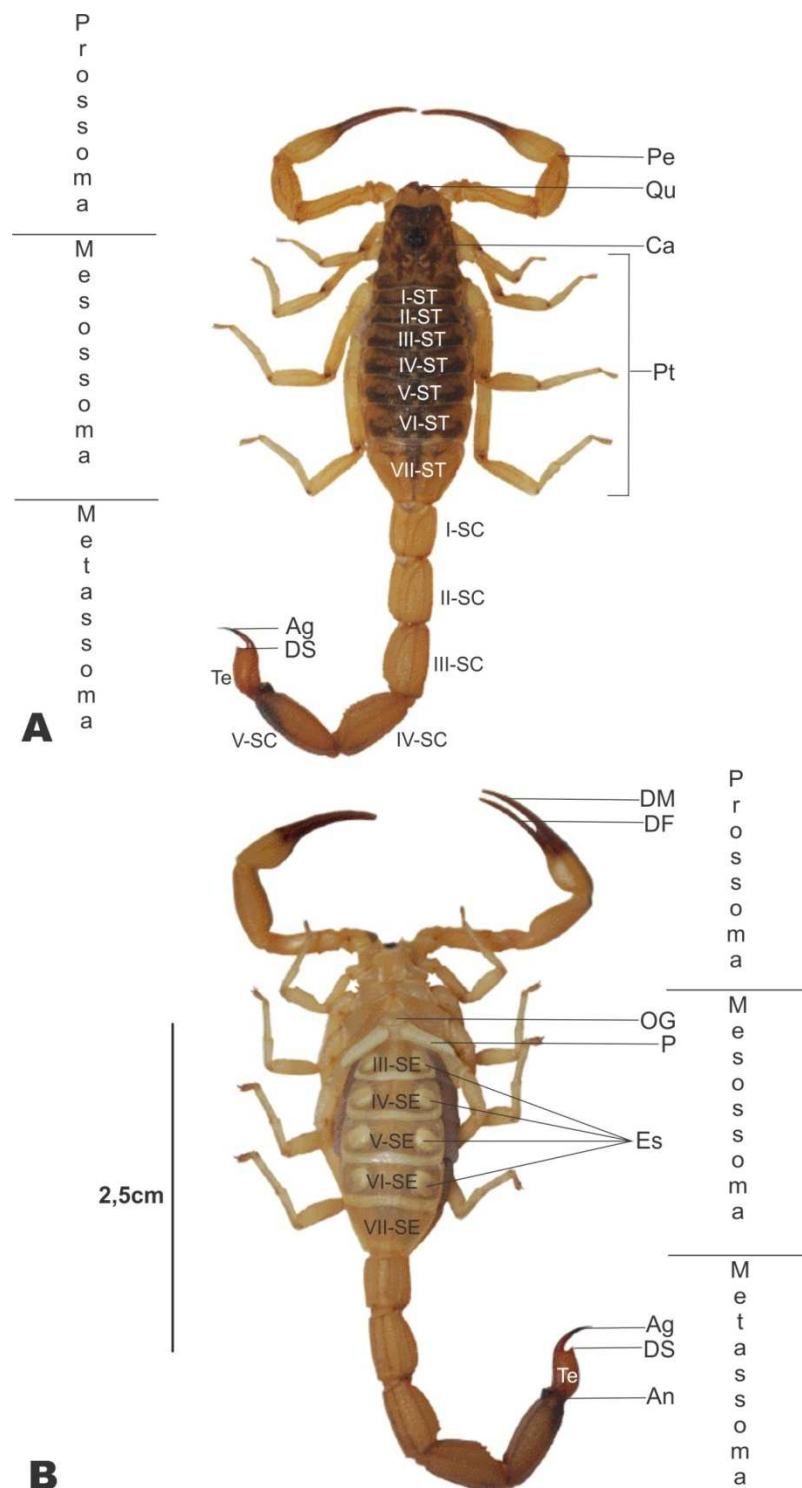


Figura 1: Morfologia externa geral do escorpião *T. serrulatus* proveniente do Distrito Federal. Em (A) vista dorsal (Pe: Pedipalpos, Qu: Quelíceras, Ca: Carapaça, Pt: Patas, I-ST a VII-ST: Seguimentos Tergais, I a V-SC: Segmentos Caudais, Te: Telson, DS: Dente Subacular, Ag: Aguilhão). Em (B) vista ventral (DM: Dedo Móvel, DF: Dedo fixo, OG: Opérculo Genital, P: Pente, III a VII- SE: Segmentos Externais).

Foto: Solange Rego. **Adaptado:** Flórez (2007).

No ventre, entre as coxas das pernas três e quatro, existe uma estrutura ímpar chamada esterno, que tem importância no reconhecimento das famílias. Na parte ventral no prossoma são localizados: 1) o orifício genital masculino ou feminino que é coberto por um opérculo; 2) um par de pentes, apêndices exclusivos dos escorpiões, que constituem um órgão sensorial, mecano- e quimiorreceptor, amplamente utilizado na identificação de gêneros e espécies (FIGURA 1-B) (LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).

Os escorpiões são incapazes de ouvir e não possuem uma boa visão, orientam-se por vibrações do ar e do solo, e para tal possuem várias cerdas distribuídas ao longo do corpo (HICKMAN, 2004; BARNES, 2005).

1.2 O GÊNERO *TITYUS*

Os escorpiões deste gênero pertencem à família Buthidae e são os mais importantes do ponto de vista médico no Brasil.

Segundo Lourenço e Eickstedt (2009), há ocorrência de quase 30 espécies deste gênero no país, porém, os principais responsáveis por causar acidentes em humanos são: 1) As espécies do complexo *T. stigmurus* que incluem os escorpiões atualmente identificados como *T. stigmurus* Thorell, 1876; *T. serrulatus* Lutz e Mello, 1922 e *T. lamottei* Lourenço, 1981; além de algumas formas ainda não nominadas e frequentemente confundidas com as espécies citadas anteriormente; 2) As espécies polimórficas *T. bahienses* Perty, 1834 e *T. costatus* Karsch, 1879; 3) *T. trivitattus* Kraepelin, 1898; *T. metuendus* Pocock, 1897; *T. brazilae* Lourenço & Eickstedt, 1984; *T. neglectus* Mello-Leitão, 1932; *T. matogrossensis* Boreli, 1901 e *T. fasciolatus* Pessôa, 1935 (LOURENÇO & CLOUDSLEY-THONPSON, 1999).

No entanto, de todas as espécies citadas acima, as mais importantes do ponto de vista médico no país são *T. serrulatus*, *T. bahienses* e *T. stigmurus* (BRASIL-MS, 2001, 2009).

Os escorpiões da espécie *T. serrulatus* medem entre 6 e 7 cm na idade adulta e são popularmente conhecidos como escorpião amarelo, graças ao seu colorido em geral amarelado ou marrom-escuro, com manchas mais escuras confluentes no tronco (FIGURA 2); possuem também a face ventral do último artigo da calda enegrecido nos dois terços apicais. Possuem cristas dorsais no quarto segmento caudal com 3 a 5 dentes maiores, formando uma serrilha (FIGURA 3), o que justifica a nomenclatura dada a essa espécie (SILVA *et. al.*, 2005; LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).



Figura 2: *Tityus serrulatus* Lutz & Melo, 1922 (escorpião amarelo), procedente de Brasília – DF.

T. serrulatus é uma espécie endêmica e muito freqüente no Brasil, com ocorrência nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Rondônia, Paraná e em Goiás, onde foi registrada uma epidemia urbana dessa espécie, além do registro de grande ocorrência no Distrito Federal, onde provavelmente foi introduzida na década de 70 (BARRAVIERA, 1995; ANDRADE e PASQUALETTO, 2002; MOTTA, 2006; LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).



Figura 3: Metassoma de *Tityus serrulatus* Lutz & Melo, 1922 (Escorpião Amarelo), procedente de Brasília – DF, com detalhe das cristas dorsais (serrilha) no 4º segmento e o télson com o acúleo (agulhão) no último segmento.

A espécie *T. serrulatus* originalmente vivia em ambientes de mata de transição, florestas secas, cerrados e caatinga (LOURENÇO *et al.*, 1996; CLOUDSLEY-THOMPSON, 1999). Atualmente, tem habitado locais com um mínimo de vegetação e se proliferado amplamente em zona urbana, por ser comprovadamente partenogenética e ecologicamente oportunista, invasora, colonizadora, dominante, de grande aptidão dispersiva, com alta capacidade reprodutiva, sendo necessário apenas um indivíduo para iniciar uma população (LOURENÇO *et al.*, 1996; BRAZIL *et al.*, 2009).

Cada fêmea desta espécie atinge a maturidade sexual entre 2 e 2,5 anos e tem aproximadamente dois partos por ano. O desenvolvimento embrionário destes animais varia de 2,5 a 3 meses, tendo em média de 16 a 20 filhotes, podendo chegar a 160 filhotes durante a vida (LOURENÇO, 2000; BRASIL - MS, 2009).

Do ponto de vista médico, é a espécie de escorpião mais importante no Brasil, pois é a que causa maior número de acidentes e que gera os mais graves empeçonhamentos (BRASIL - MS, 2001), além de ser considerada a mais perigosa da América do Sul devido à alta toxicidade da sua peçonha (TORRES *et al.*, 2002).

De acordo com Horta *et al.* (2007), de 325 acidentes escorpiônicos estudados em crianças e adolescentes, ocorridos no período de 1996 a 2005 no município de

Montes Claros - MG, 5 foram a óbito mesmo após o tratamento específico com soroterapia. De acordo com os mesmo autores, a pesquisa não permitiu a identificação da espécie de escorpião causadora desses acidentes. No entanto, outros estudos já apontaram que as espécies mais comuns na região Sudeste são *T. bahiensis* e *T. serrulatus*, e esta última está associada a casos graves e letais em seres humanos, principalmente em crianças abaixo de 6 anos e idosos acima de 65 anos.

A segunda mais importante espécie de escorpião do ponto vista médico é a *T. bahiensis*, identificada como escorpião marrom, graças ao seu colorido marrom escuro ou avermelhado com manchas nos palpos e nas pernas. Os exemplares adultos atingem cerca de 7 cm. Ocorrem em Minas Gerais, sul de Goiás, São Paulo, região oeste do Estado do Paraná e provavelmente em Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (BARRAVIERA, 1995; ANDRADE e PASQUALETTO, 2002; MOTTA, 2006; LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).

Nesta espécie, o macho é diferenciado por possuir pedipalpos volumosos com um vão arredondado entre os dedos, utilizado para conter a fêmea durante a “dança nupcial” que culmina com a liberação do espermatóforo no solo e a fecundação da fêmea. Assim como a espécie *T. serrulatus*, esta tem aproximadamente dois partos com 20 filhotes em média cada, por ano, podendo chegar a 160 filhotes durante a vida (BRASIL – MS, 2009).

Por fim, a terceira mais importante espécie do ponto de vista médico é a *T. stigmurus*, principal causadora de acidentes em humanos na região Nordeste do país. É bastante semelhante a *T. serrulatus* por possuir um colorido amarelado, porém, algumas características facilitam a sua diferenciação de *T. stigmurus*, como a presença no mesossoma de uma faixa longitudinal de manchas escuras na região mediana, além da presença de um triângulo escuro de vértice posterior localizado no cefalotórax (BRASIL - MS, 2009; LOURENÇO & EICKSTEDT, 2009).

A espécie *T. stigmurus* pode ser considerada endêmica da região Nordeste do Brasil, pois há registros de ocorrência em todos os Estados dessa região, com exceção do Maranhão. No entanto, também foi registrada essa espécie no norte de Minas Gerais. Assim como *T. serrulatus*, *T. stigmurus* também é considerada

altamente adaptativa a ambientes urbanizados e modificados pelo homem (BRAZIL *et. al.*, 2009)

1.3 PEÇONHA ESCORPIÔNICA

Os escorpiões são animais predadores que produzem peçonha e a utilizam para paralisar e matar sua presa e também para defender-se de outros predadores e organismos patogênicos (PETRICEVICH, 2010; HEINEN & VEIGA, 2011).

A peçonha escorpiônica apresenta constituição bastante variada, composta por sais inorgânicos, mucopolissacarídeos, hialuronidases, fosfolipases, inibidores de proteases, moléculas de baixo peso molecular, tais como as aminas biogênicas, nucleotídeos, lipídios, peptídeos e proteínas (BOFF, 1999; POSSANI *et al.*, 2000; PETRICEVICH, 2010; HEINEN & VEIGA, 2011).

Os peptídeos neurotóxicos presentes na peçonha de escorpiões são os principais responsáveis pela maioria dos sinais e sintomas apresentados nas intoxicações e são classificados segundo suas características estruturais e efeitos fisiológicos. Desta forma, são descritas quatro grandes classes de acordo com a sua especificidade de ligação aos canais iônicos: 1) Toxinas moduladoras de canais seletivos a Na^+ , 2) Toxinas bloqueadoras de canais seletivos a K^+ , 3) Toxinas que se ligam em canais para Cl^- e 4) Toxinas que se ligam em canais para Ca^{+2} (DHAWAN *et al.*, 2002; RODRIGUEZ DE LA VEGA *et al.*, 2003; RODRIGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2005; MENDES, 2007).

Geralmente, os peptídeos que atuam nos canais para K^+ e Cl^- são peptídeos de cadeia curta (até 40 resíduos de aminoácidos). Já as toxinas que modulam os canais seletivos para Na^+ são peptídeos de cadeia longa (60-70 resíduos de aminoácidos, estabilizados por 3 ou 4 pontes dissulfeto) (RODRIGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2005). As toxinas que bloqueiam canais para Ca^{2+} são bastante heterogêneas, podendo ser de cadeia longa ou curta (FAJLOUN *et al.*, 2000; MOSBAH *et al.*, 2000; OLAMENDI-PORTUGAL *et al.*, 2002).

1.3.1 Canais de Na⁺ e Toxinas Moduladoras de Canais Para Na⁺

Os canais para Na⁺ voltagem-dependentes (Na_v) são proteínas transmembrânicas que funcionam como porta de entrada para a permeabilidade seletiva a este íon através das membranas biológicas, sendo de fundamental importância para a geração e propagação do potencial de ação nos neurônios e células excitáveis (YU & CATERRAL, 2003; CATERRAL *et al.*, 2005).

Os Na_v consistem de um poro principal formado por uma subunidade α de aproximadamente 260 kDa, que contém o sensor de voltagem. Dependendo do tecido e da espécie, esta proteína pode estar associada a quatro subunidades β de aproximadamente 30 a 40 kDa. Foram identificadas nove isoformas de subunidades α (Na_v 1.1 – Na_v 1.9). As subunidades α são compostas por quatro domínios homólogos (I-IV) e cada um deles contém seis regiões transmembrânicas em α hélice (S1 a S6) (RANDALL *et al.*, 2001; CATERRAL, 2003; CATERRAL *et al.*, 2005).

Os canais Na_v são cruciais para a atividade celular e são alvos moleculares para uma gama de neurotoxinas que atuam em seis ou mais distintos locais do canal, alterando significativamente a sua função (CESTÉLE & CATERRAL, 2000).

As toxinas de escorpião que agem em sítios específicos dos canais para Na⁺ são divididas em duas grandes famílias, α -toxinas e β -toxinas, baseando-se no papel fisiológico que elas desempenham na abertura do canal e são as principais responsáveis pelos efeitos tóxicos apresentados no envenenamento escorpionic (RODRIGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2005).

As α -toxinas podem ser subdivididas em três grupos, de acordo com sua potência em canais de mamíferos e insetos e sua afinidade pelos subtipos de canais Na_v: 1) α -toxinas-clássicas, que apresentam maior atividade aos canais de mamíferos; 2) Inseticidas, com atividade em canais de insetos e 3) α -like, que atuam tanto em canais de insetos como de mamíferos (GOUDET *et al.*, 2002).

O principal efeito fisiológico das α -toxinas é o prolongamento do potencial de ação dos nervos e músculos (PETRICEVICH, 2010).

Já as β -toxinas podem ser divididas em três grupos: 1) clássicas (ativas em canais de mamíferos); 2) depressoras (ativas em canais de insetos, induzindo uma lenta depressão e uma paralisia flácida precedida por uma fase de contratura); 3) excitatórias (também ativas em canais de insetos, induzindo uma rápida paralisia rígida) (GOUDET *et al.*, 2002; RODRIGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2005).

As α -toxinas diferenciam-se das β -toxinas por agirem em sítios diferentes dos canais para Na^+ . As primeiras se ligam no sítio três (no domínio IV) da subunidade α , retardando a inativação do canal e, com isso, prolongando a fase de abertura do canal aumentando a condutância ao íon Na^+ , enquanto que as β -toxinas se ligam ao sítio quatro (no domínio II) e deslocam a voltagem de ativação desses canais a valores mais negativos, diminuindo o limiar de excitabilidade para abertura dos canais para Na^+ (CESTÉLE & CATERRALL, 2000; RODRIGUEZ DE LA VEGA *et al.*, 2005).

As toxinas que atuam em canais Na_v são abundantes na peçonha de escorpiões. Até o momento, foram reportadas na base de dados pública UniProtKB 239 toxinas isoladas da peçonha de escorpião com possível capacidade de alterarem a função desses canais, porém, nem todas tiveram suas atividades testadas experimentalmente (UniProtKB, 24 de janeiro de 2011).

Algumas toxinas já foram isoladas da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus* com capacidade de alterarem a função dos canais para Na^+ (TABELA 1).

1.3.2 Canais de K^+ e Toxinas Bloqueadoras de Canais Para K^+

Os canais seletivos a K^+ são encontrados praticamente em todos os tecidos e células e fazem parte de uma grande variedade de processos biológicos. Além disso, eles estão envolvidos em um crescente número de patologias humanas, o que tem levado muitos pesquisadores a se interessar por estes canais e por moléculas capazes de alterar de alguma forma o funcionamento dos mesmos (SHIEH *et al.*, 2000).

Diante da importância do exposto, foi proposto por Beeton *et al.* (2001) o papel crucial dos canais Kv1.3 na patogênese da esclerose múltipla e outras doenças auto-imunes. Outros estudos têm demonstrado que inibidores seletivos para Kv1.3 podem representar um potencial terapêutico no tratamento de doenças, como diabetes tipo 1, além disso, a seletividade dos bloqueadores de canais para K⁺ pode ser considerada um potencial no tratamento do câncer (LEWIS e GARCIA, 2003).

O canal seletivo a K⁺ é um complexo oligomérico de quatro subunidades α com massa molecular de aproximadamente 70 kDa, constituídas por seis regiões transmembrânicas, arranjadas simetricamente em volta de um poro central, contando ainda com 4 subunidades β a elas associadas (RANDALL *et al.*, 2001).

As toxinas presentes na peçonha de escorpião tem se mostrado excelentes ferramentas no estudo dos canais seletivos a K⁺, estas toxinas são divididas em quatro famílias (α , β , γ e κ -KTx) (CORONA *et al.*, 2002; DHAWAN *et al.*, 2002., SRINIVASAN *et al.*, 2002; CHAGOT *et al.*, 2005).

Tabela 1: Estrutura primária de Na-toxinas isoladas da peçonha de escorpiões brasileiros do gênero *Tityus*

Código*	Toxina	Sequência						
P15226	Ts1	-KEGYLMDHE	GCKLSCFIRP	SGYCGRECGI	K-KGSSGYC-	-AWPACYCYG	LPNWKVWDR	ATN-KC--
P56611	Tb1	-KEGYLMDHE	GCKLSCFIRP	SGYCGSECKI	K-KGSSGYC-	-AWPACYCYG	LPNWKVWDR	ATN-KC--
P56612	Tst1	-KEGYLMDHE	GCKLSCFIRP	SGYCGRECTL	K-KGSSGYC-	-AWPACYCYG	LPNWKVWDR	ATN-KC--
P68410	Ts2	-KEGYAMDHE	GCKFSCFIRP	AGFCDGYCKT	HLKASSGYC-	-AWPACYCYG	VPDHIKVDY	ATN-KC--
P56609	Tb2	-KEGYAMDHE	GCKFSCFIRP	AGFCDGYCKT	HLKASSGYC-	-AWPACYCYG	VPSNIKVDY	ATN-KC--
P68411	Tst2	-KEGYAMDHE	GCKFSCFIRP	AGFCDGYCKT	HLKASSGYC-	-AWPACYCYG	VPDHIKVDY	ATN-KC--
P60276	Tb2-II	-KEGYAMDHE	GCKFSCFIRP	SGFCDGYCKT	HLKASSGYC-	-AWPACYCYG	VPSNIKVDY	ATN-KC--
P45669	Ts4	GREGYPADSK	GCKITCFLTA	AGYCNTECTL	K-KGSSGYC-	-AWPACYCYG	LPESVKIWT	ETN-KC--
P83435	Tf4	GKEGYPADSK	GCKVTCFFTG	VGYCDTECKL	K-KASSGYC-	-AWPACYCYG	LPDSASVWD	ATN-KC--
O77463	TsNTxP	GREGYPADSK	GCKITCFLTA	AGYCNTECTL	K-KGSSGYC-	-AWPACYCYG	LPDSVKIWT	ETN-KCG-
P60275	TbIT-I	GKEGYPVDSR	GCKVTCFFTG	AGYCDKECKL	K-KASSGYC-	-AWPACYCYG	LPDSVPVYD	ASN-KCB-
Q5G8B8	Tco	-KEGYAMDHE	GCKLSCFIRP	SGYCGRECGY	K-KGSSGYC-	-AWPACYCYG	LPNWKVWER	ATN-RC--
P60213	Tc48b	-KDGylvgnd	GCKYNCLTRP	GHYCANECsr	V-KGKDGyCY	-AWMACyCYs	MPDWKtWsr	STN-RCGR
P60214	Tc49b	-KEGYLVGND	GCKYGCITRP	HQYCVHECEL	K-KGTDGYCA	-YWLACyCYN	MPDWKtWss	ATN-KC--
P60212	Tc48a	NKDGylMEGD	GCKMGCLTRK	ASYCVDQCKE	V-GGKDGyCY	-AWLSCyCYN	MPDSVEIWD	KNN-KCGK
P01496	Ts3	KKDGYPVEYD	NcAYICWNYD	NAYCDKLCKD	K-KADSGyCY	WVHILCYCYG	LPD---SEPT	KTNGKCKS
P56608	Tb3	KKDGYPVEAD	NcAFVCFGYD	NAYCDKLCGD	K-KADSGyCY	WVHILCYCYG	LPD---NEPT	KTNGKc--
P46115	Ts5	KKDGYPVEGD	NcAFACFGYD	NAYCDKLCKD	K-KADDGyCV	W-SPDCyCYG	LPEHILKEPT	KTSGRC--

Adaptado de Possani *et al.*, (2010) *Código de acesso no UniProtKb. Ts para *T. serrulatus*; Tb para *T. bahiensis*; Tf para *T. fasciolatus*; Tc para *T. cambridgei*; Tco para *T. costatus*.

As toxinas pertencentes à subfamília α -KTx possuem de 22 a 42 resíduos de aminoácidos estabilizados por quatro pontes de sulfeto e afetam principalmente os canais de K^+ dependentes de voltagem do tipo *Shaker* e *ether-a-go-go*, bem como canais de K^+ ativados por cálcio (ZHU *et al.*, 2010; POSSANI *et al.*, 2010). Na Tabela 2, temos algumas α -KTx isoladas da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus*.

Tabela 2: Estrutura primária de K-toxinas da subfamília α -KTx isoladas da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus*

Código*	Toxina	Sequência
P46114	(α -KTx 4.1, Ts)	VFINAKCRGS PECLPKCKEA IGKAAGKCMN GKCKCYP
P56219	(α -KTx 4.2, Ts)	VVIGQRCYRS PDCYSACKKL VGKATGKCTN GRDCD
P59925	(α -KTx 4.3, Td)	VFINVKCTGS KQCLPACKAA VGKAAGKCMN GKCKCYT
P60210	(α -KTx 4.4, Tca)	VFINVKCRGS KECLPACKAA VGKAAGKCMN GKCKCYP
Q5G8B6	(α -KTx 4.5, Tco)	VFINVKCRGS PECLPKCKEA IGKSAGKCMN GKCKCYP
P59936	(α -KTx 12.1, Ts)	WCSTCLDLAC GASRECYDPC FKAFGRAHGK CMNNKCRCYT
P0C168	(α -KTx 12.2, Tt)	WCSTCLDLAC GASRECYDPC FKAFGRAHGK CMNNKCRCYT
P0C185	(α -KTx 12.3, Tco)	WCSTCLDLEC GASRECYDPC FKAFGRAHGK CMNNKCRCYT
P83243	(α -KTx 13.1, Tca)	ACGSCRKKCK GSGKCINGRC KCY
P84630	(α -KTx 13.3, Tp)	ACGSCRKKCK GPGKCINGRC KCY
P84777	(α -KTx 15.6, Td)	QIDTNVKCSG SSKCVKICID RYNTRGAKCI NGRCTCYP
P60211	(α -KTx 18.1, Tca)	-TGPQTTCQA AMCEAGCKGL GKSMESCQGD TCKCKA
P0C1X5	(α -KTx 18.2, Td)	-TGPQTTCQA STCEAGCKQI GKSMKSCQGD TCECA
P0C1X6	(α -KTx 18.3, Td)	GEGPKSDCKP DLCEAACKDL GKPMDFCKDG TCKCKD
P0C183	(α -KTx 20.1, Tt)	GCTPEYCSMW CKVKVSQNYC VKNCKCPGR

Adaptado de Possani *et al.*, (2010). *Código de acesso no UniProtKb. Ts para *T. serrulatus*; Td para *T. discrepans*; Tca para *T. cambridgei*; Tco para *T. costatus*; Tt para *T. trivittatus*; Tp para *T. pachyurus*.

Existem algumas toxinas descritas da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus* com ação em canais para K^+ pertencentes à subfamília β -kTx (TABELA 3) (POSSANI *et al.*, 2010).

Até o momento, foram reportadas na base de dados pública, UniProtKB, 167 toxinas encontradas na peçonha de escorpiões com possível ação em canais para K^+ , porém, nem todas tiveram suas atividades testadas experimentalmente (UniProtKB, 24 de janeiro de 2011).

Tabela 3: Estrutura primária de K-toxinas da subfamília β -KTx isoladas da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus*

Código*	Nome	Sequência
P69940	Ts	KLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNDCNDIERKDGECHGFKCKCAKD
Q5G8A6	Tco	GLREKHVQKLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNHCQDIERKDGECHGFKCKCAKD
Q0GY44	Td	KLVTLIPNDTLRSIMKTIVHKLAKTQFGCPAYEGYCMNHCQDIERHDGSGHGFCKCKCEKS
P0C2F3	Tst	KLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNDCNDIERKDGECHGFKCKCAKD
Q0GY46	Tt	KLVALIPNDTVRSILKAVVHKAATQFGCPAYEGYCNHCQDIKRKDGXCXGFKCKCAKDFKCKCAKD

Adaptado de Possani *et al.*, (2010). *Código de acesso UniProtKb. Ts para *T. serrulatus*; Td para *T. discrepans*; Tco para *T. costatus*; Tt para *T. trivittatus*; Tst para *T. stigmurus*.

1.3.3 Canais Para Cl^- e Toxinas que se Ligam a Esses Canais

Pouco se conhece a respeito dos canais para cloreto e o estudo de toxinas que se ligam a estes tem sido considerado uma excelente ferramenta para um melhor conhecimento do seu funcionamento.

Até o momento, foram reportadas no UniProtKB apenas 3 toxinas de peçonha de escorpião que tiveram suas atividades testadas e que demonstraram capacidade de se ligarem aos canais para cloreto e assim afetarem o seu funcionamento fisiológico, no entanto, algumas toxinas tem sido descritas com prováveis ação nesses canais, porém baseada apenas em identidade com as demais toxinas testadas (UniProtKB, 24 de janeiro de 2011).

Provavelmente, o baixo número de toxinas com ação nos canais para cloreto seja conseqüência do pouco conhecimento do funcionamento desses canais assim como da menor abundância de “clorotoxinas” nas peçonhas de escorpião, quando comparada aos peptídeos que atuam em canais para Na⁺ e K⁺.

Da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus* foi isolada a clorotoxina, que bloqueia de forma reversível canais para cloreto do epitélio de camundongos (ZHIJIAN *et al.*, 2006).

Foi purificada e seqüenciada da peçonha do escorpião *Buthus martensi* Karsch uma neurotoxina de inseto de cadeia curta, com 35 resíduos de aminoácidos e 4 pontes de sulfeto, chamada de Bm-12, que apresentou-se bastante similar à clorotoxina (ESCOUBAS *et al.*, 1996).

Fu e colaboradores (2007) descreveram na peçonha de *Buthus martensi* a toxina rBmK Cta, que apresenta 68% de identidade com a clorotoxina de *Leiurus quinquestriatus*, porém sua atividade nesses canais não foi testada.

Foi isolada da peçonha de *Leiurus hebraeus quinquestriatus*, por Thompson e colaboradores (2009), um peptídeo que recebeu o nome de GaTx2, capaz de atuar na proteína CIC-2 dos canais de cloreto inibindo-os. A alta especificidade e afinidade (Kd de 20 pM) exibida por esta toxina tornou-a uma importante ferramenta farmacológica no estudo desses canais, o que servirá para melhor conhecê-los.

Recentemente, Rjeibi e colaboradores (2011) isolaram da peçonha do escorpião *Androctonus australis* um peptídeo com 70% de similaridade com a clorotoxina de *Leiurus quinquestriatus*. Esse peptídeo recebeu o nome de AaCtx e apresentou atividade na invasão e migração de glioma humano, porém, com menor atividade do que a encontrada para a clorotoxina.

1.3.4 Canais Para Ca^{2+} e Toxinas que se Ligam a Esses Canais

Os canais para Ca^{2+} são bastante semelhantes aos canais para Na^+ e são formados por uma subunidade α_1 com 4 domínios, com 6 segmentos transmembrânicos e pequenas subunidades chamadas α_2 , β , γ , δ . Esses canais possuem massa molecular de aproximadamente 212-250 kDa e são bastante importantes na condução do sinal elétrico, na despolarização da membrana celular, na contração, secreção, neurotransmissão e em outros mecanismos (CATTERRAL, 2007).

Estudos demonstram que as toxinas escorpiônicas são capazes de se ligarem nos canais para Ca^{2+} alterando assim a sua função. Até o momento foram reportadas no banco de dados público UniProtKB, 51 toxinas identificadas das peçonhas de escorpiões capazes de alterar as funções fisiológicas desses canais iônicos. Até o momento, não há descrição de toxinas para o gênero *Tityus* que atuem em canais para Ca^{2+} (UniProtKB, 24 de janeiro 2011).

1.3.5 Peptídeos sem pontes dissulfeto

Vários pesquisadores têm demonstrado grande interesse por peptídeos sem pontes dissulfeto isolados da peçonha de escorpiões, que podem apresentar atividades antimicrobiana, imunomoduladora, potencializadora de bradicinina ou hemolítica (ZENG *et al.*, 2005).

Os peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) possuem baixa massa molecular e são capazes de potencializar os efeitos farmacológicos da bradicinina, normalmente inibindo a enzima conversora de angiotensina (ECA) que é uma enzima crucial para a regulação da pressão arterial (VERANO-BRAGA *et al.*, 2010).

A toxina TsHpt-I (Hipotensina I) foi isolada da peçonha de *T. serrulatus*, possui 25 resíduos de aminoácidos e é um exemplo de potencializador de bradicinina (BPP) (VERANO- BRAGA *et al.*, 2008).

1.4 PEÇONHA DE *Tityus serrulatus*

A peçonha do escorpião brasileiro *T. serrulatus* tem sido amplamente investigada e foi fracionada pela primeira vez por Gomez e Diniz (1966), de onde foi obtida a “Tityustoxin” (“TsTX”), que por muito tempo acreditou-se tratar de uma fração homogênea, tendo sido amplamente utilizada em ensaios biológicos (DINIZ, 1978; FREIRE-MAIA, 1995). Entretanto, a Tityustoxina compreende, na realidade, uma mistura de diversos peptídeos (ARANTES *et al.*, 1992).

Toledo e Neves (1976) purificaram e caracterizaram parcialmente da peçonha de *T. serrulatus* uma toxina que recebeu o nome de Tityustoxin-I (TsTX-1), tendo sido o primeiro peptídeo isolado e descrito da peçonha de *T. serrulatus*. Trata-se de uma toxina bastante abundante na peçonha desta espécie, representando cerca de 15 % do total da peçonha (PESSINI *et al.*, 2001). Posteriormente, estudos eletrofisiológicos mostraram que se tratava de uma toxina capaz de alterar a função fisiológica dos canais Na_v (BARHANING *et al.*, 1982, 1984; JONAS *et al.*, 1986) e foi verificado a sua importância na gravidade do envenenamento, pois esta toxina possui uma DL₅₀ de 76 µg / kg e induz intensa liberação de catecolaminas e indiretamente alguns graves sintomas do escorpionismo, como o aumento na pressão arterial (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Sampaio e colaboradores (1991) caracterizaram da peçonha de *T. serrulatus* a toxina T1IV (TsTXIII), considerada uma β-toxina com 62 resíduos de aminoácidos e que apresenta 72% de identidade com TsTX-1.

Uma toxina pertencente à classe das β-toxinas foi caracterizada por Becerril e colaboradores (1993) e recebeu o nome de Toxina gama (Tsy), tornando-se muito importante nos estudos dos canais para Na⁺ sensíveis a voltagem e que tem sido alvo de inúmeras investigações por apresentar toxicidade para mamíferos e insetos.

Desde então, vários peptídeos foram descritos da peçonha de *T. serrulatus*, porém, devido à falta de uniformidade na nomenclatura adotada pelos pesquisadores, nomes diferentes foram atribuídos para uma mesma toxina, assim como um mesmo nome foi adotado para toxinas diferentes.

Diante disso, Cologna e colaboradores (2009) propuseram a nomenclatura que adota duas letras (a primeira do gênero e a segunda da espécie) seguidas do número do peptídeo (ordem cronológica de descrição) para os peptídeos de *T. serrulatus*.

Os peptídeos mais estudados presentes na peçonha deste escorpião são, sem dúvida, as toxinas de cadeia relativamente longa, contendo 60-70 resíduos de aminoácidos, estabilizada por quatro pontes dissulfeto e que possuem ação em canais Na_v . Na peçonha do escorpião *T. serrulatus* foram descritas e caracterizadas seis toxinas com provável ação em canais Na_v (MANSUELLE *et al.*, 1992; MARTIN-EAUCLAIRE *et al.*, 1992, 1994; BECERRIL *et al.*, 1993; MARANGONI *et al.*, 1995; CORONA *et al.*, 1996; POKARPO *et al.*, 1999; PINHEIRO *et al.*, 2003).

Algumas toxinas de cadeia relativamente curta, compostas por 30-42 resíduos de aminoácidos, estabilizadas por três pontes dissulfeto e ativas principalmente em canais para K^+ também tem sido descritas e algumas delas tiveram suas atividades nesses canais comprovadas (ROGOWSKI *et al.*, 1994; MARANGONI *et al.*, 1995; LEGROS *et al.*, 1996; BLANC *et al.*, 1997; NOVELLO *et al.*, 1999; ELLIS *et al.*, 2001; PIMENTA *et al.*, 2003; OYAMA JR *et al.*, 2005).

Novello e colaboradores (1999) elucidaram a sequência de aminoácidos da primeira pequena toxina encontrada na peçonha de *T. serrulatus*, chamada de Ts-TX-IV, com 41 resíduos de aminoácidos e com quatro pontes dissulfeto e que posteriormente foi descrita como capaz de alterar a condutância dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} .

Marangoni e colaboradores (1995) descreveram uma toxina do tipo α , denominada TsTx-V, que apresentou ação em canais para K^+ de células β pancreáticas de ratos.

Além desses componentes já citados, a peçonha de *T. serrulatus* contém hialuronidases, enzimas que catalisam a quebra do ácido hialurônico, um polissacarídeo encontrado principalmente na matriz extracelular dos tecidos moles (KREIL, 1995). No entanto, essas enzimas não são tóxicas, mas são consideradas fatores de propagação, facilitando a difusão das toxinas nos tecidos, contribuindo para envenenamentos locais e sistêmicos (PESSINI *et al.*, 2001).

Almeida *et al.* (2002) descreveram enzimas proteolíticas com atividade gelatinolítica por meio de zimografia na peçonha de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*. Foi sugerido por esses mesmos autores que as enzimas descritas se tratavam de serino-proteases e que poderiam aumentar a permeabilidade do tecido facilitando a propagação do veneno.

Diante do exposto, a peçonha de *T. serrulatus* é composta por um vasto leque de substâncias distintas, que, de acordo com Pimenta e colaboradores (2003), chegam a mais de 130 componentes, dentre eles, potentes neurotoxinas, capazes de modificar a função de canais iônicos, além de proteases e hialuronidases que podem agir facilitando a dispersão dessas neurotoxinas durante o envenenamento.

1.5 ESCORPIONISMO

Para Yoshizawa (2002), o reconhecimento da inter dependência do binômio homem – ambiente remota aos filósofos gregos e a partir do século XX, os modelos ecológicos se tornaram mais presentes e estudados na área da saúde, determinando que perturbações deste binômio em uma dada região levariam a agravos à saúde.

De fato, modificações constantes no meio ambiente tendem a modificar o comportamento ecológico e biológico de algumas espécies animais, favorecendo a sinantropia com o homem e resultando no aumento de acidentes, tornando o escorpionismo um sério problema de saúde pública.

Escorpionismo é o quadro clínico apresentado após a picada do escorpião e causado pelos efeitos das toxinas produzidas e inoculadas na vítima, diagnosticado geralmente através de relatos do paciente, da captura do espécime causador do acidente ou mesmo dos sinais e sintomas apresentados pelo indivíduo picado (quando da ausência das duas primeiras situações citadas) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004).

O escorpionismo pode evoluir de um quadro leve, com sintomas de pequena intensidade, a um quadro grave, podendo levar o indivíduo a óbito, principalmente

em crianças e idosos, além de deixar seqüelas que podem impossibilitar os acidentados ao trabalho formal e doméstico (NUNES *et al.*, 2000; NODARI *et al.*, 2006).

O estudo e a preocupação com o escorpionismo não é algo recente no Brasil. Desde 1905, que o renomado Vital Brazil, preocupado com a gravidade de picadas ocasionadas por alguns escorpiões, iniciou testes para produzir um soro com intuito de tratar as pessoas envolvidas nesses acidentes. A ausência de escorpiões para obtenção de peçonha e de um especialista para identificação desses animais atrasou um pouco as pesquisas que só foram retomadas em 1915 por Heitor Maurano, médico e aluno de Vital Brazil, que demonstrou que, tal como ocorria com o soro usado no tratamento de acidentes ofídicos, o soro antiescorpiônico também deveria ser específico (BRAZIL, 1918).

Só em 1918 que Vital Brazil, baseado na sua experiência na elaboração de soros antivenenos e com os resultados obtidos por Maurano, produziu pela primeira vez em ampla escala um soro antiescorpiônico, utilizando-se cavalos como produtores de anticorpos (BRAZIL, 1918).

De acordo com Magalhães (1946), mais de 6.000 acidentes escorpiônicos e 237 óbitos foram registrados no Brasil em 1929, sendo que em todos os óbitos a soroterapia não foi realizada.

A população de escorpiões e, conseqüentemente, a quantidade de acidentes causados por estes animais, principalmente em áreas urbanizadas e antes não habitadas por tais animais, tem aumentado bastante nos últimos anos. Esse aumento está intimamente relacionado à exploração de áreas naturais, extração de madeiras, desmatamentos, atividades agrícolas não mecanizadas, lazer (caça e pesca) e à falta de consciência da população que descarta restos de alimentos nos terrenos baldios favorecendo a proliferação de insetos que servem de atrativo, aumentando a possibilidade de contato do homem com os escorpiões (PENEDO e SCHLINDWEIN, 2004).

O aumento populacional e a dispersão da espécie *T. serrulatus* têm ocorrido em vários ambientes urbanos, o que pode ser justificado pela sua forma de reprodução (partenogenética) que facilita a dispersão, além, de serem considerados

animais oportunistas ou generalistas (LOURENÇO E EICKSTEDT, 2009). Este fato é preocupante, considerando que esta espécie é responsável pela maioria e os mais graves casos de escorpionismo no Brasil (BRASIL-MS, 2001, 2009).

1.5.1 Escorpionismo no Distrito Federal

O Distrito Federal está situado em uma área de cerrado e apresenta uma composição faunística bastante característica, com formações vegetais abertas e que abrigam espécies monomórficas, o que explica a diversidade de espécies de escorpiões que habitam esta região, no entanto, o cerrado brasileiro é um dos biomas que apresenta o maior impacto antrópico e vem perdendo rapidamente as suas áreas naturais (LOURENÇO, 1986; MOTTA, 2006). De fato, no final da década de 50, iniciou-se um processo de devastação ambiental, expansão de área territorial e urbanização em meio ao cerrado para a construção de Brasília e foi na década de 60 que esta cidade foi inaugurada.

De acordo com Lourenço (1975), no início da década de 70, já foram notificados casos de invasão domiciliar e acidentes por escorpiões das espécies *Bothriurus araguayae* e *Tityus fasciolatus* no Distrito Federal. A presença dessas espécies nessa região foi confirmada por meio de intensas coletas que registraram a ocorrência de três espécies nativas de escorpiões (*T. fasciolatus*, *Ananteris balzanii* e *Bothriurus araguayae*), porém este estudo não registrou a presença de *T. serrulatus*.

Provavelmente, em meados da década de 70, o nicho ecológico da espécie autóctone e sexuada *T. fasciolatus*, endêmica do cerrado, começou a ser ocupado gradualmente pela espécie partenogenética *T. serrulatus*, típica do Estado de Minas Gerais, que se expandiu para outras regiões do país, chegando ao Distrito Federal. Esta última espécie habita hoje com maior incidência redes e caixas de esgotos, galerias de água pluviais, o que também já foi verificado em regiões de Minas Gerais e São Paulo (LOURENÇO *et al.*, 1994; SPIRANDELLI-CRUZ, 1995; KNOX, 1997).

Um estudo realizado sobre os acidentes escorpiônicos no Distrito Federal no período compreendido entre 1991 e 2000, verificou que, do total de acidentes notificados no período (n=977), 60,2% foram causados por *T. serrulatus*. Os registros demonstram que ocorreram 51 casos de escorpionismo em 1991, 43 em 1994 e picos de 176 e 121 casos nos anos de 1999 e 2000, respectivamente (YOSHIZAWA, 2002).

Apesar do escorpionismo no Distrito Federal não ser considerado um problema de Saúde Pública, a presença da espécie *T. serrulatus* em área altamente urbanizada, tem sido um alerta para a população, devido ao grande potencial de proliferação dessa espécie.

1.6 EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES ESCORPIÔNICOS

Os órgãos federais responsáveis pela coleta de informações nas unidades de saúde, SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas) e RENACIAT (Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica), analisam, sistematizam, compilam, e divulgam as informações dos acidentes e os dados de prognósticos, difundem informações sobre o tratamento e a prevenção de casos de intoxicações em todo o país, bem como os riscos e a toxicidade de substâncias químicas e biológicas a saúde (BOCHNER e STRUCHINER, 2002).

Um aumento significativo no número de acidentes escorpiônicos e um rápido incremento de casos de envenenamento grave têm sido verificados nos últimos anos no Brasil, demonstrando a relevância que o escorpionismo possui para a saúde pública (BRANDÃO e FRANÇOSO, 2010).

No período compreendido entre 2007 e 2010, foram notificados pelo SINAN 148.718 acidentes escorpiônicos no Brasil, contando apenas com o 1º semestre de 2010, pois os dados referentes ao segundo semestre ainda não foram contabilizados (TABELA 4). Comparando-se os anos de 2008 e 2009, houve um incremento de 9.194 nos acidentes notificados em 2009.

Do total de acidentes escorpiônicos notificados no país em 2007 (37.441) e 2008 (39.261), o SINITOX registrou 18 e 14 óbitos, respectivamente, ocorridos por este agravo (TABELA 5).

De acordo com o SINAN (2010), em 2009 foram notificados, no Brasil, 48.333 casos de picadas de escorpião e, apenas no primeiro semestre de 2010, já foram notificados 23.561 acidentes deste tipo. É importante ressaltar que os acidentes provocados por escorpião vêm liderando o *ranking* em número de acidentes causados por animais peçonhentos, ultrapassando os casos de acidentes com serpentes.

Na região Centro Oeste, foram notificados no decorrer dos últimos quatro anos, 5.543 acidentes escorpiônicos, sendo que, destes, 633 ocorreram no Distrito Federal (TABELA 4). Ainda em relação a essa região do país, entre 2007 e 2008, os envenenamentos por escorpiões levaram a óbito 4 pessoas, todos no estado do Goiás, não havendo ocorrência de óbito para o DF (TABELA 5).

O Sinan do Ministério da Saúde não disponibiliza os dados referentes aos óbitos por acidentes escorpiônicos e os dados disponíveis no Sinitox são referentes apenas aos anos de 2007 e 2008 (TABELA 5).

Tabela 4: Número absoluto de acidentes escorpionicos registrados no Brasil, notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) do Ministério da Saúde por UF de ocorrência e ano do acidente, no período compreendido entre 2007 e 2010 (Apenas 1º semestre)

Região - UF Ocorrência	2007	2008	2009	2010	Total (UF)
Norte					
Rondônia	79	67	72	42	260
Acre	65	81	87	55	288
Amazonas	126	185	264	102	677
Roraima	32	36	45	24	137
Pará	1330	1332	1644	688	4994
Amapá	150	138	139	51	478
Tocantins	230	275	452	228	1185
Total (Região)	2012	2114	2703	1190	8019
Nordeste					
Maranhão	142	138	236	115	631
Piauí	269	343	478	130	1220
Ceará	633	462	620	139	1854
Rio Grande do Norte	1280	1192	2221	777	5470
Paraíba	1038	1156	1122	662	3978
Pernambuco	7088	5255	4776	2024	19143
Alagoas	2875	3517	3792	2457	12641
Sergipe	257	267	455	314	1293
Bahia	5840	6160	9309	4386	25695
Total (Região)	19422	18490	23009	11004	71925
Sudeste					
Minas Gerais	8469	9682	12609	6081	36841
Espírito Santo	768	1112	1415	694	3989
Rio de Janeiro	243	214	241	91	789
São Paulo	4406	5199	5544	2992	18141
Total (Região)	13886	16207	19809	9858	59760
Sul					
Paraná	728	739	700	324	2491
Santa Catarina	189	194	196	101	680
Rio Grande do Sul	68	63	108	61	300
Total (Região)	985	996	1004	486	3471
Centro-Oeste					
Mato Grosso do Sul	115	270	303	147	835
Mato Grosso	369	425	550	344	1688
Goiás	527	593	867	400	2387
Distrito Federal	125	166	210	132	633
Total (Região)	1136	1454	1930	1023	5543
Total Nacional	37441	39261	48455	23561	148718

Tabela 5: Número absoluto de óbitos por escorpionismo registrados no Brasil, por região e UF de ocorrência notificados no Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), nos anos de 2007 e 2008

Região - UF Ocorrência	2007	2008	Total (UF)
Norte			
Pará	-	1	1
Total (Região)	-	1	1
Nordeste			
Paraíba	-	1	1
Sergipe	1	1	2
Bahia	9	7	16
Total (Região)	10	9	19
Sudeste			
Minas Gerais	1	2	3
Espírito Santo	3	1	4
Rio de Janeiro	-	1	1
Total (Região)	4	4	8
Sul			
Total (Região)	-	-	-
Centro-Oeste			
Goiás	4	-	4
Distrito Federal	-	-	0
Total (Região)	4	-	4
Total Nacional	18	14	33

No estudo realizado no Distrito Federal por Yoshizawa (2002), foram analisados 977 acidentes escorpiônicos ocorridos no período compreendido entre 1991 e 2000. Foi verificado um crescente aumento deste agravo ao longo do período estudado, com uma predominância na estação chuvosa (outubro a abril), na zona urbana e no intradomicílio. Dos 977 relatos, em apenas 392 (40,1%) dos acidentes foram identificadas as espécies *T. serrulatus*, *T. fasciolatus* e *Bothriurus araguayae* como agentes etiológicos, sendo a primeira responsável pelo maior número de acidentes (236; 60,2%); *T. fasciolatus* foi responsável por 125 acidentes (31,9%) e *B. araguayae* por 31 (7,9%). Do total de acidentes estudados no Distrito Federal, apenas 64 (16,3%) ocorreram em Brasília, com 40 destes acidentes (62,5%) causados pela espécie *T. serrulatus*, demonstrando que esta é a principal espécie causadora de acidente humano no Distrito Federal.

Ainda de acordo com Yoshizawa (2002), os acidentes escorpionicos no Distrito Federal são considerados leves (95,1%) e uma pequena parcela é considerada moderada (4,9%). Todos os acidentes classificados como moderados foram causados por *T. serrulatus*.

Um dado bastante interessante relatado por Yoshizawa (2002) foi o fato de que, do total de casos de escorpionismo notificados, 142 (14,53 %) ocorreram em crianças de até 10 anos e 24 (2,45 %) casos em maiores de 60 anos. Curiosamente, não foram registrados acidentes graves e apenas 3 casos foram classificados como moderados, sem registro de óbito, mesmo sendo esta a parcela da população considerada como grupo de risco para tal agravo e esses acidentes terem sido causados por *T. serrulatus*.

Ao longo desse mesmo período, apenas dois casos de acidentes graves foram registrados no Distrito Federal em 2002, envolvendo duas crianças, de 9 e 2 anos de idade, que tiveram um bom prognóstico (YOSHIZAWA, 2002).

Nos últimos quatro anos têm sido notificado ao SINAN-MS um crescente aumento no número de casos de acidentes escorpionicos ocorridos no DF, passando de 125 casos ocorridos em 2007 para 210 casos em 2008 e 132 apenas no primeiro semestre de 2010. No entanto, não foram registrados óbitos para essa região nos anos de 2007 e 2008, os dados referentes a óbitos para 2009 e 2010 ainda não foram divulgados pelo Ministério da Saúde (TABELAS 4 e 5).

1.7 QUADRO CLÍNICO DO ESCORPIONISMO

As neurotoxinas escorpionicas agem nos canais iônicos, levando à despolarização das terminações nervosas pós-ganglionares em praticamente todo o organismo. Podem manter uma abertura prolongada desses canais ou bloqueá-los, provocando disparos repetidos dos neurônios simpáticos e parassimpáticos, causando sintomas relacionados às hiperexcitações autossômica e neuromuscular. A liberação maciça de neurotransmissores produzirá um quadro amplo de alterações

fisiológicas e clínicas, com complicações definidas pela predominância das respostas simpáticas ou parassimpáticas conforme visualizamos na Tabela 6 (CAMPOLINA & JANUÁRIO, 2002).

Os sinais e sintomas nos acidentes escorpionicos são muito variados e o quadro clínico vai depender da predominância dos efeitos, ora da acetilcolina, ora das catecolaminas liberadas através do efeito direto da peçonha sobre o sistema nervoso simpático, parassimpático e na medula da adrenal (CUPO *et al.*, 2009). A atuação desses neurotransmissores nos diferentes setores do organismo é responsável por manifestações locais e sistêmicas que podem evoluir como alterações gastrointestinais, respiratórias, cardiovasculares e neurológicas e nos casos mais graves para edema pulmonar agudo (MAGALHÃES *et al.*, 1999; DIAS *et al.*, 2001; GHERSY de NIETO *et al.*, 2002; MANZOLI-PALMA, *et al.*, 2003; CUPO *et al.*, 2009).

A ação da peçonha no organismo pode iniciar-se poucos minutos após a picada e, conseqüentemente, alguns sinais e sintomas locais também surgem imediatamente após a inoculação da peçonha. Por outro lado, alguns sintomas podem surgir horas após a picada, o que justifica a observação dos pacientes vítimas de escorpionismo por algumas horas (FREIRE-MAIA *et al.*, 1994).

1.7.1 Quadro Clínico Local

A dor no local da picada, uma constante no escorpionismo humano, ocorre imediatamente após o acidente, podendo ser discreta, restrita apenas ao ponto de inoculação da peçonha, ou insuportável; geralmente é de intensidade progressiva, variando de acordo com a quantidade de peçonha inoculada e a sensibilidade individual (CUPO *et al.*, 2009). Manifesta-se sob forma de queimação ou agulhada, acompanhada ou não de parestesias e podendo irradiar-se para todo o membro atingido, exacerbando-se a palpação, e persistir por várias horas ou mesmo alguns dias. O local da picada dificilmente é detectado e, quando isso é possível, pode-se observar leve edema e hiperemia, acompanhados ou não de sudorese e piloereção local (GOYFFON, 2002; CAMPOLINA & DIAS, 2005; CUPO *et al.*, 2009).

De acordo com Cupo *et al.* (2009), nos envenenamentos mais graves, a dor pode ser inicialmente mascarada pelas manifestações sistêmicas, aparecendo após melhora das condições gerais do paciente.

Tabela 6: Principais respostas dos órgãos efetores aos estímulos adrenérgicos e colinérgicos.

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

Fonte: Adaptado de Cupo *et al.*, (2009).

1.7.2 Quadro clínico sistêmico

O surgimento de manifestações clínicas sistêmicas em um acidente escorpiônico é indicação de acidentes moderados e graves, sendo visualizadas principalmente em crianças, podendo iniciar-se em poucos minutos, ou dentro de poucas horas após o acidente (DIAS *et al.*, 2001; ROODT *et al.*, 2003; VIDAL *et al.*, 2004; CAMPOLINA e DIAS, 2005; DIAZ *et al.*, 2005).

Estudos utilizando animais de experimentação demonstraram que a peçonha do escorpião distribui-se muito rapidamente do sangue para os tecidos, sendo os rins os primeiros órgãos a receberem esta sobrecarga, apresentando concentrações elevadas de peçonha 15 minutos após a injeção desta em ratos, seguidos pelo fígado, pulmões e coração (ALVES *et al.*, 2005).

As principais manifestações sistêmicas verificadas nos casos de escorpionismo estão descritas a seguir.

1.7.2.1 Manifestações Gastrointestinais

De acordo com Cupo *et al.* (2009) sialorréia, náuseas e vômitos são comuns em acidentes escorpiônicos humanos. De fato, foi observada por Waterman (1938); Magalhães (1946) e Campos *et al.* (1980) a presença de sialorréia, lacrimejamento e rinorréia em envenenamentos humanos causados por *T. serrulatus*.

Também é facilmente observada sialorréia intensa em camundongos a partir da injeção de peçonha bruta de *T. serrulatus* (CATANZARO *et al.*, 1978), além de aumento no fluxo salivar e da secreção de calicreína, amilase, sódio e potássio em glândulas submandibulares de ratos. Verificam-se ainda alterações morfológicas dessas glândulas tais como a presença exacerbada de vacúolos e um reduzido número de grânulos secretores a partir de injeções intravenosa da peçonha desta espécie de escorpião, o que poderiam explicar a intensa presença de sialorréia em camundongos e ratos (CATANZARO *et al.*, 1978; ANDRADE *et al.*, 1981).

Efeitos farmacológicos tais como despolarização das membranas axônicas e a liberação de neurotransmissores (CATTERALL, 1980; FREIRE-MAIA, 1993) podem explicar a presença do lacrimejamento, coriza e intensa sialorréia induzida por peçonha de *T. serrulatus* no homem (WATERMAN, 1938; MAGALHÃES, 1946, CAMPOS *et al.*, 1980), em camundongos e em ratos (CATANZARO *et al.*, 1978; ANDRADE *et al.*, 1981). No entanto, é preciso considerar que a glândula submandibular dos ratos também pode ser afetada pela ação direta das toxinas de *T. serrulatus* sobre as próprias células secretoras (POSSANI *et al.* 1991; CLEMENTE *et al.* 2002).

Um sintoma menos freqüente, mas também observado em acidentes escorpiônicos é a diarreia, às vezes intensa, podendo juntamente com o vômito levar à desidratação, além disso, dor abdominal em cólica, simulando quadro de abdome agudo também é observado, sendo atribuído à ação tóxica do veneno sobre o pâncreas (CUPO *et al.*, 2009).

De fato, Catanzaro *et al.* (1978) e Novaes *et al.* (1982) investigaram os efeitos no pâncreas da "tityustoxina", uma fração heterogênea da peçonha de *T. serrulatus*, e demonstraram a capacidade de indução de pancreatite aguda em seres humanos. De acordo com Gonzaga (1979), Gabay e Kushner (1999) e Gallager *et al.* (1999), a amilase é liberada durante este processo. Em um estudo hematológico realizado em ratos injetados com peçonha bruta de *T. serrulatus*, verificou-se aumento da atividade da amilase e redução dos níveis de insulina, demonstrando que provavelmente o pâncreas tenha sido prejudicado (PINTO *et al.*, 2010a). Ratos injetados com doses subletais de TsTx tiveram os níveis de amilase e creatina quinase (CK) aumentados, porém não houve alteração dos níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH). Os níveis de aspartato aminotransferase (AST) aumentaram muito mais após administração de TsTX que nos animais tratados com peçonha bruta. Em pacientes sintomáticos humanos, os níveis de AST e CK foram altos (SOFER e GUERON, 1988; SOFER *et al.*, 1991; AMARAL *et al.*, 1991 e HERING *et al.*, 1993).

A peçonha de *T. serrulatus* induz alterações dos níveis plasmáticos de uréia e creatinina em humanos, indicando danos sobre a fisiologia renal. De fato, testes realizados em rim perfundido de rato demonstraram alterações renais como o

aumento na pressão de perfusão, taxas de filtração glomerular e fluxo urinário reduzidos após administração da peçonha de *T. serrulatus*. Sugere-se que a ligação de componentes da peçonha ao rim pode potencialmente provocar insuficiência renal aguda em pacientes picados por escorpião, dependendo da quantidade de peçonha inoculada e da massa corpórea do indivíduo (NUNAN *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2005).

A observação de náuseas e principalmente vômitos abundantes em humanos picados por escorpiões é relatado por Cupo *et al.* (2009) como indicação da gravidade do acidente, requerendo maior atenção e cuidados médicos, pois essa sintomatologia pode levar os acidentados à desidratação e conseqüentemente ao desequilíbrio eletrolítico.

1.7.2.2 Manifestações Respiratórias e Cardiocirculatórias

Cupo *et al.* (2009) relatam a presença de rinorréia, tosse, espirros, estertores pulmonares e sibilos, além de taquipnéia e hiperpnéia que, geralmente, aparecem rapidamente após a picada e, ao passar do tempo, podem agravar-se devido ao aumento da secreção pulmonar e, em casos mais graves, pode ocorrer bradipnéia e respiração suspirosa.

As manifestações e anormalidades cardiovasculares e histológicas do envenenamento escorpiônico têm sido relacionadas aos níveis elevados de catecolaminas e acetilcolina circulantes, suscitados por um efeito direto da peçonha sobre o sistema nervoso simpático e adrenais (CARDOSO *et al.*, 2009; CHOUDHURY e GANGULY, 1978; BAWASKAR, 1982; GUERON e OVSYSCHER, 1984). De fato, Novaes *et al.* (1982) demonstraram que toxinas de *T. serrulatus* atuam indiretamente sobre a função pancreática, estimulando a liberação de acetilcolina nos terminais nervosos pancreáticos.

Bouaziz e colaboradores (1996), estudando 104 casos graves de escorpionismo, verificaram alterações no eletrocardiograma (ECG) de 84 desses pacientes, como por exemplo: taquicardia sinusal (65), bradicardia e arritmia sinusal

(9), bloqueio auriculoventricular (13), mudanças do segmento ST (53) intervalo QT prolongado (LQT) (51), entre outras alterações, que ocorreram em até 3 horas após o envenenamento, porém, mais frequentemente entre 10 e 16 horas após o acidente.

Recentemente, Pinto e colaboradores (2010b) realizaram um estudo com ratos jovens utilizando a peçonha de *T. fasciolatus* e verificaram, por meio de ECG, várias alterações como: arritmia sinusal, aceleração cardíaca, paralisação atrial, além de desequilíbrio eletrolítico e bloqueio atrioventricular de 1º e 2º graus. A histologia cardíaca apresentou-se sem alterações, no entanto, foi verificado níveis plasmáticos elevados de CK e CK-MB, indicando alterações em tecido cardíaco.

1.7.2.2.1 Edema Pulmonar Agudo

A presença de edema pulmonar agudo em pacientes vítimas de acidentes escorpiônicos é bastante comum e documentada, sendo esta a principal causa de óbito nestes agravos (GUERON *et al.*, 1967; GUERON e YARON, 1970; CAMPOS *et al.*, 1980; FREIRE-MAIA e CAMPOS, 1989; MAGALHÃES *et al.*, 2000).

De fato, Razi e Malekanrad (2008) documentaram a presença de edema pulmonar agudo assimétrico 4 horas após picada de escorpião (*Odontobuthus doriae*) em uma criança de 12 anos previamente saudável.

O edema pulmonar pode se desenvolver dentro de 30 minutos a três horas após o acidente, provavelmente devido à disfunção miocárdica. Deste modo, o desenvolvimento de sintomas associados ao edema pulmonar pode surgir muito rapidamente e a presença de taquipnéia ou tosse intratável na admissão do paciente podem ser sinais de edema pulmonar em evolução (RAZI e MALEKANRAD, 2008).

De acordo com Silva *et al.* (2005), a patogênese do edema pulmonar induzido pela peçonha escorpiônica é muito complexa sendo decorrente de mecanismos cardiogênicos e não cardiogênicos. Um possível mecanismo de patogenia é a insuficiência ventricular esquerda aguda que pode ser desenvolvida como consequência da liberação maciça de catecolaminas ou dano miocárdico induzido

pela peçonha. Além disso, foi relatado que a estimulação dos receptores alfa pode levar à supressão da secreção de insulina que leva à hiperglicemia, à hipercalemia e ao acúmulo de ácidos graxos, o que pode danificar o coração e conseqüentemente induzir o surgimento de edema pulmonar (GUERON e YARON, 1970; FREIRE-MAIA *et al.*, 1978; GUERON *et al.*, 1980; JOY, 2009).

Deste modo, seria fácil concordar que o edema pulmonar agudo depende de uma descarga simpática-adrenal induzida pela peçonha para ser instalado (FREIRE-MAIA *et al.*, 1978). Gueron e Ilia (1996) sugeriram que o edema pulmonar cardiogênico se origina do grave comprometimento da função sistólica ventricular esquerda. Realmente, achados clínicos têm demonstrado claramente disfunção ventricular esquerda em pacientes com edema pulmonar agudo após envenenamento escorpiônico. Essa disfunção tem sido atribuída ao aumento abrupto no ventrículo esquerdo devido à liberação maciça de catecolaminas induzida pela peçonha escorpiônica (FREIRE-MAIA *et al.*, 1978; FREIRE-MAIA e CAMPOS, 1989; AMARAL *et al.*, 1991, 1993, 1994; HERING *et al.*, 1993; CUPO *et al.*, 1994; ABROUGH *et al.*, 1995; BUCARETCHI *et al.*, 1995).

Também foi sugerido que o edema pulmonar pode resultar de um aumento da permeabilidade vascular pulmonar produzida por substâncias vasoativas liberadas pela peçonha (DE MATOS *et al.*, 2001).

A injeção da peçonha de *T. serrulatus* em ratos induziu um aumento significativo da permeabilidade vascular do pulmão devido à liberação de prostaglandina E2, leucotrieno B4 e tromboxane A2 (De Matos *et al.*, 2001).

Freire-Maia e Matos (1993) estudaram o mecanismo fisiopatológico do edema pulmonar agudo induzido por peçonha de *T. serrulatus* e mostraram que a injeção de heparina em ratos não impediu a hipertensão arterial causada pela peçonha, mas impediu o surgimento do edema pulmonar. Isto sugere que a hipertensão arterial isoladamente não induz uma insuficiência cardíaca aguda suficiente para causar um edema pulmonar e que a ação inibitória da heparina pode estar relacionada a uma diminuição da permeabilidade vascular nos pulmões.

1.7.2.3 Manifestações Neurológicas

Apesar dos poucos relatos encontrados na literatura, a ação da peçonha escorpiônica sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) tem sido negligenciada principalmente devido ao entendimento comum de que os peptídeos neurotóxicos presentes na peçonha não atravessam a barreira hemato-encefálica. Contudo, ataques epiléticos sintomáticos agudos são por vezes observados como sintomas clínicos (até 5% dos indivíduos), o que sugere que uma quantidade pequena de toxinas é capaz de atingir o SNC de indivíduos com a barreira hemato-encefálica plenamente desenvolvida ou não (CLOT-FAYBESSE *et al.*, 2000). De fato, estudos realizados em camundongos recém-nascidos, com uma barreira hemato-encefálica subdesenvolvida, demonstraram a presença da neurotoxina Aahl isolada do escorpião *Androctonus australis* no sistema nervoso central destes mamíferos após injeção sistêmica (CLOT-FAYBESSE *et al.*; 2000).

Juhng e colaboradores (1999) mostraram que injeções intracerebroventriculares (icv) de TsTX-K e K-PiTx em ratos, produziram convulsões tônico clônicas que se tornaram crises mais severas no decorrer da primeira hora após a injeção, culminado em atividade convulsiva contínua (*status* epilético), extensão dos membros posteriores e eventualmente a morte.

Também foi verificado que injeções da peçonha de *T. serrulatus* no líquido intracerebroventricular induziram convulsões e alterações na atividade elétrica cerebral (SANDOVAL e DORCE, 1993).

De fato, Carvalho e colaboradores (1998) estudaram os efeitos de micro-injeções hipocampais de Ts-8F, uma neurotoxina isolada da peçonha de *T. serrulatus* e verificaram alterações comportamentais, convulsões e degeneração neuronal em ratos e sugeriram que esta toxina possa estar relacionada aos efeitos epiléticos observados com a peçonha bruta. Tremores, contrações musculares, agitação psicomotora e mioclonias, cefaléia e convulsões causadas por encefalopatia hipertensiva, e hemiplegias relacionadas com infarto cerebral têm sido descritos nos acidentes envolvendo humanos, porém, muito raramente (CUPO *et al.*, 2009).

Recentemente, Derkaoui e colaboradores (2011) descreveram um acidente escorpônico, no qual foi vítima uma criança de nove anos, que, após 20 minutos do acidente apresentou sudorese intensa, dor abdominal, vômitos e priapismo, estando clinicamente consciente, eupnéica, agitada, afebril e hemodinamicamente estável, com pressão arterial em torno de 110/60 mmHg. No entanto, após 24 horas do acidente, a criança apresentou uma hemiplegia direita e paralisia facial. Após realização de tomografia computadorizada e de ressonância magnética, foi constatado um acidente vascular cerebral (AVC) superficial da artéria cerebral média esquerda, confirmando que a peçonha escorpônica é capaz de causar alterações neurológicas.

1.8 Classificação do Escorpionismo

O escorpionismo pode ser classificado, para fins de orientação terapêutica e prognóstico, como leve, moderado e grave, de acordo com a intensidade dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes (QUADRO 1).

Cabe ressaltar que a gravidade dos casos depende da espécie e do tamanho do escorpião, da quantidade de peçonha inoculada, da idade do paciente e da sua sensibilidade. A idade do paciente vítima de escorpionismo é sem dúvida considerado um fator de risco, pois de acordo com Cupo *et al.* (2009) de cada 100 crianças com até 7 anos picadas por escorpião, 20 evoluem com quadros graves, mesmo quando tratadas corretamente.

Algumas pessoas são alérgicas à peçonha dos escorpiões e nestes casos, consequências muito graves, inclusive a morte pode ocorrer rapidamente, sem haver relação com a toxicidade da peçonha. Mortes ocorridas por envenenamentos causados por espécies de escorpião sem importância médica resultaram em choque anafilático induzido por alergia (REZENDE, 1994; CARDOSO *et al.*, 2009).

Quadro 1 – Classificação e tratamento do escorpionismo

	Leve	Moderado	Grave
Quadro Clínico	<ul style="list-style-type: none"> - Dor local imediata (queimação ou agulhada), acompanhada ou não de parestesias; - Ocasionalmente e discretamente (vômito, taquicardia e agitação). 	<ul style="list-style-type: none"> - Todos os sintomas locais já citados; - Manifestações sistêmicas sem muita intensidade (sudorese, náuseas, vômitos, hipertensão arterial, taquicardia, taquipnéia e agitação). 	<ul style="list-style-type: none"> - Manifestações sistêmicas bastante evidentes e intensas (vômitos, sudorese generalizada e abundante, agitação alternada com sonolência, hipotermia, taqui- ou bradicardia, hipertensão arterial, taqui- e hiperpnéia, tremores e espasmos musculares). - Choque cardiocirculatório e edema agudo pulmonar, principais causas de óbito.
Soroterapia* antiescorpiônico ou antiaracnídico (nº de ampolas)	Sem indicação	4	8

* A via de administração do Soro antiescorpiônico é intravenosa, o soro é administrado sem diluição e correndo durante 15 a 30 minutos. Em casos moderados a soroterapia é indicada apenas para crianças abaixo de 7 anos por constituírem grupo de risco. Adaptado de Cupo *et al.* (2009)

2 RELEVÂNCIA CIENTÍFICA

De acordo com Lira-da-Silva *et al.* (2000), o estudo sobre a peçonha de escorpiões e o respectivo envenenamento no Brasil começou no início do século por Maurano e Vital Brazil, seguidos de Magalhães e Tupinambá, todos na região Sudeste que já apresentava grandes percentuais de acidentes e óbitos causados por este agravo.

Recentemente, o SINAN (2010) divulgou os números referentes às picadas por escorpião no Brasil em 2009, com 48.333 casos e, apenas no primeiro semestre de 2010, já foram notificados 23.561 acidentes deste tipo. Esses números colocam o Brasil em estado de alerta, pois ultrapassam a quantidade de acidentes causados por serpentes que há muitos anos é considerado um problema de saúde pública.

A gravidade e o óbito no escorpionismo estiveram até hoje associados com maior frequência ao *T. serrulatus* e ocorridos em crianças abaixo de 14 anos. A principal causa dos óbitos tem sido o edema agudo pulmonar, que é uma alteração bastante documentada e comprovada em relatos clínicos, bem como em pesquisas com animais, sempre com escorpiões provenientes da região Sudeste (CAMPOS *et al.*, 1980; FREIRE-MAIA e CAMPOS, 1989; GUERON e YARON, 1970; GUERON *et al.*, 1967; DE MATOS *et al.*, 1997; MAGALHÃES, 1999).

Na Bahia, a espécie *T. serrulatus* foi responsável por 28,8% dos acidentes escorpiônicos no período de 1982-2000 e, dentre esses, 75% foram considerados moderados ou graves (SILVA *et al.*, 2005). Na cidade de Salvador, para o mesmo período, *T. serrulatus* foi responsável por uma percentagem menor de acidentes (13,4%) e de maior gravidade (10,8%) (LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009).

O que mais chamou a atenção no Estado da Bahia foi que, mesmo com um alto índice de acidentes escorpiônicos causados por *T. serrulatus*, e esses acidentes sendo considerados moderados e graves, poucos óbitos foram registrados nessa região em relação à região Sudeste. Posteriormente, foi demonstrado por Silva *et al.* (2005) que espécimes de *T. serrulatus* provenientes do Estado da Bahia produziam

uma quantidade de peçonha menor, com baixa toxicidade e que não induz edema pulmonar quando comparados com a mesma espécie de outras regiões do país.

No Distrito Federal, segundo a Diretoria de Vigilância Ambiental (DIVEP) (2006) grande parte dos acidentes escorpiônicos ocorridos são causados por *T. serrulatus* e a grande maioria dos acidentes são leves, sendo verificada a ausência de acidentes graves e de sintomas que pudessem levar os pacientes a óbito como o edema pulmonar. Entre o período de 2000 a 2006, foram registrados 1.073 acidentes no DF, destes, 13 atingiram crianças de até 10 anos e 13 idosos com mais de 50 anos, sem registros de óbitos nesse período.

Diante do exposto, tornou-se necessário e bastante importante a avaliação da toxicidade da peçonha de espécimes de *T. serrulatus* procedentes do Distrito Federal, comparando-a com a toxicidade da peçonha de espécimes do Sudeste. Uma vez que o surgimento do edema pulmonar é um sintoma que indica gravidade e que geralmente está relacionado ao óbito nesses agravos, fez-se necessário também avaliar a capacidade de indução deste edema por parte da peçonha de espécimes de *T. serrulatus* procedentes do Distrito Federal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar e investigar a toxicidade da peçonha de espécimes de *T. serrulatus* procedentes do Distrito Federal e de Minas Gerais por meio da determinação da DL₅₀ e efeitos da peçonha em camundongos, e a capacidade de indução de edema pulmonar agudo e alterações em tecidos cardíacos e pulmonares de ratos

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Após injeções de peçonha de *T. serrulatus* procedente do DF e de MG:

- » Determinar e comparar as doses letais 50% (DL₅₀) em camundongos (*Mus musculus*);
- » Observar e comparar as alterações apresentadas pelos camundongos (*Mus musculus*);
- » Avaliar, em ratos (*Rattus norvegicus*), a capacidade de indução de edema agudo pulmonar;
- » Visualizar e comparar por meio de análise morfológica os pulmões e corações de ratos (*Rattus norvegicus*);
- » Verificar alterações nas dosagens séricas de Creatina Quinase (CK) e de sua isoenzima (CK-MB) em ratos (*Rattus norvegicus*);
- » Verificar alterações na permeabilidade vascular pulmonar de ratos (*Rattus norvegicus*);

» Realizar contagem de leucócitos totais no lavado bronco alveolar pulmonar de ratos (*Rattus norvegicus*);

» Fracionar a peçonha de *T. serrulatus* das duas populações estudadas, por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DOS ESPÉCIMES DE ESCORPIÃO

No Distrito Federal, os espécimes de *T. serrulatus* foram coletados no *campus* da Universidade de Brasília (n=50) por meio de busca ativa realizada durante o dia com autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis) por meio de licença permanente para coleta de material zoológico nº 19138-1. Também foram recebidos espécimes de *T. serrulatus* (n=10) doados pela DIVAL (Divisão de Vigilância Ambiental), da Secretaria de Saúde do Distrito Federal que possui um convênio firmado com a Prof^a Elisabeth F. Schwartz. No total foram obtidos 60 escorpiões e todos foram identificados com base em características descritas para esta espécie.

Com o intuito de diminuir variações na peçonha relacionadas à idade dos animais utilizados nos experimentos, os mesmos foram capturados em sua fase adulta, medindo entre 5 e 7 cm.

A peçonha de *T. serrulatus* procedente de Minas Gerais foi gentilmente cedida pela Dra Consuelo Latorre Fortes-Dias, da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais.

4.2 MANUTENÇÃO EM CATIVEIRO

Os escorpiões coletados no Distrito Federal foram mantidos no biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília e acondicionados em terrários plásticos individuais (com abertura superior para ventilação interna) contendo substrato natural (fragmentos de rochas e terra argilosa).

Os escorpiões foram alimentados a cada 15 dias com baratas vivas (*Leurolestes circumvagans*) e receberam, diariamente, água a vontade.

4.3 EXTRAÇÃO DA PEÇONHA

Imediatamente após a chegada dos escorpiões no biotério, foram realizadas as extrações da peçonha por meio de estimulação elétrica, conforme mostra a Figura 4.

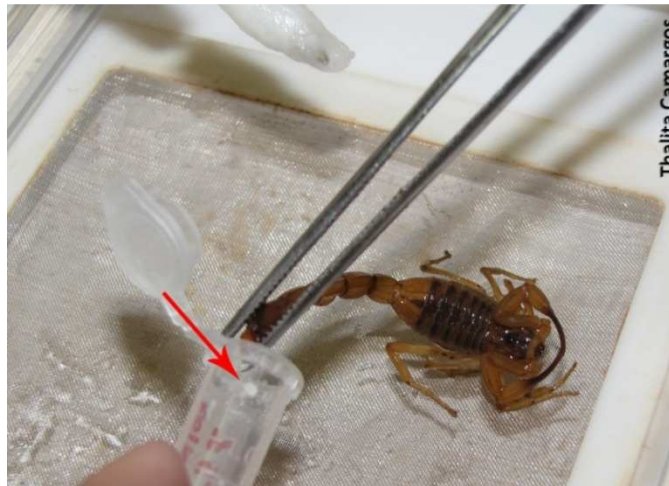


Figura 4: Extração da peçonha de *T. serrulatus* por estimulação elétrica. A seta vermelha indica a gota de peçonha obtida.

Os procedimentos para a extração foram os seguintes: cada escorpião foi tomado pelo 3º ou 4º segmento metassomal utilizando-se de uma pinça de dissecação e mergulhado em água para limpeza do telson; em seguida o telson do animal foi estimulado com choques de 10 V em intervalos médios de 5 segundos, não ultrapassando 5 choques por animal a fim de não produzir dano à glândula produtora de peçonha. O propósito dos choques foi contrair os músculos da glândula, fazendo com que a peçonha fosse liberada pelo animal dentro de um tubo tipo *eppendorf*. Tal procedimento foi realizado com intervalos de 30 dias entre uma extração e outra, respeitando um período de 15 dias entre a última alimentação e a extração a fim de se obter uma maior quantidade de peçonha. Posteriormente, a peçonha coletada foi ressuspensa em água super pura (Milli Q®) e, em seguida, o material foi seco a vácuo e armazenado a uma temperatura de -20°C.

Foi obtido um total de 72 mg de peçonha ao longo de várias extrações e constituiu um *pool* único que foi utilizado em todos os experimentos.

A peçonha de *T. serrulatus* procedente da população de Minas Gerais também foi extraída por estimulação elétrica e um *pool* de 10 mg de peçonha foi utilizado nos experimentos.

4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

4.4.1 Determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀)

A toxicidade da peçonha de *T. serrulatus* foi avaliada de acordo com Finney (1971) por meio da determinação da dose letal 50% (DL₅₀) em camundongos, dose capaz de matar 50% dos animais testados.

Os camundongos foram fornecidos pelo biotério central da Universidade de Brasília e mantidos em Biotério próprio para estes animais no Instituto de Biologia da mesma instituição por um período de aclimatação (24 h), com livre acesso à água e à ração balanceada Labina da Purina®, e mantidos com ciclo claro/escuro de 12/12 h e controle da temperatura e da umidade do ambiente.

Para o desafio, foram realizados dois experimentos: o primeiro utilizando a peçonha de *T. serrulatus* procedente de Minas Gerais (TS-MG) e o segundo utilizando a peçonha de *T. serrulatus* procedente do Distrito Federal (TS-DF). Em cada experimento foram utilizados 72 camundongos (*Mus musculus*) albinos e machos, pesando entre 20-22 g, distribuídos randomicamente em 9 grupos.

Para a determinação da DL₅₀ da peçonha de *T. serrulatus* procedente de MG em camundongos (n=8), foram testadas as doses 5,8; 11,6; 17,4; 23,2; 34,8; 46,4; 58 e 72 µg / camundongo de 20 g i.p. A DL₅₀ da peçonha desta espécie (23,2 µg / camundongo) foi anteriormente determinada por Nishikawa *et. al.* (1994) e por este motivo esta dose foi a primeira a ser testada e as demais foram definidas a partir desta.

Para a determinação da DL₅₀ da peçonha de *T. serrulatus* proveniente do DF em camundongos (n=8) foram testadas as doses 14; 26; 36; 50; 60; 70; 80 e 90 µg / camundongo de 20 g i.p. A primeira dose testada foi 50 µg / camundongo, o correspondente ao dobro da DL₅₀ obtida para a peçonha de *T. serrulatus* procedente de MG. As demais doses foram definidas a partir desta.

Nos dois experimentos citados, os animais foram comparados a animais controle (n=8) que receberam apenas 100 µL de solução salina i.p.

A taxa de sobrevivência dos animais foi observada até 24 e 48 h após a inoculação da peçonha. Ao final do experimento os animais sobreviventes foram eutanasiados com super dosagens de pentobarbital sódico (cerca de 75 mg/kg).

4.4.2 Determinação dos Efeitos da Peçonha

As peçonhas de TS-MG e TS-DF foram avaliadas quanto à capacidade de induzir alterações comportamentais e fisiológicas visíveis em camundongos.

Para o desafio, todos os grupos de camundongos que fizeram parte do experimento da determinação da DL₅₀ foram observados durante as primeiras três horas deste experimento. Foram consideradas alterações comportamentais e fisiológicas, aquelas visíveis nos animais que receberam peçonha e ausentes nos animais que receberam solução salina.

Antes do desafio foram definidas algumas alterações comportamentais e fisiológicas para facilitar a identificação das mesmas nos camundongos testados (TABELA 7).

Tabela 7: Definição das alterações comportamentais e fisiológicas

Alterações	Definição
Ataxia	Marcha cambaleante acompanhada de desequilíbrio postural
Convulsões	Contrações musculares desordenadas, bruscas, violentas e generalizadas
Dispnéia	Dificuldade respiratória
Espasmos	Contração involuntária e brusca de pequenos grupos musculares
Hipersensibilidade	Reação brusca a estímulos
Hiperatividade	Exacerbação dos movimentos normais do animal
Hipoatividade	Diminuição dos movimentos normais do animal
Sudorese intensa	Produção e liberação excessiva de suor
Lacrimejamento	Produção e liberação excessiva de lágrimas
Movimentos da calda	Movimentos ondulatórios em forma de espiral
Piloereção	Ereção dos pêlos corpóreos
Priapismo	Ereção prolongada do pênis sem estimulação sexual
Prostação	Enfraquecimento e perda da mobilidade normal
Defecação	Liberação excessiva e descontrolada dos excrementos
Sialorréia	Produção e liberação excessiva de saliva
Morte	Cessar definitivo de todas as atividades fisiológicas

4.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE EDEMA AGUDO PULMONAR

A avaliação da capacidade de indução do edema agudo pulmonar foi adaptada e fundamentada nos métodos desenvolvidos por De Matos e colaboradores (1999, 2001).

A espécie de rato *Rattus norvegicus* foi escolhida para esse experimento em lugar da espécie de camundongo *Mus musculus*, pois estudos demonstraram que esta última representa um excelente modelo para estudos de toxicidade e de manifestações clínicas, porém, em relação à fisiopatologia do envenenamento essa

espécie não se mostrou à ideal, pois as alterações histológicas observadas no pulmão de camundongos não se correlacionam com aquelas observadas em ratos e em seres humanos (MAGALHÃES *et. al*, 1998).

Foram utilizados 18 ratos (*Rattus norvegicus*, 230-250 g) albinos e machos, divididos em três grupos. Os ratos do grupo 1 (n=6) receberam, na veia caudal, o equivalente a 0,5 mg / kg (120 µg por rato de 240 g) de peçonha de TS-MG diluído em 200 µL de solução salina 0,5%); os ratos do grupo 2 (n=6) receberam na veia caudal o equivalente a 0,5 mg / kg (120 µg por rato de 240 g) de peçonha de (TS-DF) diluído em 200 µL de solução salina 0,5%); os ratos do grupo 3 (Controle) (n=6) receberam na veia caudal 200 µL de solução salina 0,5%.

Antes do desafio, os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilazina e quetamina na dose de 10 mg / kg e 75 mg / kg, respectivamente, via intraperitoneal.

Os ratos utilizados no experimento foram fornecidos pelo biotério central da Universidade de Brasília e foram mantidos em Biotério próprio para estes animais no Instituto de Biologia da mesma instituição e acondicionados sob as mesmas condições já descritas para os camundongos.

Após 1 h da injeção da peçonha, os animais foram eutanasiados com super dosagens de pentobarbital sódico, cerca de 75 mg / kg, via intraperitoneal.

Os animais foram dissecados e em seguida foi realizada a retirada dos blocos coração e pulmão de cada animal. Os pulmões foram imediatamente pesados e a presença de edema agudo pulmonar foi determinada de acordo com Magalhães e colaboradores (1998) por meio da fórmula:

$$\text{EAP} = \frac{\text{Massa do Pulmão} \times 100}{\text{Massa corpórea}}$$

A presença de atividade edematogênica pulmonar foi avaliada por meio de diferenças entre a EAP obtida de animais injetados na veia caudal com peçonha (0,5 mg/kg em 200 µL de salina) e a EAP obtida nos animais do grupo controle, injetados com solução salina 0,5% (200 µL) pela mesma via.

Posteriormente, os pulmões e os corações de todos os animais foram acondicionados em solução de formol 10 %.

4.5.1 Preparação dos Órgãos Para Análise Morfológica

Os pulmões e corações foram fixados em solução de formol 10 % por no mínimo 48 h.

Após esse período, os pulmões direito e esquerdo foram separados e o coração dividido ao meio com intuito de um melhor processamento dos tecidos. O material foi acondicionado em cápsulas histológicas e preparado em um processador automático digital da LUPE[®] modelo PT05 de 12 cubas (São Carlos/SP), seguindo-se as etapas descritas abaixo.

Etapa 1: Desidratação

O principal objetivo desta primeira etapa foi a retirada de toda a água do tecido, realizada por meio de banhos de etanol em concentrações crescentes: 1ª cuba contendo solução de etanol a 50%, 2ª cuba a 60%, 3ª a 70%, 4ª a 80%, 5ª a 90%, 6ª e 7ª cubas contendo etanol a 99,8%. Os tecidos foram incubados em cada solução por 1 h.

Etapa 2: Clareamento ou Diafanização

Nesta etapa os tecidos foram incubados nas 8ª e 9ª cubas em xilol absoluto por 1 h em cada cuba.

Etapa 3: Impregnação

Nesta etapa, os tecidos foram mergulhados em duas cubas contendo parafina a 60 °C por um período de 1 h com a finalidade de preencher os espaços deixados pela água que havia sido anteriormente retirada.

Em seguida, os tecidos foram incluídos individualmente em blocos de parafina a uma temperatura de 60 °C e, posteriormente, acondicionados a 4 °C por, no mínimo, 10 min com o intuito de solidificar a parafina com mais rapidez e torná-la menos quebradiça.

Após esse período, o material foi cortado a uma espessura de aproximadamente 4 µm com o auxílio de um micrótomo da marca Spencer® modelo 820. Foram realizados dois cortes transversais de cada amostra de tecido. Os cortes foram colocados em água a 60 °C para retirada da parafina e imediatamente colocados em lâminas de vidro para microscopia (26 x 76 x 1 mm). Em seguida, foram aquecidos a 60 °C em estufa por um período mínimo de 10 min para aderência do tecido a lâmina.

Posteriormente, as lâminas foram submetidas ao processo de coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram banhadas durante 4 min em hematoxilina (solução de 5 g de hematoxilina; 50 mL de álcool etílico absoluto; 100 g de alúmen de potássio; 2,5 g de O₂Hg e 1 L de H₂O) e, em seguida, quando necessário, lavadas abundantemente em água corrente para retirada do excesso do corante e posteriormente mergulhadas em solução de álcool ácido 1% (etanol a 70% e HCl a 1%) e lavadas em água amoniacal 1% (NH₄OH a 1%), antes de serem coradas com eosina (100 mL de eosina; 10 mL de floxina básica; álcool etílico a 95 % e 4 mL de ácido acético), por 3 min. Finalmente, foram desidratadas em 4 baterias de álcool etílico absoluto e diafanizadas em 4 baterias de xilol absoluto. Ao final da coloração, as lâminas foram montadas em lamínulas (24 x 32 mm) com o auxílio de um meio para montagem rápida de microscopia (Entellan®)

As lâminas foram examinadas em um microscópio de luz pela Professora Dra. Fabiana Pirani Carneiro, sem que a mesma tivesse qualquer conhecimento prévio dos tratamentos recebidos pelo material analisado.

Posteriormente, o material foi classificado de acordo com De Matos *et. al.*, (1997) com algumas adaptações, conforme descrito a seguir:

Tecido normal: não apresentou nenhuma alteração morfológica quando comparado ao grupo controle;

Edema pulmonar leve: normalmente irregular, sub-pleural, com pouco extravasamento de plasma;

Edema pulmonar moderado: multifocal, com grande extravasamento de plasma;

Edema pulmonar grave: intersticial e difuso (intra-alveolar) em todos os lóbulos pulmonares, por vezes associado com focos hemorrágicos.

As etapas de preparação dos tecidos foram realizadas no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e as análises morfológicas realizadas pela Professora Dra. Fabiana Pirani Carneiro que não possuía conhecimento prévio do material analisado.

4.5.2 Coletas de Sangue e dosagens séricas de Creatina Quinase (CK) e de sua isoenzima CK-MB

Todos os animais utilizados no experimento de indução de edema pulmonar também foram submetidos à coleta de sangue após 1 h do tratamento.

A coleta foi realizada com uso de micropipetas, após a secção dos vasos cervicais dos animais. As amostras foram armazenadas em tubos sem anticoagulantes e imediatamente centrifugadas a 20000 g por 20 min a 10 °C. O sobrenadante foi separado e congelado a -20 °C.

Posteriormente, o sobrenadante congelado foi utilizado para dosagens séricas de CK de acordo com as instruções do *kit* CK-NAC Liquiform Ref. 117 (Labtest®) e CK-MB de acordo com as instruções do *kit* CK-MB Liquiform Ref. 118 (Labtest®), ambos, são utilizados para determinação quantitativa da atividade de CK e CK-MB em modo cinético em soro ou plasma humano.

Diferenças observadas nas dosagens séricas de CK e CK-MB de ratos que receberam injeções de peçonha em comparação com as dosagens séricas de ratos

que receberam apenas solução salina foram assumidas como alterações nos níveis séricos dessas enzimas.

4.5.3 Avaliação das Alterações da Permeabilidade Vascular

Alterações na permeabilidade vascular a proteínas séricas foram analisadas usando a técnica de Azul de Evans (AE). Esta técnica baseia-se na propriedade que o corante (AE) possui de se combinar com a albumina sérica e com isso extravasar no caso de haver alterações na permeabilidade vascular. Desta forma, a presença do corante no líquido intersticial constitui uma evidência da saída de albumina dos vasos para o tecido estudado e conseqüentemente do aumento da permeabilidade vascular (SARIA E LUNDBERG, 1983; DE MATOS *et al.*, 1999; DE MATOS *et al.*, 2001).

Para tal procedimento foram utilizados 18 ratos (*Rattus norvegicus*) pesando entre 230-250 g albinos e machos, divididos em três grupos: Antes do desafio os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilasina e quetamina nas doses de 10 mg/kg e 75 mg/kg, respectivamente.

Grupo TS-MG (n=6) recebeu, pela veia caudal, o equivalente a 0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais diluída em 200 µL de solução salina 0,5 %, 5 min após ter recebido através da mesma via 20 mg / kg de AE diluído em 100 µL de solução salina;

Grupo TS-DF (n=6) recebeu, pela veia caudal, o equivalente a 0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente do Distrito Federal diluído em 200 µL de solução salina 0,5 %, 5 min após ter recebido através da mesma via 20 mg / kg de AE diluído em 100 µL de solução salina;

Grupo Controle (n=6) recebeu pela veia caudal, 200 µL de solução salina 0,5 %, 5 min após ter recebido através da mesma via 20 mg / kg de AE diluído em 100 µL de solução salina.

Após uma hora da injeção da peçonha ou solução salina os animais foram eutanasiados com overdose de pentobarbital sódico (75 mg / kg i.p.).

Após a morte dos animais, a traquéia foi fechada com auxílio de uma pinça cirúrgica e por meio de um escalpe inserido no sentido dos brônquios e, com o auxílio de uma seringa, foi realizada uma lavagem bronco-alveolar (LBA), utilizando-se de 200 μ L de solução salina 0,5 %. A solução salina foi injetada e recolhida por três vezes em cada rato. O fluido do LBA foi centrifugado (2.500 g por 7 min) e o sobrenadante utilizado para quantificação do AE. O bloco coração-pulmão foi retirado e os pulmões também foram utilizados para quantificação do AE.

Os pulmões foram cortados, picados, colocados em 2 mL de formol a 10 % e incubadas sem homogeneização a 40 °C por 24 h.

A quantificação do AE nos pulmões e no LBA foi realizada utilizando-se de um espectrofotômetro Shimadzu® modelo UV 1800 a um comprimento de onda de 620 nm. Níveis elevados de AE nos pulmões e no LBA de ratos que receberam injeções de peçonha em relação aos obtidos de ratos que receberam apenas injeções de solução salina foram assumidos como alterações na permeabilidade vascular pulmonar.

4.5.4 Contagem Total de Leucócitos

O *pellet* obtido do LBA foi ressuspenso em 1 mL de solução salina em tampão fosfato de sódio 0,1M contendo albumina bovina 3 %. Uma alíquota de 20 μ L foi diluída em solução de Turk (0,5 % de azul de metileno em 30 % de ácido acético glacial) 1:20 v:v e utilizada para contagem. A contagem total de leucócitos foi realizada em uma câmara de Neubauer utilizando-se de um microscópio óptico em uma objetiva de imersão (100 X). Os leucócitos foram quantificados nos quatro quadrados externos A, B, C e D da câmara de Neubauer. Cada quadrado é subdividido em 16 quadrados de $1/16 \text{ mm}^2$ de área. A área total da contagem é a de $64/16 \text{ mm}^2$. A altura entre o retículo gravado na câmara e a parte inferior da lamínula

é de 1/10 de mm. O volume total será, portanto, igual a $64/16 \text{ mm}^2 \times 1/10 = 64 /160 \text{ mm}^3$ ($V = 2/5 \text{ mm}^3$). O número total de leucócitos foi obtido através da fórmula:

$$\text{Número de leucócitos /mm}^3 = \frac{A}{D \times V}, \text{ teremos } \frac{A}{1/20 \times 2/5} = A \times 50$$

Onde: A = total de leucócitos contados nos quatro quadrantes, D = diluição utilizada e V = volume onde foi realizada a contagem, onde D e V são constantes.

4.6 PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PEÇONHA DE *T. serrulatus* PROCEDENTE DE MINAS GERAIS E DO DISTRITO FEDERAL

As peçonhas de TS-MG e TS-DF (1 mg de cada) foram separadamente ressuspensas em 250 μL de TFA 0,12% (v/v) em água super pura (Milli-Q[®]) e submetidas à centrifugação por 15 min a 21.000 g.

Os sobrenadantes obtidos foram fracionados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando-se de uma coluna de fase-reversa C18 analítica (Phenomenex), previamente equilibrada em TFA 0,12 % (v/v) em água super pura (Milli-Q[®]).

A cromatografia foi realizada mediante um gradiente linear de 0 % de solvente A (0,12 % TFA em água Milli-Q) a 60 % de solvente B (Acetonitrila com TFA 0,1% (v/v)), executada em 60 min sob um fluxo de 1 mL / min e detecção a 230 nm.

Os perfis cromatográficos foram obtidos sob as mesmas condições e no mesmo dia para evitar variação externa. Foram realizadas duas cromatografias com a peçonha de cada população de *T. serrulatus*, a fim de verificar a reprodutibilidade dos fracionamentos.

4.7 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

Previamente, o projeto de estudo contendo todos os procedimentos experimentais foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, tendo sido avaliado e aprovado sob UnBDOC nº. 133424/2009 (ANEXO A). Todos os procedimentos adotados obedeceram aos princípios éticos na experimentação animal de acordo com a lei de número 11.794 de 08 de outubro de 2008.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores referentes aos experimentos da DL_{50} e os respectivos limites de confiança foram calculados através da análise de Probit (FINNEY, 1971), utilizando o software BioStat versão 2009.

Os efeitos tóxicos da peçonha de *T. serrulatus* do DF e de MG em camundongos foram analisados por meio de estatística descritiva.

A avaliação da indução de edema agudo pulmonar foi submetida à análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste T (*Tukey*), considerando $p < 0,05$ como valores significantes. Esses mesmos resultados também foram submetidos ao teste F (*Frequency Distribution*), com intuito de se obter a média do massa dos pulmões dos animais dos grupos testados.

Os resultados referentes à presença de edema em pulmões direito e esquerdo obtidos por meio da avaliação da histologia dos tecidos pulmonares dos animais do grupo TS-MG foram comparados entre si e com os pulmões dos animais controle por meio da análise de variância (ANOVA) seguida de teste T (*Tukey*) considerando $p < 0.05$ como valor significativo.

Os resultados referentes à concentração sérica da enzima CK e de sua isoenzima CK-MB em ratos submetidos à intoxicação pelas peçonhas de TS-MG e

TS-DF foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de teste T (*Tukey*) considerando $p < 0.05$ como valor significativo. Esses resultados também foram submetidos ao teste F (*Frequency Distribution*), para se obter a média das concentrações séricas de CK e de CK-MB em animais tratados e não tratados com peçonha.

Os resultados referentes à quantificação do corante Azul de Evans nos pulmões e no lavado bronco alveolar de ratos tratados e não tratados com peçonha de *T. serrulatus* do DF e de MG foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de teste T (*Tukey*), considerando valores significantes com $p < 0.05$.

Os testes estatísticos, com exceção da DL_{50} , foram realizados utilizando-se o software *GraphPad Prism* versão 4.0 (San Diego, CA, USA).

Todas as análises paramétricas foram previamente testadas quanto às suas exigências. No caso da distribuição normal, foi realizado o teste de Kolmogorov-smirnov (KS) para garantir este pré-requisito.

Um resumo representativo da estratégia metodológica geral utilizada durante a realização deste estudo encontra-se esquematizado na Figura 5.



Figura 5: Esquema geral representativo da estratégia metodológica empregada na realização deste estudo.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

5.1.1 Determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀)

Durante a determinação da DL₅₀ da peçonha de *T. serrulatus* procedente do DF em camundongos (n=8), observou-se que a dose 14 µg / camundongo não apresentou letalidade e a dose mínima capaz de causar morte foi de 26 µg / camundongo (25 %) e a partir da dose 90 µg / camundongo observou-se 100 % de letalidade dos animais testados.

Com relação à determinação da DL₅₀ da peçonha de *T. serrulatus* procedente de MG em camundongos (n=8), foi observado que a menor dose capaz de causar morte dos camundongos (12,5%) foi de 11,6 µg / camundongo, enquanto que a dose 5,8 µg / camundongo não apresentou letalidade e a partir da dose 58 µg / camundongo a letalidade foi de 100% dos animais testados.

As DL₅₀ (limite de confiança de 95 %) calculadas pela análise de Probit para a peçonha de *T. serrulatus* do Distrito Federal e Minas Gerais foram respectivamente, 51,6 (40 – 64,8) µg / camundongo de 20 g e 26 (19,8 - 33) µg / camundongo de 20 g. Deste modo, a DL₅₀ calculada para a peçonha de *T. serrulatus* do DF apresentou-se quase duas vezes (1,98) maior que a calculada para a peçonha desta mesma espécie procedente de MG, ou seja, a peçonha do DF é menos tóxica que a de MG.

Avaliando-se a figura 6 observa-se que com o aumento nas doses de peçonha também ocorreu o aumento da letalidade, além disso, nota-se a partir do deslocamento para a direita da curva dose-resposta calculada para a peçonha de *T. serrulatus* procedente do DF que esta peçonha é menos tóxica que a da mesma espécie procedente de MG.

Observou-se durante a realização dos dois experimentos que a maioria dos óbitos nos camundongos testados ocorreu nas três primeiras horas após o desafio e principalmente nos grupos de animais que receberam as maiores doses e que uma reduzida quantidade de óbitos ocorreu no período compreendido entre 3 e 24 h após

as injeções i.p. das peçonhas e esses poucos óbitos foram registrados principalmente nos grupos de animais testados com as menores doses. No período compreendido entre 24 e 48 h após o desafio não foram registrados óbitos em nenhum dos grupos.

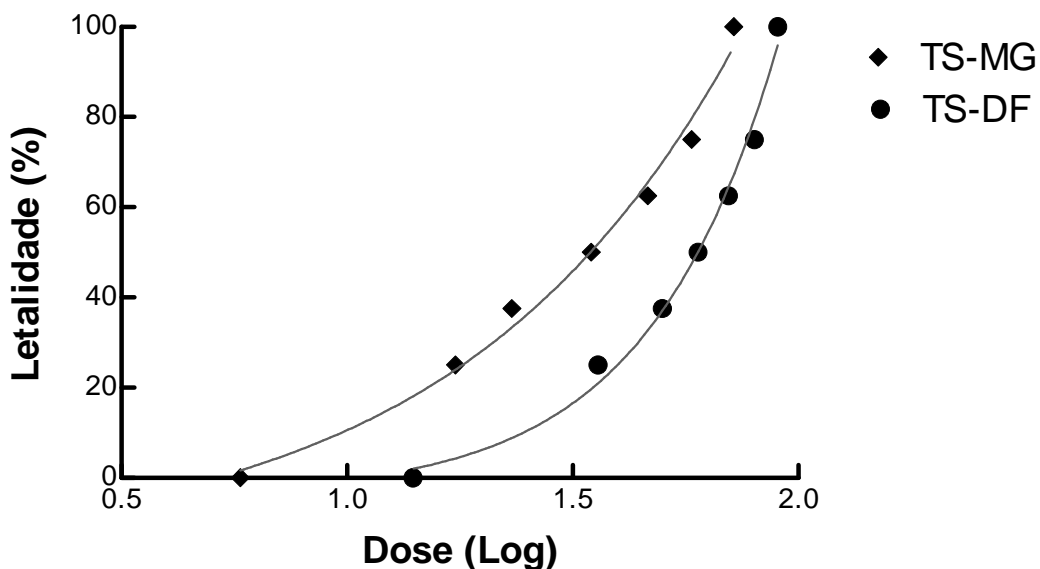


Figura 6: Curvas dose-resposta obtidas a partir de injeções i.p. da peçonha de *T. serrulatus* procedente do Distrito Federal (TS-DF) e de Minas Gerais (TS-MG). R^2 TS-MG (0,98) e R^2 TS-DF (0,99).

5.1.2 Determinação dos Efeitos da Peçonha

As alterações apresentadas em camundongos após as três primeiras horas da injeção das peçonhas de escorpiões *T. serrulatus* provenientes de MG e de DF, durante o experimento da DL_{50} encontram-se especificadas nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

As alterações fisiológicas apresentadas pelos camundongos após injeções i.p. das peçonhas de TS-MG e TS-DF foram dose-dependentes, ou seja, com o aumento da dose de peçonha, a maioria das alterações listadas torna-se mais freqüente, com única exceção da hipoatividade que foi visualizada mais

freqüentemente nos animais que fizeram parte dos grupos que receberam as menores quantidades de peçonha.

TABELA 8 – Alterações visualizadas em camundongos (n=8) nas três primeiras horas após injeção i.p. de diversas doses de peçonha do escorpião *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais.

Alterações Visualizadas	Doses injetadas por camundongo de 20 g e porcentagem de ocorrência das alterações (%) no grupo							
	5,8 µg	11,6 µg	17,4 µg	23,2 µg	34,8 µg	46,4 µg	58 µg	72 µg
Ataxia	-	-	12,5	62,5	87,5	100	100	100
Convulsões	-	12,5	25	37,5	62,5	75	100	100
Dispnéia	25	37,5	62,5	75	87,5	87,5	100	100
Espasmos	-	12,5	37,5	-	62,5	75	87,5	87,5
Hipersensibilidade	-	-	12,5	-	62,5	100	100	100
Hiperatividade	25	37,5	50	75	62,5	87,5	100	100
Hipoatividade	75	62,5	50	25	12,5	12,5	-	-
Sudorese intensa	-	-	25	37,5	87,5	75	100	100
Lacrimejamento	-	-	37,5	75	87,5	100	100	87,5
Movimentos da cauda	-	-	12,5	37,5	62,5	50	50	62,5
Piloereção	-	-	37,5	100	87,5	100	87,5	87,5
Priapismo	-	12,5	62,5	87,5	100	100	87,5	87,5
Prostração	-	-	25	37,5	62	75	100	100
Defecação	25	50	50	62,5	75	100	100	100
Sialorréia	37,5	50	62,5	62,5	75	100	100	100
Morte	-	-	12,5	12,5	62,5	75	100	100

A presença de sialorréia intensa geralmente precedeu o surgimento de espasmos e, posteriormente convulsões, que podem ter sido a causa da morte dos

camundongos, pois todos os óbitos ocorreram após as crises convulsivas tanto nos camundongos que receberam a peçonha de TS-MG, quanto naqueles que receberam peçonha de TS-DF.

TABELA 9 – Alterações visualizadas em camundongos (n=8) nas três primeiras horas após injeção i.p. de diversas doses de peçonha do escorpião *T. serrulatus* proveniente do Distrito Federal.

Alterações Visualizadas	Doses injetadas por camundongo de 20 g e porcentagem de ocorrência das alterações (%) no grupo							
	14 µg	26 µg	36 µg	50 µg	60 µg	70 µg	80 µg	90 µg
Ataxia	-	-	-	37,5	75	87,5	100	100
Convulsões	-	25	25	37,5	50	62,5	75	100
Dispnéia	12,5	50	75	87,5	100	87,5	100	100
Espasmos	-	-	12,5	37,5	50	87,5	100	100
Hipersensibilidade	-	-	12,5	50	37,5	75	87,5	100
Hiperatividade	12,5	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100
Hipoatividade	87,5	75	62,5	50	37,5	25	12,5	-
Sudorese intensa	-	-	25	37,5	75	62,5	87,5	100
Lacrimejamento	-	-	12,5	37,5	75	87,5	62,5	75
Movimentos da cauda	-	-	-	37,5	62,5	12,5	37,5	62,5
Piloereção	-	-	12,5	37,5	50	87,5	87,5	100
Priapismo	-	12,5	37,5	75	100	75	87,5	87,5
Prostração	-	37,5	50	37,5	50	75	87,5	100
Defecação	-	37,5	50	75	100	87,5	87,5	100
Sialorréia	12,5	37,5	37,5	50	75	75	100	100
Morte	0	0	12,5	25	37,5	62,5	75	100

No entanto, é preciso salientar que a presença de sialorréia juntamente com a presença de dispnéia podem ter afetado a função respiratória, levando a um quadro cianótico e, conseqüentemente ao óbito.

5.2 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE EDEMA AGUDO PULMONAR

A avaliação da capacidade de indução de edema agudo pulmonar das peçonhas de *T. serrulatus* provenientes do Distrito Federal e de Minas Gerais em ratos, por meio da massa do pulmão encontra-se esquematizada na Tabela 10 e na Figura 8.

Tabela 10: Avaliação do Edema Agudo Pulmonar por meio do índice determinado pela relação entre a massa do pulmão e a massa corpórea dos ratos dos grupos: controle (200 µL de salina i.v.), TS-MG (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais em 200 µL de salina i.v.), TS-DF (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente do Distrito Federal em 200 µL de salina i.v.). Todos os dados são expressos em média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) utilizando o teste F (paramétrico).

Grupo (n)	Massa Corpórea do Animal (g) (média, ± E.P.M.)	Massa do Pulmão (g) (média, ± E.P.M.)	Índice Pulmão/ corpo (± E.P.M.)
Controle (6)	244 ± 7,37	1,10 ± 0,08	0,45 ± 0,02
TS-MG (6)	236 ± 7,77	1,26 ± 0,07	0,53 ± 0,02**
TS-DF (6)	235 ± 4,47	1,03 ± 0,07	0,43 ± 0,03 [#]

** TS-MG em comparação com Controle (p<0,001)

[#] TS-DF em comparação com o TS-MG (p<0,001)

A relação entre a massa pulmonar e a massa corpórea dos ratos do grupo TS-MG, quando comparada com a aquela obtida para os animais do controle, aumentou significativamente (p<0,001). O mesmo foi verificado em relação ao grupo TS-DF (p<0,001) (TABELA 10 e FIGURA 8).

Avaliando os resultados contidos na Tabela 9 e na Figura 7, observa-se que a relação entre a massa pulmonar e a massa corpórea dos ratos do grupo TS-DF não

sofreu aumento considerável quando comparada a mesma relação para animais do grupo controle ($p > 0,05$), demonstrando que, diferentemente da peçonha de *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais, a peçonha desta mesma espécie proveniente do Distrito Federal não foi capaz de induzir edema agudo pulmonar em ratos segundo a metodologia empregada.

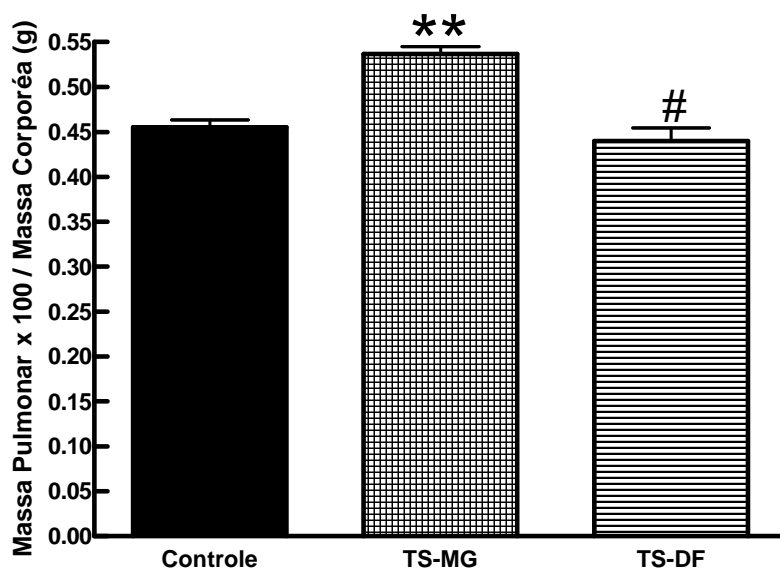


Figura 7: Avaliação do Edema Agudo Pulmonar dos grupos controle $n=6$ (200 μ L de salina i.v.), TS-MG, $n=6$ (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais em 200 μ L de salina i.v.) e TS-DF, $n=6$ (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente do Distrito Federal em 200 μ L de salina i.v.). ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey (** $p < 0,001$ TS-MG em comparação com o Controle e # $p < 0,001$ TS-DF em comparação com o TS-MG).

5.2.1 Análise Morfológica

Analisando os pulmões de todos os animais do grupo controle foram observadas algumas alterações, como espessamento leve e focal de septos alveolares, acompanhado de alguns poucos focos hemorrágicos (FIGURA 8-A).

As mesmas alterações apresentadas nos tecidos pulmonares dos animais do grupo controle foram visualizadas nos animais do grupo TS-DF (FIGURA 8-B), ou

seja, comparando-se os tecidos pulmonares desses dois grupos não foram observadas diferenças morfológicas.

Entretanto, a morfologia dos pulmões dos animais pertencentes ao grupo TS-MG, foi possível observar que, de 6 animais, 5 apresentaram edema pulmonar multifocal intra-alveolar, caracterizado por alvéolos dilatados contendo em seu interior líquido e precipitado plasmático, além de septos espessados por edema intersticial e congestão dos capilares, como pode ser visualizado na Figura 8-C. No único animal do grupo TS-MG que não apresentou edema pulmonar, foram observadas congestão capilar grave e hemorragia multifocal (FIGURA 8-D), caracterizada pela presença de hemácias distribuídas nos espaços intersticiais e na luz dos alvéolos. Essas alterações normalmente precedem o surgimento do edema pulmonar.

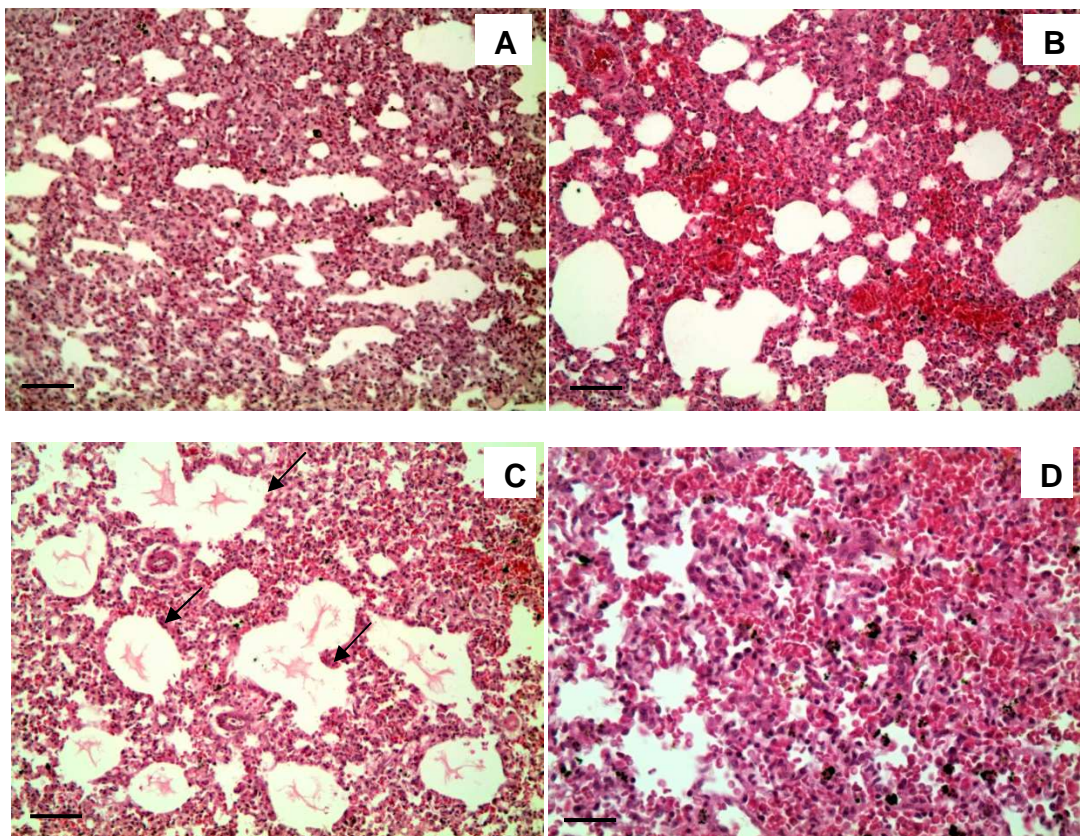


Figura 8: Fotomicrografia representante da histologia do pulmão de ratos 1 h após a injeção i.v. da peçonha de TS-DF (0,5 mg / kg), TS-MG (0,5 mg / kg), salina 0,5%. Em (A) grupo controle e em (B) grupo TS-DF, ambos com espessamento de septos alveolares e hemorragia focal. Em (C) grupo TS-MG com edema pulmonar intra-alveolar multifocal (setas) e em (D) grupo TS-MG com congestão capilar grave e hemorragia multifocal (HE, 200X), barra de escala 100 μ m.

Comparando-se a presença de edema pulmonar entre os dois pulmões (direito e esquerdo) dos animais do grupo TS-MG, foi possível visualizar um leve predomínio na presença de edema pulmonar no pulmão esquerdo, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Dados não mostrados).

Os tecidos cardíacos dos animais dos grupos TS-MG (FIGURA 9-A) e TS-DF (FIGURA 9-B) não se apresentaram morfologicamente alterados quando comparados aos tecidos cardíacos dos animais do grupo controle (FIGURA 9-C).

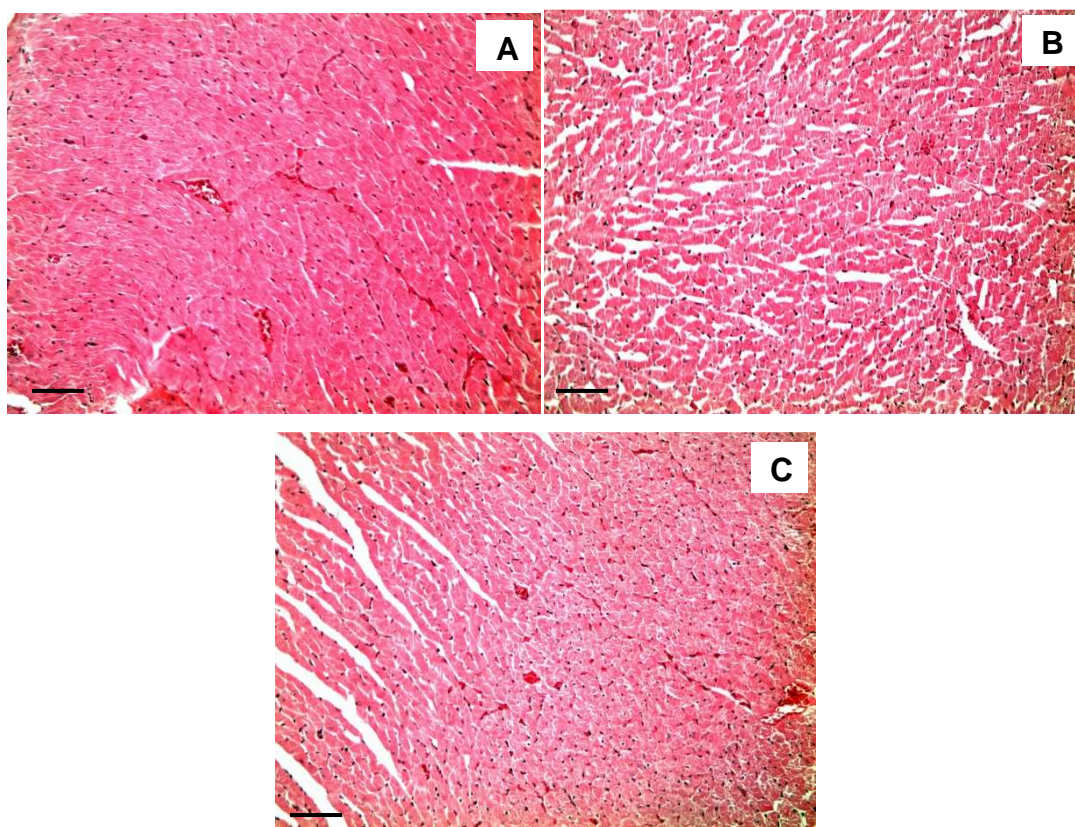


Figura 9: Fotomicrografia representativa da histologia do coração de ratos 1 h após a injeção i.v. da peçonha de *T. serrulatus* (0,5 mg / kg) e Controle (salina 0,5%). TS-MG (A), TS-DF (B) Controle (C). Sem alterações morfológicas (HE, 200X), barra de escala (100 μ m).

5.2.2 Dosagens séricas de CK e CK-MB

As médias das concentrações séricas de CK e de sua isoenzima CK-MB nos ratos tratados e não tratados com peçonha das duas populações de *T. serrulatus* estudadas encontram-se apresentadas na Tabela 11 e nas Figuras 10 e 11.

Tabela 11: Valores de Creatina Quinase (CK) e sua isoenzima (CK-MB) no soro de ratos. Grupo controle (200 µL de salina i.v.), TS-MG (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais em 200 µL de salina i.v.), TS-DF (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente do Distrito Federal em 200 µL de salina i.v.). Dados apresentados como média ± erro padrão da média utilizando teste F (paramétrico).

Grupo (n)	Creatina Quinase	Isoenzima
	CK (U/L) (média, ± E.P.M.)	CK-MB (U/L) (média, ± E.P.M.)
Controle (6)	1067,5 ± 115	290 ± 82
TS-MG (6)	2192 ± 365*	810 ± 392*
TS-DF (6)	1028 ± 135 [#]	295 ± 81 [#]

** TS-MG em comparação com Controle ($p < 0,001$)

[#] TS-DF em comparação com o TS-MG ($p < 0,001$)

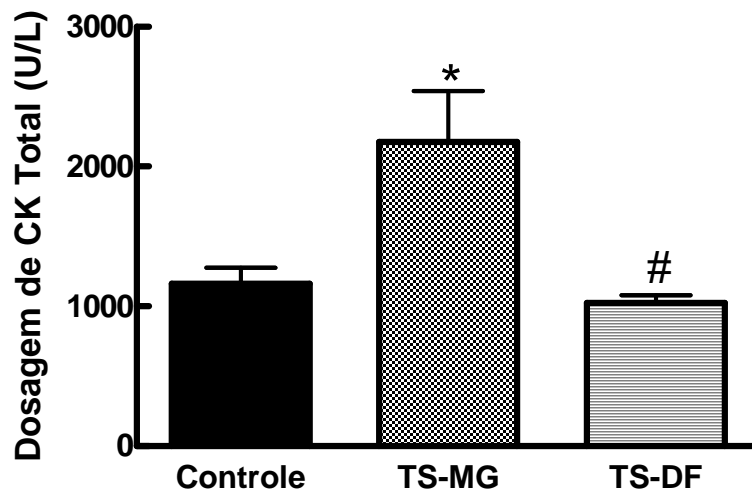


Figura 10: Dosagem de Creatina Quinase (CK) em soro de ratos dos grupos controle n=6 (200 µL de salina i.v.), TS-MG n=6 (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais em 200 µL de salina i.v.) e TS-DF n=6 (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente do Distrito Federal em 200 µL de salina i.v.). ANOVA de uma via, seguida do teste de T (Tukey), * $p < 0,05$ TS-MG em comparação com o Controle e [#] $p < 0,01$ TS-DF em comparação com o TS-MG.

As concentrações séricas de CK dos animais do grupo TS-MG apresentaram-se duas vezes maiores que as quantificadas para os ratos do grupo controle. As concentrações séricas da isoenzima CK-MB apresentaram-se quase três vezes (2,8) maiores nos animais do grupo TS-MG que as determinadas no grupo controle.

Nos animais do grupo TS-DF não foram encontradas diferenças significativas nas dosagens séricas de CK e de CK-MB em relação aos valores do grupo controle.

Analisando as Figuras 10 e 11, observa-se que as concentrações séricas de CK e de CK-MB aumentaram significativamente nos animais pertencentes ao grupo TS-MG quando comparados ao controle ($p < 0,05$), enquanto que não foram observadas diferenças nas concentrações destas enzimas nos animais pertencentes ao grupo TS-DF quando comparados ao controle ($p > 0,05$).

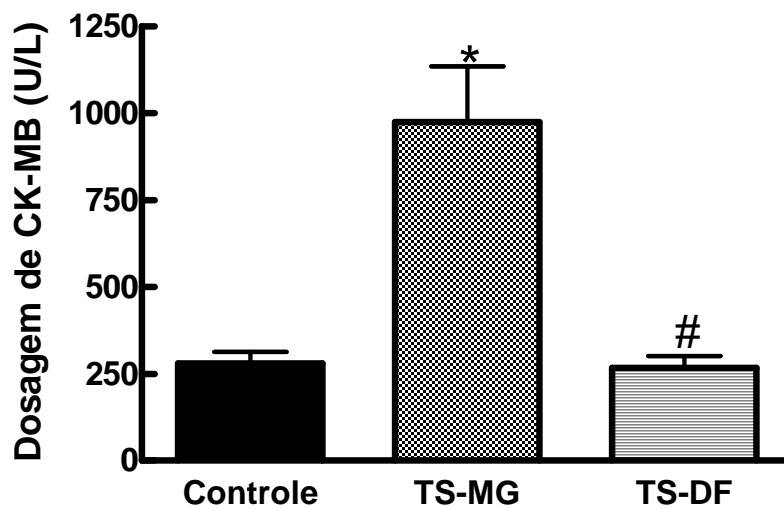


Figura 11: Dosagem da Isoenzima (CK-MB) em soro de ratos dos grupos controle $n=6$ (200 μL de salina i.v.), TS-MG $n=6$ (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais em 200 μL de salina i.v.) e TS-DF $n=6$ (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente do Distrito Federal em 200 μL de salina i.v.). ANOVA de uma via, seguida do teste T (Tukey), * $p < 0,05$ TS-MG em comparação com o Controle e # $p < 0,01$ TS-DF em comparação com o TS-MG.

5.2.3 Avaliação das Alterações na Permeabilidade Vascular Pulmonar e Contagem de Leucócitos Totais

5.2.3.1 Quantificação de Azul de Evans no pulmão

A quantidade de azul de Evans determinada nos pulmões dos animais tratados e não tratados com peçonha de *T. serrulatus* encontra-se ilustrada na Figura 12.

Os animais do grupo TS-MG apresentaram uma maior quantidade deste corante no pulmão ($3,52 \pm 0,08$ absorbância) quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$) ($1,31 \pm 0,08$ absorbância) e ao grupo TS-DF ($p < 0,001$) ($1,41 \pm 0,08$ absorbância). Não foi observada diferença significativa na presença de azul de Evans nos pulmões dos animais pertencentes ao grupo TS-DF quando comparados ao grupo controle ($p > 0,05$).

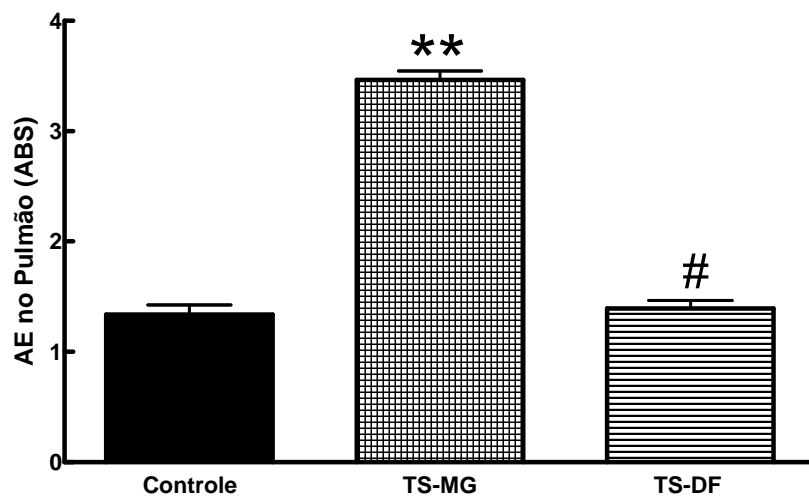


Figura 12: Quantificação do Azul de Evans no Pulmão de ratos dos grupos controle n=6 (200 μ L de salina i.v.), TS-MG n=6 (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais em 200 μ L de salina i.v.) e TS-DF n=6 (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente do Distrito Federal em 200 μ L de salina i.v.). ANOVA de uma via, seguida do teste T (Tukey), ** $p < 0,001$ TS-MG em comparação com o Controle e # $p < 0,001$ TS-DF em comparação com o TS-MG.

Estes resultados indicam que a peçonha de *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais induz aumento da permeabilidade vascular pulmonar, enquanto que a peçonha desta mesma espécie proveniente do Distrito Federal não foi capaz de induzir um aumento significativo da permeabilidade vascular pulmonar em ratos.

5.2.3.2 Quantificação de Azul de Evans no Lavado Bronco Alveolar

Conforme mostra a Figura 13 é possível verificar uma quantidade significativamente maior do corante azul de Evans no lavado bronco alveolar dos pulmões dos animais do grupo TS-MG ($0,20 \pm 0,10$ absorvância) quando comparados ao grupo controle ($0,06 \pm 0,006$ absorvância) ($p < 0,05$) e ao grupo TS-DF ($0,08 \pm 0,005$ absorvância) ($p < 0,05$).

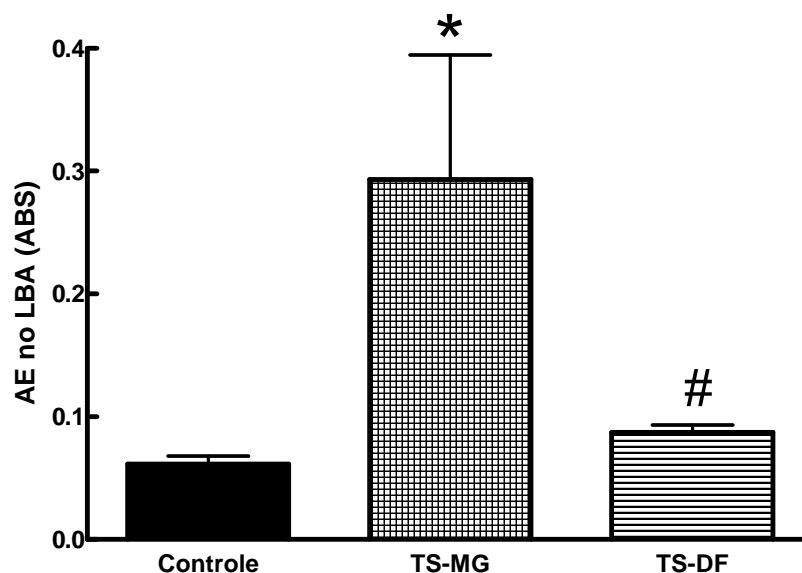


Figura 13: Quantificação do Azul de Evans no Lavado Bronco Alveolar de ratos dos grupos controle n=6 (200 µL de salina i.v.), TS-MG n=6 (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais em 200 µL de salina i.v.) e TS-DF n=6 (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente do Distrito Federal em 200 µL de salina i.v.). ANOVA de uma via, seguida do teste T (Tukey), * $p < 0,05$ TS-MG em comparação ao Controle e # $p < 0,05$ TS-DF em comparação ao TS-MG.

Assim como foi verificado nos pulmões dos ratos tratados e não tratados com peçonha de *T. serrulatus*, estes resultados também indicam que a peçonha da população deste escorpião proveniente de Minas Gerais é capaz de induzir um aumento na permeabilidade vascular pulmonar, enquanto que a peçonha desta mesma espécie proveniente do Distrito Federal não foi capaz de induzir alterações significativas na permeabilidade vascular pulmonar de ratos.

5.2.4 Contagem Total de Leucócitos

A Figura 14 ilustra a quantidade total de leucócitos encontrada no lavado bronco alveolar de ratos tratados e não tratados com peçonha de *T. serrulatus*.

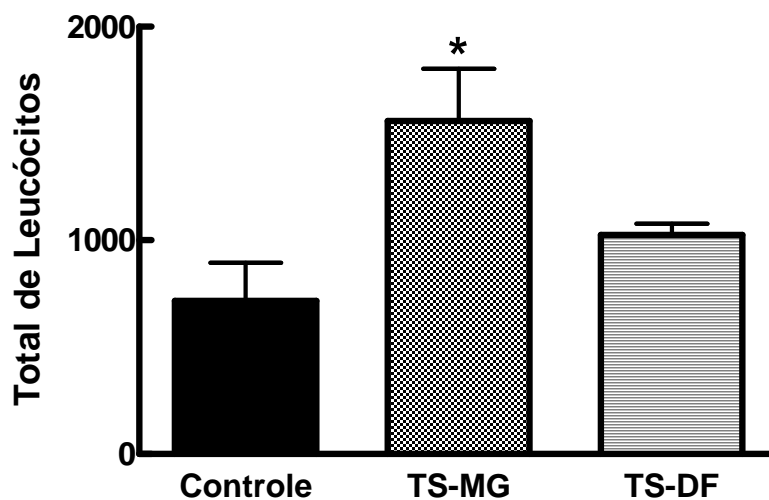


Figura 14: Quantificação de leucócitos totais no Lavado Bronco Alveolar de ratos dos grupos controle n=6 (200 μ L de salina i.v.), TS-MG n=6 (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais em 200 μ L de salina i.v.) e TS-DF n=6 (0,5 mg / kg de peçonha de *T. serrulatus* proveniente do Distrito Federal em 200 μ L de salina i.v.). ANOVA de uma via, seguida do teste T (Tukey), *p<0,05 TS-MG em comparação com o Controle.

Verificou-se que o lavado bronco alveolar dos animais do grupo TS-MG (1425 ± 245) apresentou mais que o dobro de leucócitos totais quando comparado ao do grupo controle ($600 \pm 179,6$) ($p < 0,05$). A quantidade de leucócitos totais presentes no lavado bronco alveolar dos animais do grupo TS-DF ($975 \pm 52,8$), embora um pouco aumentada em relação ao grupo controle, não foi considerada estatisticamente diferente ($p > 0,05$).

5.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PEÇONHA BRUTA

Os dois perfis cromatográficos obtidos do fracionamento de 1 mg da peçonha de *T. serrulatus* do Distrito Federal apresentaram-se idênticos (resultado não mostrado), evidenciando a separação de pelo menos, 56 frações cromatográficas, o mesmo foi verificado nos dois perfis cromatográficos obtidos a partir do fracionamento de 1 mg da peçonha de *T. serrulatus* de Minas Gerais.

Comparando-se o perfil cromatográfico obtido a partir do fracionamento da peçonha da população de *T. serrulatus* proveniente de MG com o perfil obtido do fracionamento da peçonha desta mesma espécie procedente do DF foi possível verificar diferenças quantitativas em algumas frações cromatográficas (FIGURA 15). Embora os perfis cromatográficos obtidos para as duas peçonhas sejam bastante parecidos, muitas das frações apresentam-se em maior quantidade no perfil obtido com a peçonha de *T. serrulatus* de Minas Gerais (FIGURA 15 – vermelho), com maiores diferenças observadas nos tempos de retenção entre 35 a 40 minutos.

Observando-se o perfil cromatográfico da peçonha de TS-DF (FIGURA 15 – preto), nota-se que as frações com tempos de retenção de 23 e 34 minutos, apresentaram-se em maior quantidade que as observadas em TS-MG.

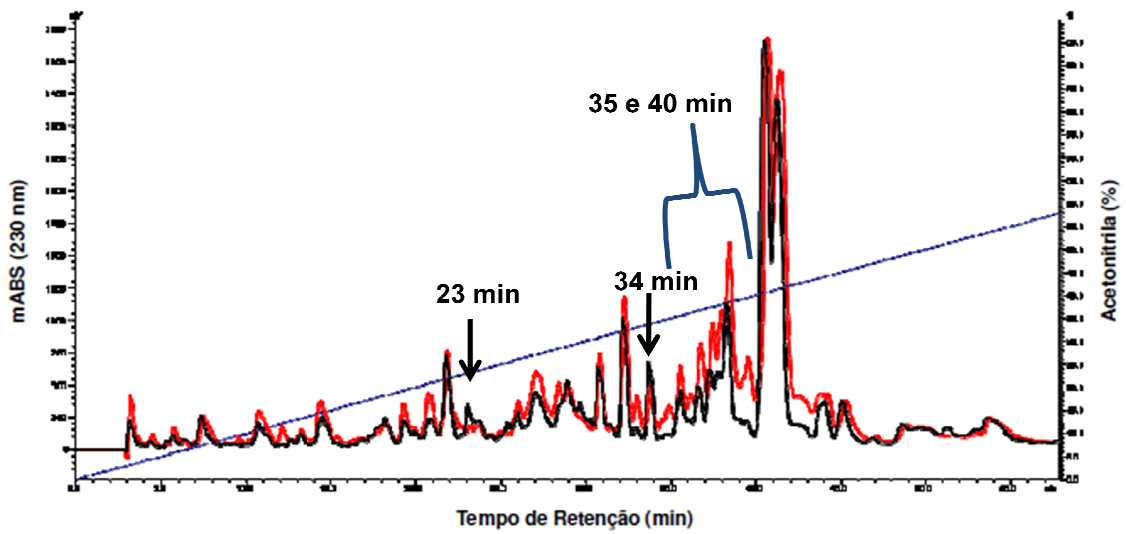


Figura 15: Perfis cromatográficos obtidos do fracionamento de 1 mg da peçonha de *T. serrulatus* procedente de Minas Gerais (vermelho) e do Distrito Federal (preto) em RP-HPLC utilizando-se de uma coluna de fase reversa analítica C18 (Phenomenex®).

6 DISCUSSÃO

De acordo com Motta (2006), o cerrado é um dos biomas brasileiros que apresenta o maior impacto antrópico e que vem perdendo rapidamente as suas áreas naturais.

Após a construção da cidade de Brasília, que foi inaugurada em 1960, a escorpiofauna da região vem sendo modificada. Nas áreas onde antes só eram encontrados *T. fasciolatus*, *Ananteris balzanii* e *Bothriurus araguayae*, hoje também ocorre *T. serrulatus*, que, por sua vez, pode ter afetado e até diminuído o crescimento populacional das outras espécies (LOURENÇO, 1975; LOURENÇO *et al.*, 1994). *T. serrulatus* foi provavelmente introduzido no Distrito Federal em meados da década de 70, sendo hoje facilmente encontrado em vários ambientes urbanos do DF, o que facilitou as coletas durante esse trabalho (LOURENÇO *et al.*, 1994).

Três métodos de extração de peçonha de escorpião têm sido utilizados: 1º) amputação, trituração e posterior maceração do télson em água; 2º) Estimulação manual do télson; 3º) estimulação elétrica (SISSOM, 1990; BARONA *et al.*, 2004; POSSANI *et al.*, 2010).

O método adotado neste trabalho foi a estimulação elétrica do télson, pois esse procedimento permite manter a integridade dos animais e, desta forma, realizar várias extrações em um mesmo animal, além de possibilitar a obtenção de maior quantidade de peçonha. A DL₅₀ da peçonha de *T. serrulatus* já foi determinada por diferentes autores. Bücherl (1978) obteve uma DL₅₀ de 16 µg/camundongo após 48 horas da injeção i.p. da peçonha. Nishikawa e colaboradores (1994) obtiveram a DL₅₀ de 25,53 µg/camundongo, também via i.p. após 48 horas. Kalapothakis e Chavez-Olórtegui (1997) obtiveram uma DL₅₀ de 12,49 µg/camundongo i.p. após 48 horas da injeção da peçonha. Nenhum desses autores mencionou a procedência da população de *T. serrulatus* da qual foram obtidas as peçonhas estudadas. No entanto, é provável que tenha sido de espécimes provenientes da região Sudeste do Brasil, devido à maior ocorrência desses animais nesta região e ao fato desses pesquisadores terem desenvolvido esses estudos em Instituições situadas no Sudeste.

No presente estudo, a DL₅₀ obtida para a peçonha de *T. serrulatus* proveniente de Minas Gerais foi de 26 µg/camundongo após 48 horas da injeção i.p., valor muito semelhante ao obtido por Nishikawa e colaboradores (1994). A peçonha dessa mesma espécie proveniente do Distrito Federal, por sua vez, apresentou a DL₅₀ de 51,6 µg/camundongo, sendo, portanto, quase duas vezes (1,98) menos tóxica do que a peçonha dos animais procedentes de Minas Gerais, conforme determinado neste estudo e por Nishikawa e colaboradores (1994).

Silva e colaboradores (2005a) obtiveram a DL₅₀ de 96,16 µg/camundongo após 48 horas da injeção intraperitoneal da peçonha de *T. serrulatus* procedente da Bahia, indicando que a peçonha dos animais da Bahia é, pelo menos, quase 4 vezes menos tóxica que a peçonha dos animais do Sudeste.

Fatores como o tempo de observação dos animais para obtenção da DL₅₀, a via de administração da peçonha, as condições de armazenamento da peçonha, bem como o local de origem dos escorpiões podem resultar em toxicidades diferentes das peçonhas de *T. serrulatus*.

As peçonhas das duas populações de *T. serrulatus* estudadas no presente trabalho induziram alterações fisiológicas e comportamentais semelhantes nos camundongos, confirmando a ação neurotóxica já descrita para a peçonha bruta dessa espécie. Silva e colaboradores (2005b) também observaram em camundongos injetados com peçonha de *T. serrulatus* procedente da Bahia várias alterações como hiperatividade, taquipnéia, letargia, congestão ocular, piloereção e sialorréia, mesmo esta peçonha se mostrando ser até 4 vezes menos tóxica do que a da mesma espécie de outras regiões do país.

Magalhães e colaboradores (1998) verificaram que a toxina TsTx-1 isolada de *T. serrulatus* induziu em camundongos várias alterações como piloereção, taquipnéia, hiperatividade, marcha atáxica, sialorréia, secreção uretral leitosa e dispnéia severa, e atribuíram a presença desses distúrbios à liberação excessiva de catecolaminas.

De fato, TsTx-1 é uma toxina bastante abundante na peçonha desta espécie e de acordo com Pessini e colaboradores (2001) representa cerca de 15% do total da peçonha e altera a função fisiológica dos canais Na_v, sendo responsável por grande parte dos sinais e sintomas visualizados no envenenamento (BARHANING *et al.*,

1982, 1984; JONAS *et al.*, 1986). Vasconcelos e colaboradores (2005) verificaram que esta toxina apresentou uma DL₅₀ (76 µg / kg).

Observou-se que as alterações fisiológicas em camundongos após injeções i.p. das peçonhas de TS-MG e TS-DF foram dose-dependentes, o que também foi observado por Magalhães e colaboradores (1998) a partir de injeções de TsTx-1. Assim, quanto maior a dose de peçonha bruta injetada nos camundongos, maior foi a quantidade de toxinas que atuam canais para Nav encontradas nessas doses, entre as quais a Ts-Tx-1.

Como os sintomas observados em escorpionismo são atribuídos a liberação maciça de catecolaminas devido a ação dos neuropeptídios nos canais iônicos, uma maior quantidade de NaScTx, encontrada nas maiores doses injetadas nos camundongos pode ter suscitado mais frequentemente o aparecimento de sintomas.

Rezende *et al.* (1994) sugeriram que a gravidade do envenenamento em pacientes picados por *T. serrulatus* estaria relacionada à concentração da peçonha no plasma. Chávez-Olortegui *et al.* (1994) utilizando radioimunoensaio para detecção de componentes da peçonha de *T. serrulatus*, não foram capazes de detectar a presença dos mesmos no plasma sanguíneo de pacientes vítimas de escorpionismo leve, que apresentaram apenas dor no local da picada. Por outro lado, em pacientes com sinais e sintomas de envenenamento moderado e grave foi possível detectar a presença desses componentes, indicando que existe uma relação direta entre a quantidade de peçonha inoculada ou circulante no plasma e a gravidade do envenenamento.

Sandoval e Dorce (1993) observaram convulsões e alterações na atividade elétrica cerebral em ratos após injeções intracerebroventriculares da peçonha de *T. serrulatus*. Injeções i.c.v. de TsTx-K induziram atividade convulsiva contínua em ratos (estado epiléptico) (JUNG *et al.*, 1999).

Injeções intraperitoneais das peçonhas das duas populações de *T. serrulatus* estudadas no presente trabalho induziram convulsões e, posteriormente, morte dos camundongos sugerindo que componentes da peçonha sejam capazes de atingir o SNC ultrapassando a barreira hemato-encefálica. Alguns poucos relatos de convulsões e de acidente vascular cerebral em humanos picados por escorpiões reforçam essa hipótese (CUPO *et al.*, 2009; DERKAOUÍ *et al.*, 2011).

Intensa sialorréia foi observada nos camundongos que receberam as peçonhas de TS-DF e TS-MG, reforçando o que já havia sido descrito em camundongos (CATANZARO *et al.*, 1978) e humanos (CAMPOS *et al.*, 1980). Catanzaro *et al.* (1978) e Andrade e colaboradores (1981) sugeriram que a indução de sialorréia em camundongos e ratos pela peçonha de escorpião estaria relacionada a várias alterações morfológicas nas glândulas submandibulares, tais como a presença exacerbada de vacúolos e um reduzido número de grânulos secretores, que poderiam ter surgido pela ação direta da peçonha ou mesmo devido à ação das catecolaminas circulantes.

As alterações morfológicas que foram observadas nos pulmões de ratos do grupo controle e do grupo experimental (TS-DF) foram idênticas e provavelmente ocorreram devido ao manuseio desses tecidos moles antes de serem fixados em formol a 10 %, os mesmos não puderam ser fixados ainda no animal devido a necessidade de pesá-los antes da fixação.

De Matos *et al.* (1997) relataram que injeções intravenosas de 0,5 mg / kg, da peçonha do escorpião *T. serrulatus* causaram grave edema intersticial e intra-alveolar em todos os ratos experimentados .

No presente estudo, a peçonha de *T. serrulatus* procedente de Minas Gerais induziu edema pulmonar grave intra-alveolar e multifocal em cinco dos seis ratos experimentados.

Silva e colaboradores (2005a e b), avaliando a capacidade de indução de edema pulmonar agudo após injeções da peçonha de *T. serrulatus* procedente da Bahia (0,4 ou 0,8 mg/kg i.v. e i.p.), verificaram por meio da determinação do índice massa pulmonar / massa corpórea e por avaliação histopatológica, que esta peçonha não induziu edema pulmonar em ratos.

Da mesma forma, a peçonha de TS-DF (0,5 mg/kg i.v.), quando injetada em ratos, não foi capaz de induzir edema agudo pulmonar quando avaliado pelas mesmas metodologias.

De Matos *et al.* (1997) observaram que injeções intravenosas de peçonha de *T. serrulatus* em ratos induzem edema pulmonar agudo geralmente de forma bilateral pois, de quatro ratos experimentados, três apresentaram edema pulmonar

bilateral e apenas um desenvolveu edema pulmonar unilateral (esquerdo). De igual modo, a peçonha de TS-MG foi capaz de induzir edema agudo pulmonar bilateral, com um leve predomínio na presença de edema pulmonar unilateral esquerdo, no entanto, essa diferença não se mostrou significativa.

Em humanos vítimas de escorpionismo grave, há ocorrência de edema pulmonar agudo unilateral e bilateral, sendo esse último mais frequentemente observado (AMARAL *et al.*, 1993; RAZI E MALEKANRAD, 2008).

Vários estudos foram realizados com intuito de melhor entender a patogênese do edema pulmonar induzido por peçonha escorpiônica. Alguns autores sugeriram que o surgimento deste edema poderia decorrer da ativação de mecanismos cardiogênicos e não cardiogênicos (AMARAL *et al.*, 1993; FREIRE-MAIA *et al.*, 1994).

Um possível mecanismo cardiogênico seria a insuficiência ventricular esquerda, induzida pela hipertensão arterial que pode ser desenvolvida como consequência da liberação maciça de catecolaminas ou dano miocárdico induzido pela ação direta da peçonha. Além disso, foi relatado que a estimulação dos receptores alfa-adrenérgicos poderia levar à supressão da secreção de insulina e danificar o coração, induzindo o surgimento de edema pulmonar agudo (GUERON e YARON, 1970; FREIRE-MAIA *et al.*, 1970, 1976, 1978, 1994; GUERON *et al.*, 1980; DE MATTOS *et al.*, 1997, 2001; JOY, 2009).

Vários autores relatam evidências da ação da peçonha de *T. serrulatus* na musculatura cardíaca, mostrada por alterações histológicas em animais experimentais e humanos (CORRÊA *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2001; CARDOSO *et al.*, 2003).

Benvenuti e colaboradores (2002) publicaram um relato de caso de uma criança de 4 anos picada por *T. serrulatus* no interior de São Paulo que apresentou dor abdominal, agitação física, vômitos, sibilos e taquicardia atrial. A criança foi tratada com anestésico local, corticosteróides e soro antiescorpiônico (cinco ampolas), ainda assim foi a óbito por parada cardíaca por volta de 6 horas após o acidente. Amostras de tecido (coração e pulmão) foram processadas por microscopia eletrônica de transmissão, que evidenciaram proeminente congestão

capilar e edema pulmonar agudo alveolar e, no miocárdio, foram observadas áreas microscópicas de hemorragias recentes (múltiplos focos individuais) e necrose miocárdial (miocitólise coagulativa).

Recentemente, Pinto e colaboradores (2010b), estudando os efeitos da peçonha de *T. fasciolatus* sobre o coração de ratos, observaram alterações de ECG e aumento nas concentrações séricas da enzima CK e de sua isoenzima CK-MB, sem, no entanto, observarem, por microscopia óptica, alterações histológicas nos tecidos cardíacos.

Em um estudo hematológico e bioquímico realizado em ratos após injeções i.v. de peçonha de *T. serrulatus*, Pinto e colaboradores (2010a) observaram níveis elevados de CK e CK-MB. De maneira semelhante, os animais que receberam injeções de TS-MG apresentaram níveis elevados de CK e CK-MB e ausência de alterações na histologia cardíaca quando avaliados por microscopia óptica, nos permitindo inferir que provavelmente ocorreram alterações a nível molecular nos tecidos cardíacos, mas que não puderam ser visualizadas por microscopia óptica.

Por outro lado, os animais submetidos a injeções de TS-DF não apresentaram níveis elevados de CK e CK-MB. Também não foram observadas alterações histológicas nos tecidos cardíacos desses animais quando comparados ao controle, nem edema pulmonar agudo, conforme mencionado anteriormente.

Outro mecanismo sugerido para explicar a patogênese do edema pulmonar em resposta à peçonha de *T. serrulatus* é a liberação de substâncias vasoativas (prostaglandina E₂, leucotrieno B₄ e tromboxane A₂) induzida pela peçonha, que provoca o aumento da permeabilidade vascular pulmonar e, conseqüentemente, o surgimento do edema pulmonar agudo (FREIRE-MAIA *et al.*, 1970, 1976, 1994; DE MATTOS *et al.*, 1997).

De Matos e colaboradores (2001) verificaram um aumento significativo na permeabilidade vascular pulmonar, avaliada por meio do extravasamento de azul de Evans no lavado bronco alveolar e no parênquima pulmonar, de ratos injetados com peçonha de *T. serrulatus* (0,5 mg/kg). No presente estudo, a mesma dose da peçonha de TS-MG induziu aumento na permeabilidade vascular pulmonar.

No entanto, os animais submetidos a injeções de TS-DF, na mesma dose, não apresentaram tais alterações no extravasamento de azul de Evans no fluido bronco alveolar e no parênquima pulmonar. Uma vez que a peçonha de TS-DF não induziu edema pulmonar, pode, de fato, existir uma correlação entre o aumento da permeabilidade vascular pulmonar e o surgimento do edema agudo pulmonar induzido pela peçonha de *T. serrulatus*.

Deste modo, a menor toxicidade da peçonha de TS-DF, aliada à incapacidade de indução de edema agudo pulmonar em ratos, poderia justificar a ausência de sinais e sintomas clínicos de escorpionismo grave e óbito em pacientes picados por escorpião no DF. Porém, cabe ressaltar que o escorpionismo no DF não pode ser negligenciado, pois a presença crescente de *T. serrulatus* nesta região pode, com o tempo, suscitar o surgimento de um problema de saúde pública.

Foi observada a presença de leucócitos na lavado bronco-alveolar de ratos que receberam injeções de TS-MG ($p < 0,05$). No entanto, tal resposta não foi verificada nos ratos injetados com TS-DF ($p > 0,05$), da mesma maneira que em estudos prévios realizados por De Matos *et al.* (1999). Esses autores não observaram aumento significativo no número total de leucócitos do lavado pulmonar de ratos injetados com peçonha de *T. serrulatus*. Deste modo, os autores sugeriram que o recrutamento de leucócitos não desempenharia papel importante no desenvolvimento do edema pulmonar agudo.

No entanto, estudos mais recentes têm mostrado que a peçonha de *T. serrulatus* estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e KC (quimiocinas derivadas de queratinócitos), assim como a atividade de MPO (mieloperoxidase e óxido nítrico) e infiltrados de células poli- e morfonucleares (COMELLAS *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004, 2007; COELHO *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2009). Desta forma, provavelmente o recrutamento leucocitário esteja relacionado ao surgimento do edema pulmonar.

Para tentar explicar as diferenças na toxicidade e atividade biológica entre as peçonhas de TS-MG e TS-DF, ambas foram submetidas ao fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência e os perfis cromatográficos comparados.

O perfil cromatográfico é uma impressão digital da composição da peçonha, pois componentes similares eluem em tempos de retenção similares. Desse modo,

a comparação dos perfis cromatográficos de peçonhas da mesma espécie é bastante interessante para evidenciar variações intra-específicas.

De fato, D'Suze e Sevcik (2010), analisando os perfis cromatográficos de diferentes espécimes de *T. discrepans* e comparando-os a cromatogramas obtidos de outras espécies do mesmo gênero, observaram variações quantitativas intra-específicas e interespecíficas e inferiram que essa variabilidade reflete a capacidade desses escorpiões de produzir quantidades e tipos diferentes de peptídeos, em resposta, por exemplo, à pressão ambiental.

Comparando os perfis cromatográficos obtidos do fracionamento de 1 mg de peçonha de TS-MG e TS-DF, foram observadas diferenças quantitativas, que, de forma geral, mostraram uma maior quantidade de peptídeos em várias frações cromatográficas da peçonha de TS-MG, particularmente naquelas que eluíram nos tempos de retenção entre 35 e 40 minutos. Tem sido mostrado por vários autores que é nessa região do cromatograma que elui a maioria das toxinas de cadeia longa com massas moleculares entre 6.500 e 7.500 Da e que atuam em canais para Na⁺ (PIMENTA *et al.*, 2001). Estas toxinas são responsáveis pela maioria dos sinais e sintomas no escorpionismo humano e experimental, demonstrando que a peçonha de TS-MG provavelmente contém uma quantidade maior de toxinas capazes de afetarem os canais para Na⁺ voltagem-dependentes e, com isso induzirem sintomas mais graves durante o envenenamento dos ratos e camundongos experimentados.

As duas únicas exceções de frações cromatográficas que se apresentaram mais abundantes na peçonha de TS-DF em comparação à de TS-MG foram as frações que eluíram nos tempos de retenção de 23 e 34 min. Algumas toxinas descritas com cadeia curta (2.500 e 5.000 Da) com provável ação em canais para K⁺ tem sido encontradas nesta região do cromatograma (PIMENTA *et al.*, 2001). Estas toxinas provavelmente desempenhem papel secundário no escorpionismo.

De acordo com Rodríguez de La Vega *et al.* (2009), os componentes das peçonhas de escorpiões da família Buthidae podem ser divididas segundo suas massas moleculares em dois grandes grupos: componentes com 3.001-4.500 Da (KTx - toxinas de cadeia curta bloqueadoras de canais para K⁺) e 6.001-7.500 Da (NaScTx – toxinas de cadeia longa moduladoras de canais seletivos a Na⁺).

Pimenta *et al.* (2001) fracionaram a peçonha de *T. serrulatus* de Minas Gerais por meio de filtração em gel (Sephadex G50) e analisaram as frações II e III por espectrometria de massa (MALDI-TOFMS). Na fração II foi mostrada uma

predominância de componentes com massas moleculares entre 6.500 e 7.500 Da, que correspondem às NaScTxS e na fração III uma predominância de componentes com 2.500 e 5.000 Da, que são provavelmente as KTxs.

É fato que existem diferenças na peçonha de escorpiões e essas diferenças podem ser interespecíficas e intra-específicas, no entanto essa variabilidade é desconhecida, podendo estar relacionada com o sexo, idade, habitat, diferenças alimentares e outros desconhecidos fatores (D´SUSE e SEVCIK, 2010).

Provavelmente, as alterações encontradas na peçonha de *T. serrulatus* estejam relacionadas ao habitat, pois espécimes coletados em Minas Gerais, Bahia e Distrito Federal, apresentaram variações de toxicidade e de constituição da peçonha (SILVA *et al.*, 2005a,b).

No entanto, um fator que não pode deixar de ser considerado, é a diferença de sexo dos escorpiões, pois há registros de população de *T. serrulatus* partenogenética, onde só são conhecidas fêmeas (MATTHIESEN, 1962; SAN MARTIN & GAMBARDELLA, 1966), no entanto há a descrição de macho no Estado de Minas Gerais (LOURENÇO & CLOUDSLEY- THOMPSON, 1999). De acordo com Lourenço e Cloudsley-Thompson (1999), as populações de fêmeas partenogenéticas e machos descritos para MG não apresentam diferenças anatômicas e de padrão de coloração, não podendo ser distinguidas entre si por meio de observação direta ou com uso de chaves dicotômicas.

De Sousa *et al.* (2010) verificaram diferenças entre machos e fêmeas na produção e toxicidade da peçonha de escorpiões da espécie *Tityus nororientalis*, mostrando que os machos, apesar de produzirem uma quantidade maior de peçonha que as fêmeas, apresentam uma menor toxicidade da peçonha (DL₅₀ 13,36 µg/g) comparada à das fêmeas (DL₅₀ 9,46 µg/g). As análises de espectrometria de massa por MALDI-TOF revelaram diferenças na composição destas peçonhas.

Kalapothakis e Chávez-Olórtegui (1997), encontraram variações na peçonha bruta de *T. serrulatus* e na expressão de dois peptídeos obtidos desta peçonha (TsIV uma toxina do tipo α e TsIV-5 ou Tsγ uma toxina do tipo β) em três extrações realizadas no mesmo grupo de animais. Uma grande quantidade de TsIV foi obtida na primeira de três extrações de peçonha realizada durante o experimento e uma maior quantidade de TsIV-5 ou Tsγ foi observado na última extração. A DL₅₀ calculada utilizando-se o *pool* de peçonha obtida na primeira extração (maior quantidade de toxinas TsIV) foi menor, enquanto que, uma menor toxicidade foi

observada utilizando o *pool* de peçonha obtido da última extração que continha maior quantidade de TsIV-5 ou Tsy. Essa variabilidade individual na expressão de peptídeos contidos na peçonha pode ter implicação direta na toxicidade.

Diante do exposto e com base nos resultados obtidos até o momento, não há como afirmar os motivos para a variabilidade intra-específica observada nas peçonhas de *T. serrulatus* de diferentes localidades. No entanto, tal variabilidade pode significar que esta espécie é capaz de modificar a expressão de alguns componentes da peçonha sob diferentes condições ambientais. Essa capacidade poderia proporcionar vantagens para espécies com maior plasticidade na peçonha, pois isto poderia resultar em uma melhor adaptação a diferentes predadores e presas ou a influências sazonais e ambientais.

No entanto, estudos da genética reprodutiva da população de *T. serrulatus* existente no DF com intuito de verificar a existência unicamente de indivíduos partenogênicos nesta região do país, aliados a estudos mais aprofundados da expressão dos diferentes componentes da peçonha, poderão contribuir para o melhor entendimento dessa questão.

7 CONCLUSÕES

» A peçonha de *T. serrulatus* procedente do DF foi capaz de induzir alterações fisiológicas e comportamentais em camundongos semelhantes às aquelas desencadeadas pela peçonha procedente de MG. No entanto, a toxicidade da peçonha de *T. serrulatus* do DF em camundongos é quase duas vezes menor do que a da peçonha da mesma espécie procedente de MG.

» A peçonha de *T. serrulatus* proveniente do DF (0,5 mg / kg) foi incapaz de induzir edema pulmonar agudo em ratos, quando avaliado pelo índice de massa pulmonar / massa corpórea, pelo aumento da permeabilidade vascular pulmonar e pelas análises morfológicas, diferentemente da peçonha de animais de MG que, por sua vez, induziu grave comprometimento pulmonar.

» Por microscopia óptica, não foram visualizadas alterações nos tecidos cardíacos de ratos que foram submetidos a injeções de peçonha das duas populações estudadas. No entanto, aumento nas dosagens séricas de CK e CK-MB somente nos animais que receberam peçonha desta espécie procedente de MG é indicação de alterações no tecido cardíaco e estas alterações podem estar envolvidas na patogênese do edema agudo pulmonar induzido pela peçonha escorpiônica.

» Diferenças quantitativas em frações cromatográficas, obtidas do fracionamento da peçonha de *T. serrulatus*, particularmente naquelas com tempos de retenção semelhantes aos das toxinas que atuam em canais para Nav, podem explicar as diferenças na toxicidade e na atividade biológica entre as peçonhas de *T. serrulatus* do DF e de MG. Maior quantidade dessas frações pode resultar em uma peçonha mais tóxica e com capacidade de indução dos sintomas observados no escorpionismo grave e que são causa de óbito em humanos e animais de experimentação.

REFERÊNCIAS

- ABROUGH, F.; AYARI, M.; NOUIRA, S.; GAMRA, H.; BOUJDARIA, R.; ELASTROUS, S.; BEN FARHAT, M.; BOUCHACHA, S. Assesment of left ventricular function in severe scorpion envenomation: combined hemodynamic and echo-doppler study. **Care Medical**. V. 21, p. 629-635, 1995.
- ALBUQUERQUE, I. C. S.; ALBUQUERQUE, H. N.; ALBUQUERQUE, E. F.; NOGUEIRA, A. S.; CAVALCANTE, M. L. F. Escorpionismo em Campina Grande – PB. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. Vol. 4, n. 1, 2004.
- ALMEIDA, F. M.; PIMENTA, A. M.; DE FIGUEIREDO, S. G.; SANTORO, M.M.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; DINIZ, C. R.; DE LIMA, M. E. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. **Toxicon**. V. 40, n. 7, p. 1041-1045, 2002.
- ALVES, R. S.; NASCIMENTO, N. R. F.; BARBOSA, P. F. S.; KERNTOPF, M. R.; LESSA, L. M. A.; SOUSA, C. M.; MARTINS, R. D.; SOUSA, D. F.; QUEIROZ, M. G. R.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; MARTINS, A. M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon**. V. 46, p. 271–276, 2005.
- AMARAL, C.F.S.; LOPES, J.A.; MAGALHÃES, R.A.; REZENDE, N.A. Electrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial damage after *Tityus serrulatus* scorpion sting. **American Journal of Cardiology**. V. 67, p. 655-657, 1991.
- AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; FREIRE-MAIA, L. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. **American Journal of Cardiology**. V. 71, p. 242-245, 1993.
- AMARAL, C.F.; DIAS, M.B.; CAMPOLINA, D.; PROIETTI, F.A.; DE REZENDE, N.A. Children with adrenergic manifestations of envenomation after *Tityus serrulatus* scorpion sting are protected from early anaphylactic antivenom reactions. **Toxicon**. V. 32, p. 211-215, 1994

- ANDRADE, S.P.; SANTOS, R.A.S.; BERALDO, W.T. Comparative study of the action of purified scorpion toxin (tityustoxin) on the submandibular and parotid glands of the rat. **Toxicon**. V.19, p. 255-261, 1981.
- ANDRADE, H. P; PASQUALETTO, A. **Epidemia Urbana de *Tityus serrulatus* no Município de Trindade – Go**. NUPENGE, 2002. Disponível em: < http://www2.ucg.br/nupenge/pdf/artigo_05.pdf >. Acesso em: 15 set. 2008.
- ANDRADE, M. V.; CARAMEZ, M. P.; ABREU, E. M.; DOLNIKOFF, M.; OMAR, E. D.; VELASCO, I. T.; CUNHA-MELO, J. R. Lung compliance, plasma electrolyte levels and acid-base balance are affected by scorpion envenomation in anesthetized rats under mechanical ventilation. **Comparative Biochemistry, Physiology, Toxicology and Pharmacology**. V. 138, p. 97–104, 2004.
- ANDRADE, M. V.; LISBOA, F.A.; PORTUGAL, A. L.; ARANTES, R. M.; CUNHA-MELO, J. R. Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines. **Comparative Biochemistry, Physiology and Molecular**. V. 146, p. 581–587, 2007.
- ARANTES, E.C.; SAMPAIO, S.V.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. What is tityustoxin? **Toxicon**. V.30, p. 786-789, 1992.
- BARHANING, J.; GIGLIO, J. R.; LÉOPOLD, P.; SCHIMID, A.; SAMPAIO, S. V.; LAZDUNSKI, M. *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. *Tityus* gamma toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na⁺ channel. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 257, n. 21, p. 12553-12558, 1982.
- BARHANING, J.; IDELFONSE, M.; ROUGIER, O.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; LAZDUNSKI, M. *Tityus* gamma toxin, a high affinity effector of the Na⁺ channel in muscle, with a selectivity for channels in the surface membrane. **European Journal of Physiology**. V. 400, n.1, p. 22-27, 1984.
- BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7ª edição: Ed. Roca, São Paulo, p. 1168, 2005
- BARONA, J.; OTERO, R.; NÚÑEZ, V. Aspectos toxicológicos e imunológicos del veneno del escorpion *Tityus pachyurus* pocock de colombia: capacidad

neutralizante de antivenenos producidos en latinoamérica. **Biomédica**. V. 24, p. 42-49, 2004.

BARRAVIERA, B. Animais peçonhentos de importância médica no Brasil. **Jornal Brasileiro de Medicina**. V.68, n.1/2, p. 121-126, 1995.

BAWASKAR, H. S. Diagnostic cardiac premonitory signs and symptoms of red scorpion sting. **The Lancet**. V. 319, p. 552-554, 1982.

BECERRIL, B.; CORONA, M.; MEJIA, M. C.; MARTIN, B. M.; LUCAS, S.; BOLIVAR, F.; POSSANI, L. D. The genomic region encoding toxin gamma from the scorpion *Tityus serrulatus* contains an intron. **FEBS Lett**. V. 335, n.1, p. 6-8, 1993.

BEETON, C. *et al.* Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 98, p. 13942–13947, 2001.

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

BLANC, E.; LECOMTE, C.; RIETSCHOTENS, J. V.; SABATIER, J. M.; DARBON, H. Solution structure of TsKapa, a charybdotoxin-like scorpion toxin from *Tityus serrulatus* with high affinity for apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ channels. **Proteins**. V. 29, n. 3, p. 359-369, 1997.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 735- 746, 2002.

BOFF, G. J. Escorpiões. In: **Monografias em Toxicologia de Urgência/ org. centro de informação toxicológica – CIT/RS**. Porto Alegre: ATOX, 1999. V. 4 pgs 185-191.

- BOUAZIZ, M.; GUETAT, N.; CHELLY, H.; TRIKI, S.; JEDDI, H.M. Electrocardiogram (ECG) after severe scorpion sting (104 cases). **Toxicon**. V. 34, p. 57-158, 1996.
- BRANDÃO, R. A.; FRANÇOSO, R. D. Acidente por *Rhopalurus agamemnon* (Koch, 1839) (Scorpiones, Buthidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 43, n. 3, P. 342-344, 2010.
- BRASIL-MS. **Manual de Diagnostico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília: Ministério da Saúde, p. 37-44, 2001.
- BRASIL-MS. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, cap. 15, 2009.
- BRAZIL, V. Soro Antiescropiônico. **Memórias do Instituto Butantan**. V.1, p. 47-50, 1918.
- BRAZIL, T. K.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; PORTO, T. J.; AMORIM, A. N.; SILVA, T. F. Escorpiões de importância médica do estado da Bahia, Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**. V. 79 (Supl. 1), p. 38-42, 2009.
- BUCARETCHI, F.; BARACATT, E. C.; NOGUEIRA, R. J. N.; CHAVES, A.; ZAMBRONE, F. A. D.; FONSECA, M. R. C. C.; TOURINHO, F. S. Severe scorpion envenomation in children: a comparison study between *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. V. 37, p. 331-336, 1995.
- BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. Classification, biology and venom extraction of scorpions. In: BÜCHERL, W. (Ed.) **Venomous animals and their venoms**. Ed. Academic Press: New York. V.3. p. 37-347, 1971.
- BÜCHERL, W. Venoms of Tityinae. In BETTINI, S. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Cap. 14, p. 371-378, 1978.
- CAMPOLINA, D.; JANUÁRIO, M. C. **Acidentes por animais peçonhentos**. In: ERAZO – Manual de Urgências em Pronto Socorro. 7ª Ed. São Paulo e Minas Gerais, Editora Médica e Científica Ltda. 2002. Cap. 63, p. 769-782.
- CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. **Acidentes provocados por contatos com animais peçonhentos**. In: Atualização Terapêutica: Manual Prático de Diagnóstico e

- Tratamento. BORGES, D. R.; ROTHSCHILD, H. A. 22^a ed. São Paulo. Artes Médicas 2005.
- CAMPOS, J.A.; SILVA, O.A.; LOPEZ, M.; FREIRE-MAIA, L. Signs, symptoms and treatment of severe scorpion poisoning in children, in Eaker, D. and Wadstrom, T. (Eds.), **Natural Toxins**, Oxford, Pergamon Press, p. 61-68, 1980.
- CANDIDO, D. M. Escorpiões. *In*: Joly CA, Bicudo CEM. **Biodiversidade do Estado de São Paulo**. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, p. 25-34, 1999.
- CARDOSO, J. L. C. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: SARVIER, 2003.
- CARDOSO, J. L. C. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: SARVIER, 2009.
- CARVALHO, F. F.; NENCIONI, A. L.; LEBRUN, I.; SANDOVAL, M. R.; DORCE, V.A.; Behavioral, electroencephalographic, and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. V. 60, n.1, p. 7-14, 1998.
- CATANZARO, O.L.; SANTOS, R.A.S.; PARRA, O.M.; SANTOS, R.M.; FREIRE-MAIA, L.; BERALDO, W.T. Effect of scorpion toxin (tityustoxin) on the salivary gland of the rat, *in vivo* and *in vitro*. **Agents Actions**. V.8, p. 119-123, 1978.
- CATERRALL, W. 1980. Neurotoxins that act on voltage sensitive sodium channels in excitable membranes. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. V. 20, p. 15-43, 1980.
- CATERRALL, W. A.; GOLDIN, A.L.; WAXMAN, S.G. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. **Pharmacology**. V. 57, n.4, p. 397-409, 2005.
- CATTERALL W. A.; CESTÉLE S.; YAROV-YAROVOY V.; YU F. H.; KONKI K.; SCHEUER T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**. V.49, p. 124-141, 2007.

- CESTÉLE, S.; CATTERALL, W. A. Molecular mechanism of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**. V. 82, p. 883-892, 2000.
- CHAGOT, B.; PIMENTEL, C.; DAI, L.; PIL, J.; TYTGAT, J.; NAKAJIMA, T.; CORZO, G.; DARBON, H.; FERRAT, G. An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. **Biochemical Journal**. V. 388, p. 263-271, 2005.
- CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; FONSECA, S. C. G.; REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. S.; DINIZ, C. R. ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus*. **Toxicon**. V 32, p. 1649-1656, 1994.
- CHOUDHURY, L.; GANGULY, D.K. Some cardiovascular effects of crude scorpion venom. **Indian Journal of Medical Research**. V. 68, p. 515-518, 1978.
- CLEMENTE, G.T.; TEIXEIRA, M.M.; FREIRE-MAIA, L.; ROSSONI, R.B. Mechanisms underlying the structural alterations of the rat submandibular gland induced by *Tityus serrulatus* tityustoxin. **Toxicon**. V. 40, p. 731-738, 2002.
- CLOT-FAYBESSE, O.; GUIEU, R.; ROCHAT, H.; DEVAUX, C. Toxicity during early development of the mouse nervous system of a scorpion neurotoxin active on sodium channels. **Life Sciences**. V. 66, p. 185-192, 2000.
- CLOUDSLEY-THOMPSON, J. Scorpion sting. Clinical manifestations, management and literature. **Tropical Medicine and Higiene**. V. 93, p. 516, 1999.
- COELHO, F. M.; PESSINI, A. C.; COELHO, A. M.; PINHO, V. S.; SOUZA, D. G.; ARANTES, E. C.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L. 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.
- COLOGNA, C. T.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M.; ARANTES, E. C. *Tityus serrulatus* Scorpion Venom and Toxins: An Overview. **Protein & Peptide Letters**. V.16, p. 920-932, 2009.

- COMELLAS, A. P.; PESCE, L. M.; AZZAM, Z.; SALDIAS, F.; SZNAJDER, J. I. Scorpion venom decreases lung liquid clearance in rats. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. V. 167, p. 1064-1067, 2003.
- CORRÊA, M.M.; SAMPAIO, S.V.; LOPES, R.A.; MANCUSO, L.C.; CUNHA, O.A.B.; FRANCO, J.J.; GIGLIO, J.R. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. **Toxicon**. V. 35, p. 1053-1067, 1997.
- CORONA, M.; ZURITA, M.; POSSANI, L. D.; BECERRIL, B. 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. 251-256, 1996.
- CORONA, M.; GURROLA, G.B.; MERINO, E.; CASSULINI, R.R.; VALDEZ-CRUZ, N.A.; GARCIA, B.; RAMIREZ-DOMÍNGUEZ, M.E.; CORONAS, F.I.V.; ZAMUDIO, F.Z.; WANKE, E.; POSSANI, L.D. A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺ - channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. **FEBS Lett**. V. 532, n. 1-2, p. 121-126, 2002.
- CUPO, P.; JURCA, M.; AZEVEDO-MARQUES, M.M. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. *Revista do Instituto de* **Medicine Tropical de São Paulo**. V. 36, p. 67-76, 1994.
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M. & HERING, S. E. Escorpionismo. In: CARDOSO, J. L. C. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: SARVIER, 2009. Capítulo 20. pgs. 215-223.
- D'SUZE, G.; SEVCIK, C. Scorpion venom complexity fractal analysis: Its relevance for comparing venoms. **Journal of Theoretical Biology**. V. 267, p. 405–416, 2010.
- DE MATOS, I. M.; ROCHA, O. A.; LEITE, R.; FREIRE-MAIA, L. Lung oedema induced by *Tityus serrulatus* Scorpion venom in the rat. **Comparative Biochemistry and Physiology**. V. 11, n. 2, p. 143-148, 1997.
- DE MATOS, I. M.; SOUZA, D. G.; SEABRA, D. G., FREIRE-MAIA, L.; TEIXEIRA, M. M. Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury

- induced by scorpion venom in rats. **European Journal of Pharmacology**. V.376, n. 3, p. 293-300. 1999.
- DE MATOS, I. M.; TALVANI, A.; ROCHA, O. O. A.; FREIRE-MAIA, L.; TEIXEIRA, M. M. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. **Toxicon**. V. 39, p. 863-867, 2001.
- DERKAOUI, A.; ELBOUAZZAOU, A.; IFRAJI, Z.; ACHOUR, S.; LABIB, S.; HARANDOU, M. Accident vasculaire cérébral ischémique: une complication rare de l'envenimation scorpionique. **Presse Mediciny**. V. 40, P. 106–111, 2011.
- DE SOUSA, L.; BORGES, A.; VÁSQUEZ-SUÁREZ, A.; CAMP, H. JM. O. D.; CHADEE-BURGOS, ROSA. I.; ROMERO-BELLORIN, M.; ESPINOZA, J.; SOUZA-INSANA, L. D.; PINO-GARCIA, O. Differences in venom toxicity and antigenicity between females and males *Tityus nororientalis* (Buthidae) scorpions. **Journal of Venom Research**. V. 1, p. 61-70, 2010.
- DHAWAN, R.; JOSEPH, S.; SETHI, A.; LALA, A. K.; Purification and characterization of a short insect toxin from the venom of the scorpion *Buthus thalamus*. **FEBS Letters**. V. 528, p. 261-266, 2002.
- DIAS, M. B.; CAMPOLINA, D.; GUERRA, D. S.; FILHO, A. A. **Escorpionismo**. In: Toxicologia na prática clínica. Cap 20, p. 155-66, 2001.
- DIAZ, P.; CHOWELL, G.; CEJA, G.; D'AURIA, T. C.; LLOYD, R. C.; CASTILLO-CHAVEZ, C. Pediatric electrocardiograph abnormalities following *Centruroides limpidus tecomanus* scorpion envenomation. **Toxicon**. V. 45, n. 1, p. 27-31, 2005.
- DIVEP - Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico: Agressões por Animais Peçonhentos – 2006**. Disponível em: <www.saude.df.gov.br/sites/300/373/00000155.doc> Acesso em 02 de setembro de 2008.
- ELLIS, K. C.; TENENHOLZ, T. C.; JERNG, H.; HAYHURST, M.; DUDLAK, C. S.; GILLY, W. F.; BLAUSTEIN, M. P.; WEBER, D. J. Interaction of a toxin from the

scorpion *Tityus serrulatus* with a cloned K⁺ channel from squid (sqKv1A). **Biochemistry**. V. 40, n. 20, p. 5942-5953, 2001.

ESCOUBAS, P.; ROMI-LEBRUN, R.; WU, F. Q.; HERMANN, R.; MOSKOWITZ, H.; RAJENDRA, W.; HAMMOCK, B.; NAKAJIMA, T. Two novel short insectotoxins from the asian scorpion *Buthus martensi* and *Buthus tamulus*. In: **IST Fourth Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins**, 1996.

FAJLOUN, Z.; FERRAT, G.; CARLIER, E.; FATHALLAH, M.; LECOMTE, C.; SANDOZ, G.; DI LUCCIO, E.; MABROUK, K.; LEGROS, C.; DARBON, H.; ROCHAT, H.; SABATIER, J. M. e DE WAARD, M. Synthesis, ¹H NMR structure, and activity of a three-disulfide-bridged maurotoxin analog designed to restore the consensus motif of scorpion toxins. **The Journal of biological chemistry**. V.275, n.18, p. 13605-12, 2000.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3rd.ed. London: Cambridge University Press, 1971.

FLÓREZ, E. Los escorpiones enigmáticas reliquias del pasado poco conocidas en Colombia. **Innovación y ciencia**. V. 4, p. 26-33, 2007.

FREIRE-MAIA, L.; ALMEIDA, H. O.; CUNHA-MELO, J. R.; AZEVEDO, A. D.; BARROSO, J. Mechanism of the pulmonary edema induced by intravenous injection of scorpion toxin in the rat. **Agents Actions**. V.8, p. 113-118, 1978.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning, in OWNBY C. L; ODELL, G. V. Natural Toxins, Characterization, Pharmacology and Therapeutics. **Pergamon Press**, p. 139-159, 1989.

FREIRE-MAIA, L.; MATOS, I. M. Heparin or a PAF antagonist (BN-52021) prevents the acute pulmonary edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. **Toxicon**. V. 31, p. 1207-1210, 1993.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A.; AMARAL, C. F. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. **Toxicon**. V. 32, n. 9, p. 1009-1014, 1994.

FU, Y. J.; YIN, L. R.; LIANG, A. J.; ZHANG, C. F.; WANG, W.; CHAI, B. F.; YANG, J. Y.; FAN, I. J. Therapeutic potential of clorotoxina-like neurotoxin from the Chinese scorpion for human gliomas. **Neuroscience Letters**. V. 412, p. 62-67, 2007.

- GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and others systemic responses to inflammation. **New England Journal of Medicine**. V. 340, P. 448-454, 1999.
- GALLAGER, S.; SANKARAN, H.; WILLIAMS, J. A. Mechanism of scorpion (*Tityus serrulatus*) toxin induced enzyme secretion in rat pancreas. **Gastroenterology**. V.80, p.970- 973, 1999.
- GHERSY de NIETO, M.; ORTEGA, M.; CASTELLINI, P.; MOTA, J.; MONCADA, S.; SERVICIK, C.; DISUZE, G. Enponzoñamiento escorpiónico: concentración de veneno en plasma y su efecto desencadenante de la respuesta inflamatoria sistémica / Scorpion venom as a triggering factor of systemic inflammatory response. **Archivos venezolanos de puericultura y pediatría**. V. 65, n. 4, p. 150-158, 2002.
- GOMEZ, M. V.; DINIZ, C. R. Separation of toxic components from the Brazilian scorpion – *Tityus serrulatus* – venom. **Memórias do Instituto Butantan**. V.33, p. 899-902, 1966.
- GONZAGA, H. M. S.; ALZAMORA, F.; CUNHA-MELO, J. R.; FREIRE-MAIA, L. Gastric secretion induced by scorpion toxin. **Toxicon**. V.17, p. 316-318, 1979.
- GOUDET, C.; CHI, C. W.; TYTGAT, J. An overview of Toxins and generes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi karsch*. **Toxicon**. V. 40, p. 1239-1258, 2002.
- GOYFFON, M. Le scorpionisme. **Revue Française des Laboratoires**. V. 342; p. 41-48, 2002.
- GUERON, M.; STERN, J.; COHEN, W. Severe myocardial damage and heart failure in scorpion sting. **American Jornal Cardiology**. V. 19, p. 719-726, 1967.
- GUERON, M.; YARON, R. Cardiovascular manifestations of severe scorpion sting. Clinicopathologic Correlations. **Chest**. V. 57, p.156-162, 1970.
- GUERON, M.; ADOLPH, R. J.; GRUPP, I. L.; GABEL, M.; GRUPP, G.; FOWLER, N. O. Hemodynamic and myocardial consequences of scorpion venom. **American Journal Cardiology**. V. 45, p. 979-986, 1980.

- GUERON, M.; OVSYSHCHER, I. Cardiovascular effects of scorpion venoms. in KEELER, R. F. and TU, A. **Handbook of Natural Toxins**. V. 2, p. 639-657, 1984.
- GUERON, M.; ILIA, R. Non-cardiogenic pulmonary oedema after scorpion envenomation: a true entity? **Toxicon**. V. 34, p. 393-395, 1996.
- HEINEN, T. E.; VEIGA, G. Arthropod venoms and cancer. **Toxicon**. Doi:10.1016/j.toxicon.2011.01.002, 2011.
- HERING, E.S.; JURCA, M.; VICHI, F.L.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P. "Reversible cardiomyopathy" in patients with severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*: evolution of enzymatic, electrocardiographic and echocardiographic alterations. **Annals Tropical Pediatric**. V. 13, p.173-182, 1993.
- HICKMAN, JR. C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11^a ed. Rio de Janeiro, RJ. Editora Guanabara Koogan S. A. 2004. Capítulo 18, subfilo chelicerata.
- HORTA, F. M. B; CALDEIRA, A. P; SARES, J. A. S. Escorpionismo em crianças e adolescentes: aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes hospitalizados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 40, n. 3, 2007.
- JONAS, P.; VOGEL, W.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R. Toxin γ of the scorpion *Tityus serrulatus* modifies both activation and inactivation of sodium permeability of nerve membrane. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**. V. 407, n. 1, p. 92-99. 1986.
- JOY, R. Management of acute pulmonary edema due to scorpion sting. **Indian Journal of Emergency Pediatrics**. V. 2, n. 1, 2009.
- JUNG, C.; HAN, INGOO.; SUH, B. Risk Analysis for Electronic Commerce Using Case-Based Reasoning. **International Journal of Intelligent Systems in Accounting, Finance & Management**. V. 8, p. 61–73, 1999.
- KALAPOTHAKIS, E.; CHAVES-OLÓRTEGUI, C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. **Toxicon**. V. 35, p. 1041-1044, 1997.

- KNOX, M. B. **Estudo dos escorpiões em ambientes naturais e urbanos do DF: abordagem ecológica de duas espécies *Tityus fasciolatus* Pessôa, 1935 e *Tityus serrulatus* Lutz e Melo, 1922.** Dissertação de Mestrado em ecologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 1997.
- KOVOOR, J; LOURENÇO, W.R; MUÑOZ-CUEVAS, A. Conservation des spermatozides dans lês voies génitales des femelles et biologie de la reproduction des Scorpions (Chélicérates). *Comptes Rendus de l'Académie des sciences*. V. 304, n. 10, p. 259-264, 1987.
- KREIL, G. Hyaluronidases - a group of neglected enzymes. *Protein Science*. V. 4, n. 9, p. 1666-1669, 1995.
- LEGROS, C.; OUGHUIDENI, R.; DARBON, H.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P.E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. Characterization of a new peptide from *Tityus serrulatus* scorpion venom which is a ligand of the apaminbinding site. *FEBS Lett*. V. 390, n. 1, p. 81-84, 1996.
- LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutical potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery*. V. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.
- LIRA-DA-SILVA, R. M.; AMORIM, A. M & BRAZIL, T. K. Envenenamento por *Tityus stigmurus* na Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 33, p. 239-245, 2000.
- LIRA-DA-SILVA, R. M.; AMORIM, A. M.; CARVALHO, F. M.; BRAZIL, T. K. Acidentes por escorpião na cidade do Salvador, Bahia, Brasil (1982 – 2000). *Gazeta médica da Bahia*. V. 79, p. 43-49, 2009.
- LOURENÇO, W. R. . Étude préliminaire sur les scorpions Du District Fédéral (Brésil). *Revista Brasileira de Biologia*. V. 35, n. 4, p. 679-682, 1975.
- LOURENÇO, W. R. La biogéographie des Scorpions sud-américains (problémas et perspectives). *Spixiana*. V. 62, n. 2, p. 61-83, 1986.
- LOURENÇO, W.R. Peut-on parler d'une biogeography du scorpionisme?. *C R Sociedade Biogéographi*. V. 64, n. 4, p. 137-143, 1988.

- LOURENÇO, W.R. Biogéographie évolutive, écologie et lês stratégies biodémographiques chez les Scorpions néotropicaux. **Biogeography Society**. V. 67, n. 4, p. 171-190, 1991.
- LOURENÇO, W.R.; KNOX, M.B.; YOSHIZAWA, M.A.L. Invasión d´une communauté au stade initial d´une succession secondaire par une espèce parthénogénétique de scorpion. **Biogeography Society**. V. 70, p. 77-91, 1994.
- LOURENÇO, W.R.; CLOUDSLEYTHOMPSON J.L.; CUELLAR O.; EICKSTEDT V. R.D. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. V. 2, n.2, 1996.
- LOURENÇO, W. R.; CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. Discovery of a sexual population of *Tityus serrulatus*, one of the morphs within the complex *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae). **The Journal of Arachnology**. V.27, p. 154-158, 1999.
- LOURENÇO, W. R. Reproduction in scorpions, with special reference to Parthenogenesis. **European Arachnology**. Proceedings of the 19th European Colloquium of Arachnology, p. 71-85, 2000.
- 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.; ANDRZEJEWSKI, V.; CLOUDSLEY-THOMPSON. The life history of *Chactas reticulatus* Kraepelin, 1912 (Scorpiones, Chactidae), with a comparative analysis of the reproductive traits of three scorpions lineages in relation to habitat. **Zoologischer Anzeiger**. V. 242, p. 63-74, 2003.
- LOURENÇO, W. R.; BAPTISTA, R. L. C.; GIUPPONI, A. P. L. Troglöbitic scorpions: a new genus and species from Brazil. **Compets Rendus Biologies**. V. 327, p. 1151-1156, 2004.
- LOURENÇO, W.R.; EICKSTEDT, V.R.D.V. Escorpiões de importância Médica. In: CARDOSO, J. L. C. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: SARVIER, 2009. Capítulo 19. pgs. 199-213.

- MAGALHÃES, M.M.; VIANA, G.; ARANTES, R.M.E.; SANTOS, T.M.; CUNHA-MELO, R.R. The mouse as an experimental model for *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **Acta Cirurgica Brasileira**. V. 13, n. 4, p. 205-000, 1998.
- MAGALHÃES, M. M.; PEREIRA, M. E.; AMARAL, C. F.; REZENDE, D. C.; BUCARETCHI, F.; GAZZINELLI, R. T.; CUNHA-MELO, J. R. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**. V. 37, n. 8, p. 1155-64, 1999.
- MAGALHÃES, M. M.; GARBACIO, V. L.; ALMEIDA, M. B.; BRAZ, A. C. A.; MORAES-SANTOS, T.; FREIRE- MAIA, L.; CUNHA-MELO, J.R. Acid-base balance following *Tityus serrulatus* envenoming in anaesthetized rats. **Toxicon**. V. 38, p. 855-864, 2000.
- MAGALHÃES, O. C. **Escorpionismo IV. Memória**. Monografias Instituto Oswaldo Cruz. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, p. 1-210, 1946.
- MANSUELLE, P.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CHÁVEZ-OLIÓRTEGUI, C.; DE LIMA, M. H.; ROCHAT, M. H.; ROCHAT, H.; GRANIER, C. 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. 119-125, 1992.
- MANZOLI-PALMA, M. F.; GOBBI, N.; PALMA, M. S. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. V. 9, n. 2, p. 174-185, 2003.
- MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R.; DA SILVA, C. A.; CARNEIRO, E. M.; GONÇALVES, A. A.; OLIVEIRA, B. Aminoacid sequence of TsTX-V, an alpha-toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K⁺ permeability of beta-cells from isolated rat islets of Langerhans. **Biochimica and Biophysica Acta**. V. 1243, n. 3, p. 309-314, 1995.
- MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CÉSARD, B.; RIBEIRO, A. M.; DINIZ, C. R.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P.E. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. **FEBS Lett**. V. 302, n. 3, p. 220-222, 1992.

- MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CÉSARD, B.; RIBEIRO, A. M.; DINIZ, C. R.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P.E. Biochemical, pharmacological and genomic characterization of Ts IV, an α -toxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. **FEBS Lett.** V. 342, n. 2, p. 181-184, 1994.
- MELO, M.M.; SILVA JUNIOR, P. G. P.; VERÇOSA JUNIOR, D. Escorpionismo. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia.** V.44, p. 90-97, 2004.
- MENDES, T. M. **Antígenos para a produção de soro contra o veneno do escorpião *Tityus serrulatus***. 2007. 242 f. Tese (Ciências Biológicas). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MINEO, M. F.; FRANCO-ASSIS, G. A.; DEL-CLARO, K. Repertório comportamental do escorpião amarelo *Tityus serrulatus* Lutz & Mello 1922 (Scorpiones, Buthidae) em cativeiro. **Revista Brasileira de Zoociências.** V. 5, n 1, p. 23-31, 2003.
- MOSBAH, A.; KHARRAT, R.; FAJLOUN, Z.; RENISIO, J. G.; BLANC, E.; SABATIER, J. M.; EL AYEB, M. e DARBON, H. 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.
- MOTTA, P. C. Primeiro Registro de *Bothriurus asper* (Scorpiones, *Buthriuridae*) no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia.** V. 23, n. 1, 2006.
- NISHIKAWA, A. K.; CARICATI, C. P.; LIMA, M. L. S.; DOS SANTOS, M. C.; KIPNIS, T. L.; EICKSTEDT, V. R. D.; KNYSAK, I.; DA SILVA, M. H.; HIGASHI, H. G. & DIAS DA SILVA, W. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of brazilian scorpions. **Toxicon.** V. 32, p. 989-998, 1994.
- NODARI, F. R.; LEITE, M. L.; NASCIMENTO, E. Aspectos Demográficos, espaciais e temporais dos acidentes escorpiônicos ocorridos na área de abrangência da 3ª Regional de Saúde – Ponta Grossa, PR, no período de 2001 a 2004. **Revista de Ciências Biológicas e da Saúde da UEPG.** V.12, n.1, p. 15-26, 2006.

- 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, P. 847-853, 1982.
- NOVELLO, J. C.; ARANTES, E. C.; VARANDA, W. A.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S. TsTx-IV, a short chain fourdisulfide-bridge neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom, which acts on Ca²⁺- activated K⁺ channels. **Toxicon**. V. 37, n. 4, p. 651-660, 1999.
- NUNAN, E. A.; MORAES, M. F. D.; CARDOSO, M. F. D.; CARDOSO, V. N.; MORAES-SANTOS, T.; Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Life Sciences**. V. 73, p. 319–325, 2003.
- NUNES, C. S.; BEVILACQUA, P. D.; JARDIM, C. C. G. Aspectos demográficos e espaciais dos acidentes escorpiônicos no distrito sanitário Noroeste, município de Belo Horizonte, Minas Gerais, 1993 a 1996. **Cadernos de Saúde Pública**. V. 16, n. 1, p. 213-223, 2000.
- OLAMENDI-PORTUGAL, T.; GARCIA, B. I.; LOPEZ-GONZALEZ, I.; VAN DER WALT, J.; DYASON, K.; ULENS, C.; TYTGAT, J.; FELIX, R.; DARZON, A. e POSSANI, L. D. Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channels. **Biochem Biophys Res Commun**, v.299, n.4, p.562-8. 2002.
- OYAMA, JR. S.; PRISTOVSEK, P.; FRANZONI, L.; PERTINHEZ, T. A.; SCHININA, E.; LUCKE, C.; RUTERJANS, H.; ARANTES, E. C.; SPISNI, A. Probing the pH-dependent structural features of alfa-KTx12.1 a potassium channel blocker from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Protein Science**. V. 14, n. 4, p. 1025-1038, 2005.
- PENEDO, G. L.; SCHLINDWEIN, M. N. A explosão demográfica da espécie *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo) na área urbana de Araraquara e a sensível diminuição da espécie *Tityus Bahienses* (escorpião marrom). **Revista Uniara**, n. 15, 2004.
- PERES, A. C. P.; NONAKE, P. N.; CAMILLO, P. T. C.; TOYOAMA, M. H.; SILVA, C. A. M.; VIEIRA, R. P.; DOLHNIKOFF, M.; ZAMUNER, S. R.; OLIVEIRA, L. V. F.

Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. **Toxicon**. V. 53, p. 779-785, 2009.

PESSINI, A. C.; TAKAO, T. T.; CAVALHEIRO, E. C.; VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**. V. 39, n. 10, p. 1495-1504, 2001.

PETRICEVICH, V. L. Scorpion Venom and the Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**. p. 1-16, 2010.

PIMENTA, A. M.; STOCKLIN, R.; FAVREAU, P.; BOUGIS, P. E.; MARTIN, EAUCLAIRE, M. F. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Rapid Communication in Mass Spectrometry**. 15, 1562–1572. 2001.

PIMENTA, A. M. C.; LEGROS, C.; ALMEIDA, F. M.; MANSUELLE, P.; LIMA, M. E.; BOUGIS, P. E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. Novel structural class of four disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 301, n. 4, p. 1086-1092, 2003.

PIMENTA, A. M.; DE MARCO ALMEIDA, F.; DE LIMA, M. E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; BOUGIS, P. E. Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. V. 17, p. 413–418, 2003.

PINHEIRO, C. B.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I. Structural analysis of *Tityus serrulatus* Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na⁺ channels. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**. V.59, n. 3, p. 405-415, 2003.

PINTO, L. R.; MELO, M. M.; COSTA, M. E. R.; LABARRERE, C. R. Hematological and biochemical profiles of rats submitted to experimental poisoning with *Tityus serrulatus* venom. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 62, n.2, p.350-356, 2010a.

- PINTO, L. R.; BORBOLETA, M. B.; MELO, C. R.; LABARRÉRE, C. R.; MELO, M. M. *Tityus fasciolatus* envenomation induced cardio-respiratory alterations in rats. **Toxicon**. V. 55, p. 1132-1137, 2010b.
- POLIKARPO, V. L.; JUNIOR, M. S. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; TEPLYAKOV, A. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. **Journal of Molecular Biology**. V. 290, n. 1, p. 175-184, 1999,
- POSSANI, L. D.; MARTIN, B. M.; FLETCHER, M. D.; FLETCHER, P. L. JR. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Journal of Biological Chemistry**. V. 266, p. 3178-3185, 1991.
- POSSANI, L.D; MERINO, E; CORONA, M; BOLÍVAR, F; BECERRIL, B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. **Biochemie**. V. 82, p. 861-868, 2000.
- POSSANI, L. D.; GURROLA, G. B.; SCHWARTZ, E. F.; RESTANO-CASSULINI. **Bioquímica y biología molecular de los venenos de escorpiones de importancia médica en el continente americano**. In: D´SUZE, G.; CORZO, G. A.; SOLIS, J. F. P. Emergencias por animales ponzoñosos en las Américas. México. Ed: Instituto Bioclón S.A. de C.V. y Laboratorios Silanes S.A. de C.V. p. 147-180, 2010.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K., 2001. **The physical basis of neuronal function**. In: Eckert Animal Physiology – Mechanism and Adaptions. 5ª. Ed. New York, p. 113-149, 2001.
- RAZI, E.; MALEKANRAD, E. Asymmetric pulmonary edema after scorpion sting: A case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. V. 50, n. 6, p. 347-350, 2008.
- REZENDE, N. A. **Eficácia da soroterapia antiescorpiônica em neutralizar antígenos tóxicos circulantes do veneno em pacientes com manifestações sistêmicas secundárias a acidentes pelo escorpião *Tityus***

serrulatus (Lutz e Mello, 1922). Belo Horizonte; apresentada a Faculdade de Medicina de UFMG para obtenção do grau de doutor. S. n; xvii, 81 p., 1994.

RJEIBI, I.; MABROUK, K.; MOSRATI, H.; BERENQUER, C.; MEJDOUB, H.; VILLARD, C.; LAFFITTE, D.; BERLIN, D.; OUAFIK, L. H.; LUIS, J.; ELAYEB, M.; SRAIRI-ABID, N. Purification, synthesis and characterisation of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom. **Peptides**. Doi:10.1016/j.peptides.2011.01.015, 2011.

RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C.; MERINO, E.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Novel interactions between K⁺ channels and scorpions toxins. **Trends Pharmacologie Science**. V. 24, n. 9, p. 222-227, 2003.

RODRÍGUEZ 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, p. 831–844, 2005.

RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C.; SCHWARTZ, E. F.; POSSANI, L. D. Mining on scorpion venom biodiversity. **Toxicon**. V. 56, n. 7, p. 1155-1161, 2009.

ROGOWSKI, R. S.; KRUEGER, B. K.; COLLINS, J. H.; BLAUSTEIN, M. P. Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by alphadendrotoxin in synaptosomes. **Proceedings of the National Academy Sciences**. V. 91, n. 4, p. 1475-1479, 1994.

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

SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; PRADO, W. A.; RICCIOPPO NETO, F.; GIGLIO, J. R. Further characterization of toxins T1IV (TsTXIII) and T2IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**. V. 29, n. 6, p. 663-672, 1991.

SANDOVAL, M. R. L.; DORCE, V. A. C. Behavioural and electroencephalographic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Toxicon**. V. 31, p. 205–212, 1993.

- SARIA, A.; LUNDBERG, J.M.; Evans blue Fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissue. **Journal of Neuroscience Methods**. V. 8, p. 41-49, 1983.
- SHIEH, C. C.; COGHLAN, M.; SULLIVAN, J. P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium channels: molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. **Pharmacologie**. V. 52, n. 4, p. 557-593, 2000.
- SILVA, T. F.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; LIRA-DA-SILVA, R. M. Avaliação da DL₅₀ e edema pulmonar induzido pelo veneno de *Tityus serrulatus* (Scorpiones; Buthidae) procedente da Bahia, Brasil. **Biota Neotrópica**. V. 5, n. 1, 2005a.
- SILVA, T. F.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; BARBOSA-JUNIOR, A. DE A.; LIRA-DA-SILVA, R. M. Estudo do veneno de *Tityus serrulatus* (Scorpiones; Buthidae) procedente do estado da Bahia, Brasil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. V. 4, n. 1, p. 24-31, 2005b.
- SINAN, Sistema de informações de agravos de notificação. **Estatística de acidentes por animais peçonhentos**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2011.
- SINITOX – Sistema Nacional de Informações Toxicológicas. **Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=8>. Acesso em 12 de fevereiro de 2011.
- SISSOM, W. D.; POLIS, G. A.; WATT, D. D. Systematic, biogeography, paleontology. In: POLIS, G. A. (Ed). **The Biology of scorpions**. Stanford: Stanford University Press, 1990. p. 64-153.
- SOFER, S.; GUERON, M. Respiratory failure in children following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. Hemodynamics and neurological aspects. **Toxicon**. V. 26, p. 931-939, 1988.
- SOFER, S.; SHAHAK, E.; SLONIM, A.; GUERON, M. Myocardial injury without heart failure following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus* in children. **Toxicon**. V. 29, p. 382-385, 1991.

- SPIRANDELLI-CRUZ, E. F.; YASSUDA, C. R. W.; JIM, J.; BARRAVIERA, B. Programa de controle de surto de escorpião *T. serrulatus*, Lutz e Mello 1922, no município de Aparecida, SP (Scorpiones, Buthidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 28, n. 2, p. 123-128, 1995.
- SRINIVASAN, K. N.; SIVARAJA, V.; HUYS, I.; SASAKI, T.; CHENG, B.; KUMAR, T. K. S.; SATO, K.; TYTGAT, J.; YU, C.; SAN, B. C. C.; RANGANATHAN, S.; BOWIE, H. J.; KINI, R. M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Kappa-hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. **Journal of Biological Chemistry**. V. 277, p. 30040-30047, 2002.
- TEIXEIRA, A. L.; FOUNTOURAB JR, B. F.; FONTOURAB, L.; FREIRE-MAIC, C. R. S.; MACHADORA, E. R. S.; CAMARGOSA, M. M. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. **Toxicon**. V. 39, p. 703–709, 2001.
- THOMPSON, C. H.; OLIVETTI, P. R.; FULLER, M. D.; FREEMAN, C. S.; MCMASTER, D.; FRENCH, R. J.; POHL, J.; KUBANEK, J.; MCCARTY, N. A. Isolation and Characterization of a High Affinity Peptide Inhibitor of ClC-2 Chloride Channels. **The Journal of Biological Chemistry**. V.284, n.38, p. 626051-26062, 2009.
- TOLEDO, D. V.; NEVES, A. G. A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. V.55B, p. 249-253, 1976.
- TORRES, J. B.; MARQUES, M. G. B.; MARTINI, R. K.; BORGES, V. A. Acidente por *Tityus serrulatus* e suas implicações epidemiológicas no Rio Grande do Sul. **Revista de Saúde Pública**. V.36, n.5, p. 631-633, 2002.
- UNIPROTKB**, Banco de dados público. < <http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2011.
- VASCONCELOS, F.; LANCHONETE, V. L.; BENDHACK, L. M.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma

- catecholamines. **Comparative Biochemistry and Physiology**. V. 141C, n. 1, p. 85-92, 2005.
- VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D. M.; LANZER, D.; MARTIN-
EAUCLAIRE, M. F.; BOUGIS, P. E.; DE LIMA, M. E.; SANTOS, R. A. S.;
PIMENTA, A. M. C. *Tityus serrulatus* hypotensins: a new family of peptides from
scorpion venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V. 371, p. 515–
520. 2008.
- VERANO-BRAGA, T.; FIGUEIREDO-REZENDE, F.; MELO, M. N.; LAUTNER, R. Q.;
GOMES, E. R. M.; MATA-MACHADO, L. T.; MURARI, A.; ROCHA-RESENDE,
C.; LIMA, M. E.; GUATIMOSIM, S.; SANTOS, R. A. S.; PIMENTA, A. M. C.
Structure–function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): A new
agonist of B2 kinin receptor. **Toxicon**. V. 56, p. 1162-1171, 2010.
- VIDAL, C. S.; ANDRADE, M. V.; MELO VIANA, G.; SILVA, A. L.; MORAES-
SANTOS, T.; GONZAGA, H. M. S.; CUNHA-MELO, J. R.; Ligation of the
abdominal esophagus decreases scorpion toxin-induced gastric secretion in
rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. V. 19, n. 3, p. 168-174, 2004.
- WATERMAN, J.A. Some notes on scorpion poisoning in Trinidad. **Society of
Tropical Medicine**. V. 31, p. 607, 1938.
- YOSHIZAWA, M. A. C. **Estudo dos acidentes escorpiônicos no Distrito Federal
no período de 1991-2000**. 2002. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da
Saúde). Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília, Distrito Federal.
- YU, F.H.; CATERRAL, W.A. Overview of the voltage-gated sodium channel family.
Genome Biology. V. 4, n.3, p. 207.1-207.7, 2003.
- ZENG, X. C.; CORZO, G.; HAHIN, R. Scorpion Venom Peptides without Disulfide
Bridges. **IUBMB Life**. V. 57, p. 33-21, 2005.
- ZHIJIAN C., FENG L., YINGLIANG W., XIN M., WENXIN L. Genetic mechanisms of
scorpion venom peptide diversification. **Toxicon**. V. 47, p. 348-355, 2006.
- ZHU, S.; PEIGNEUR, S.; B, G.; LUO, L.; JIN, D.; ZHAO, Y.; TYTGAT, J. Molecular
diversity and functional evolution of scorpion potassium channel toxins. **The**

American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Manuscript M110.002832, 2010.

ANEXO A – Declaração de avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) UnB.




Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 6 de julho de 2010.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado ***“Toxicidade da Peçonha de Tityus Serrulatus Procedente do Distrito Federal Por Meio da Avaliação da DL50, Efeitos Neurológicos e Edema Agudo Pulmonar”***, UnBDOC nº. 133424/2009, sob responsabilidade do Prof(a). Dr(a). Elisabeth Nogueira Ferreira Schwartz, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA

