



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ILANNA TAINÁ MEDEIROS GURGEL PINHEIRO

**PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E FISIOPATOLÓGICOS DO
ENVENENAMENTO INDUZIDO PELO ESCORPIÃO *Tityus stigmurus* EM
CAMUNDONGOS**

Natal
2016

ILANNA TAINÁ MEDEIROS GURGEL PINHEIRO

**PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E FISIOPATOLÓGICOS DO
ENVENENAMENTO INDUZIDO PELO ESCORPIÃO *Tityus stigmurus* EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa

Natal

2016

Pinheiro, Ilanna Tainá Medeiros Gurgel.

Parâmetros inflamatórios e fisiopatológicos induzidos pelo
envenenamento induzido pelo escorpião *Tityus stigmurus* em camundongos
/ Ilanna Tainá Medeiros Gurgel Pinheiro. - Natal, 2016.

124f: il.

Orientador: Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Centro de Ciências da Saúde.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Tityus stigmurus*. 2. Envenenamento. 3. Inflamação. I. Pedrosa,
Matheus de Freitas Fernandes. II. Título.

RN/UF/

ILANNA TAINÁ MEDEIROS GURGEL PINHEIRO

**PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E FISIOPATOLÓGICOS DO
ENVENENAMENTO INDUZIDO PELO ESCORPIÃO *Tityus stigmurus* EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa

Data de Aprovação:

___/___/___

Presidente: Prof. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa, Dr. – Orientador, UFRN

Membro 1: Prof.^a Janaina Cristiana de Oliveira Crispim de Freitas, Dr.^a – UFRN

Membro 2: Prof.^a Daniela Priscila Marchi Salvador, Dr.^a – UFPB

Aos meus pais, João e Léia, e ao meu irmão Ícaro, por todo amor, apoio, carinho e compreensão. Amo vocês mais que tudo nessa vida!

AGRADECIMENTOS

Foram dois anos de muito aprendizado, problemas, risos, choros e amadurecimento pessoal e profissional. Mais um ciclo se encerra... Tom Jobim compôs uma música, Wave, que é bastante conhecida e um trecho dela diz assim: "É impossível ser feliz sozinho". Parafraseando Tom Jobim, digo que ninguém chega a lugar nenhum sozinho, comigo não foi diferente e minha lista é bem grande, e aqui vão meus sinceros agradecimentos aqueles que foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Deus, por permitir coisas maravilhosas na minha vida e sempre renovar minhas esperanças.

Aos meus pais, por se fazerem presentes na minha vida mesmo estando a 382 km de distância! Vocês são verdadeiros heróis. Os meus heróis! Agradeço a Deus todos os dias por tê-los como pais. Obrigada por tudo! Amo vocês!

Ao meu irmão, por me fazer rir e por todo o carinho quando chego em casa cansada.

Aos meus avós, tios, primos e amigos pela torcida e apoio. Vocês são mais que especiais! Amo todos vocês. Em especial gostaria de agradecer ao meu tio Maninho, pela ajuda, por sempre me encorajar e pelos conselhos, você é muito especial.

Ao meu namorado, Pedro Luiz, pela paciência, companhia, torcida e ajuda nos experimentos e com os manuscritos em inglês. Obrigada por tudo. Te amo!

Ao meu orientador, Prof.^o Dr. Matheus Pedrosa, pela confiança, por todo aprendizado e oportunidades desde a iniciação científica. Tudo começou com um sim em 2010. Obrigada!

Aos colegas e professores do TECBIOFAR.

Ao Grupo Veneno, saibam que vocês são a melhor equipe de todas! Sempre que precisei, estiveram dispostos a ajudar, além disso, deixaram meus dias mais leves e alegres. Em especial gostaria de agradecer a Juliana Félix, por toda a ajuda, saiba que você é exemplo de competência e não teria conseguido chegar aqui sem você! Também a Yamara Arruda, Alessandra Daniele, Menilla Melo, Karla Samara, Nathália, Manu e Allanny pelo apoio nos momentos difíceis, vocês foram essenciais.

Aos animais, pois sem eles o trabalho não seria possível.

Aos professores colaboradores, Dr.^a Vivian Silbiger, Dr.^o Raimundo Fernandes e Dr.^o Wilmar Dias. Também quero agradecer a Marina, Lurdinha, Mellyna e Socorro.

E por fim, institucionalmente, gostaria de agradecer a UFRN, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, a CAPES e a FAPERN.

[...] Suraju chamam os índios a um bicho como os lacraus de Portugal, mas são tamanhos como camarões e tem duas bocas compridas; e, se mordem uma pessoa, está atormentada com ardor vinte e quatro horas, mas não periga.

Gabriel Soares de Souza, 1587

Tratado Descritivo do Brasil

RESUMO

O envenenamento por escorpiões é responsável por significativa morbidade e mortalidade em muitas partes do mundo e representa um problema público de saúde no Brasil. Pouco estudado, *Tityus stigmurus* é considerado um escorpião de importância médica bastante associado aos casos de escorpionismo que ocorrem no Nordeste brasileiro. Diante desse contexto, o trabalho propõe avaliar parâmetros inflamatórios e fisiopatológicos locais e sistêmicos decorrentes do envenenamento pelo escorpião *Tityus stigmurus* em modelos experimentais *in vivo*. Através de injeção intraperitoneal de 375 µg/Kg do veneno em camundongos BALB/c foi realizada a avaliação dos efeitos locais e sistêmicos por contagem global e diferencial de leucócitos, quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase, dosagem de nitrito pelo método de Griess, proteínas totais pelo método de Bradford e IL-10 e TNF-α do lavado peritoneal dos animais, além da avaliação de parâmetros bioquímicos e citocinas no soro, bem como a determinação do peso relativo dos órgãos coletados dos animais de experimentação. A avaliação da ação edematogênica da peçonha se deu através do modelo de edema de pata por injeção intraplantar de 5µg do veneno de *T. stigmurus*. Os resultados mostraram que o veneno não foi capaz de induzir a migração de células para o peritônio dos animais de experimentação em 6 e 24 h, nem induziu o aumento de IL-10 e TNF-α no lavado peritoneal e no soro. Porém, alterações bioquímicas importantes foram observadas como o aumento nos níveis de creatina quinase (CK) e sua isoenzima MB (CK-MB), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina, amilase e ácido úrico, indicativo de lesões em órgãos como coração, fígado, rins e pâncreas. Também foi demonstrada resposta edematogênica que se caracterizou pelo início rápido, com duração até 1 hora. Com os resultados aqui obtidos, tem-se pela primeira vez a caracterização parcial do quadro do envenenamento induzido por *T. stigmurus* em camundongos.

Palavras-chave: *Tityus stigmurus*. Envenenamento. Inflamação. Edema de pata.

ABSTRACT

Scorpion bites are responsible for significant morbidity and pediatric mortality in many parts of the world and represents a public health problem in Brazil. *Tityus stigmurus* is a scorpion specie of medical importance that occur in the Brazilian Northeast. In this context, this work proposed to analized the inflammatory and pathophysiological parameters after *Tityus stigmurus* scorpion envenoming *in vivo* by intraperitoneal injection of 375 µg/kg of venom in BALB/c mice to evaluate its local and systemic effects. For this purpose, the total and differential leukocyte number, myeloperoxidase activity, nitrite levels and total protein were quantified in peritoneal exsudate, as well as, serum biochemical parameters and cytokine (TNF-α and IL-10) levels were analyzed. Alterations in relative organs weight of the experimental animals were also assessed. The results showed that the venom was not able to induce the migration of cells into the peritoneum of experimental animals. However, significant biochemical abnormalities were observed as the increase in CK, CK-MB, AST, ALT, creatinine, amylase, and uric acid. Moreover, it was observed lesions in organs such as heart, liver, kidney and pancreas. It was also demonstrated edema response that was characterized by rapid onset, lasting up to 1 hour. This is the first time that partial characterization of the envenoming induced by *T. stigmurus* in mice was carried out.

Keywords: *Tityus stigmurus*. Envenoming. Inflammation. Paw edema.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático de um escorpião.	25
Figura 2: Escorpião <i>Tityus stigmurus</i>	26

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Peso relativo dos órgãos após 6 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.....	58
Gráfico 3: Peso relativo dos órgãos após 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.....	59
Gráfico 4: Concentração sérica de TNF- α após 6 e 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.....	60
Gráfico 5: Concentração sérica de IL-10 após 6 e 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.....	61
Gráfico 6: Leucócitos da cavidade peritoneal após 6 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.....	64
Gráfico 7: Atividade de Mieloperoxidase do lavado peritoneal após 6 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.	64
Gráfico 8: Concentração de Nitrito do sobrenadante do lavado peritoneal após 6 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.	65
Gráfico 9: Leucócitos da cavidade peritoneal após 6 e 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.....	66
Gráfico 10: Contagem diferencial dos leucócitos da cavidade peritoneal após 6 h a administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c expressos em valores relativos.....	67
Gráfico 11: Contagem diferencial dos leucócitos da cavidade peritoneal após 24 h a administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c expressos em valores relativos.....	67
Gráfico 12: Atividade de Mieloperoxidase do lavado peritoneal após 6 e 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.	68
Gráfico 13: Concentração de Nitrito do sobrenadante do lavado peritoneal após 6 e 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.	69
Gráfico 14: Ação edematogênica da peçonha do escorpião <i>T. stigmurus</i>	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados bioquímicos após 6 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.....	53
Tabela 2: Dados bioquímicos após 6 e 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cm	Centímetros
h	Hora
i.p.	Intraperitoneal
kg	Quilograma
µg	Micrograma
µM	Micromolar
mg	Miligrama
mM	Milimolar
nm	Nanometros
nM	Nanomolar
pH	Potencial hidrogeniônico
Abz-FLRRV-EDDnp	<i>Cathepsin k</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONSEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
COX	Ciclo-oxigenase
CK	Creatina quinase
CK-MB	Creatina quinase e sua isoenzima MB
DL ₅₀	Dose letal mediana
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
ICK	Inibidor <i>cystine-knot</i>
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IL	Interleucina

KCa	Canal de potássio ativado por cálcio
Kir	Canal de potássio retificadores de influxo
Kv	Canal de potássio do tipo voltage-dependente
KTx	Toxinas bloqueadoras de canal de potássio
K2P	Canal de potássio <i>in tandem</i>
MPO	Mieloperoxidase
NaTx	Toxinas bloqueadoras de canal de sódio
Nav	Canal de sódio do tipo voltage-dependente
NDBP	<i>Non Disulfide- Bridged Peptide</i>
NEED	Dihidrocloridrato de N-1-naftiletilenodiamina
NK	Receptor de taquicininas
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PMSF	Fluoreto de FenilMetilsulfonamida
PPB	Peptídeo Potencializador de Bradicinina
SiHa	<i>Squamous cell carcinoma</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TipE	Canal de sódio do tipo β de <i>Drosophila melanogaster</i>
TistH	<i>Tityus stigmurus Hypotensin</i>
TNF	Interferon
TstV	Veneno de <i>Tityus stigmurus</i>
Sisbio	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
γ	Gama
β	Beta
Na ⁺	Sódio
K ⁺	Potássio
Ca ²⁺	Cálcio
Cl ⁻	Cloro
κ	Kappa
o	Orto
U	Unidades enzimática
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1	Biologia dos escorpiões	23
2.1.1	<i>Classificação e distribuição geográfica</i>	23
2.1.2	<i>Morfologia</i>	24
2.1.3	<i>Reprodução</i>	26
2.1.4	<i>Habitat e hábitos</i>	27
2.2	Peçonha.....	28
2.3	Toxinas escorpiônicas	29
2.3.1	<i>Toxinas que agem nos canais de sódio</i>	30
2.3.2	<i>Toxinas que agem nos canais de potássio</i>	31
2.3.3	<i>Non-Dissulfide-Bridged-Peptide (NDBP)</i>	33
2.4	Escorpionismo	34
2.4.1	<i>Epidemiologia</i>	34
2.4.2	<i>Quadro clínico</i>	36
2.4.3	<i>Classificação clínica e tratamento</i>	37
2.5	Peçonha e toxinas escorpiônicas agindo na inflamação.....	38
3	OBJETIVOS.....	42
3.1	Objetivo geral.....	42
3.2	Objetivos específicos	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	Peçonha.....	44
4.2	Animais de experimentação.....	44
4.3	Determinação da dose letal mediana (DL ₅₀)	44
4.4	Avaliação dos efeitos sistêmicos induzidos pelo envenenamento com o escorpião <i>Tityus stigmurus</i>	45
4.4.1	<i>Indução do envenenamento</i>	45
4.4.2	<i>Avaliação do perfil bioquímico sérico</i>	46
4.4.3	<i>Determinação do peso relativo dos órgãos</i>	46
4.4.4	<i>Dosagem de citocinas</i>	46
4.5	Avaliação dos efeitos locais induzidos pelo envenenamento com o escorpião <i>Tityus stigmurus</i>	47
4.5.1	<i>Avaliação da atividade indutora de peritonite</i>	47
4.5.2	<i>Avaliação da atividade edematogênica</i>	50
4.6	Análise estatística	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Determinação da dose letal mediana (DL ₅₀)	52
5.2	Avaliação dos efeitos sistêmicos induzidos pelo envenenamento com o escorpião <i>Tityus stigmurus</i>	52
5.2.1	<i>Avaliação do perfil bioquímico sérico</i>	52
5.2.2	<i>Determinação do peso relativo dos órgãos</i>	58
5.2.3	<i>Dosagem de citocinas</i>	59

5.3	Avaliação dos efeitos locais induzidos pelo envenenamento com o escorpião <i>Tityus stigmurus</i>	62
5.3.1	Avaliação da atividade indutora de peritonite	62
5.3.2	Indução do envenenamento com o escorpião <i>T. stigmurus</i> através do modelo de edema de pata	72
6	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE	92
	ANEXOS	124



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, os escorpiões são predadores terrestres inseridos na ordem Scorpiones com 14 famílias, 183 gêneros e aproximadamente 1800 espécies, distribuídas em todos os continentes, com exceção da Antártida (REIN, 2012).

Os escorpiões potencialmente perigosos ao homem pertencem à família Buthidae, a única que tem ampla distribuição mundial, com 48 gêneros representados por aproximadamente 500 espécies (a maior em número e gênero) (LOURENÇO, 2004), sendo apenas 25 espécies consideradas perigosas ao homem. No Brasil, ocorrem cinco gêneros de Buthidae: *Isometrus*, *Ananteris*, *Microtityus*, *Rhopalurus* e *Tityus*. A esse último pertencem às espécies responsáveis pelos casos de escorpionismo e dentre elas está o *Tityus stigmurus*, que de acordo com dados do Ministério da Saúde, é uma espécie que predomina no Nordeste brasileiro, nos estados, de Pernambuco, Bahia, Ceará, Piauí, Paraíba, Alagoas, Sergipe e Rio Grande do Norte (BRASIL, 2009).

Os acidentes por escorpiões são considerados de importância médico-sanitária no Brasil, não só pela incidência, mas também pela potencialidade da peçonha de algumas espécies que resultam em quadros clínicos graves, podendo ser até fatais (BÜRCHERL, 1968). Segundo dados do Sistema de Informações Tóxico-farmacológicas (SINITOX) (2011), os casos de escorpionismo são os mais numerosos, só em 2011 foram notificados 11542 casos no Brasil. Esse número chega a ser maior que os casos de ofidismo registrados no mesmo ano (4938), sendo que ainda acredita-se que o número de casos com escorpiões seja bem maior devido a subnotificação (SINITOX, 2011).

O problema do escorpionismo no Nordeste ainda é pouco conhecido, com alguns registros esporádicos feitos pelas Secretarias Estaduais de Saúde, sendo o *Tityus stigmurus* o principal responsável por esses (LIRA-DA-SILVA, 2000; BRASIL, 2001). O primeiro caso foi reportado em Recife, onde registraram acidentes com *T. stigmurus* em crianças, culminando em um óbito (EICKSTEDT, 1983). No Rio Grande do Norte, os casos de escorpionismo são numerosos mesmo com as subnotificações, dados do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) registraram só

entre 2007 e 2011 o número de 10251 acidentes na capital e região metropolitana (BARBOSA, 2014).

De forma geral, o envenenamento por escorpiões é responsável por significativa morbidade e mortalidade pediátrica em muitas partes do mundo e representam um problema público de saúde no Brasil. Assim, a peçonha desses animais tem sido objeto de estudo, pois, entre seus componentes, existe uma grande variedade de toxinas com diversas atividades biológicas responsáveis pelos sinais e sintomas do envenenamento. Os estudos que visam compreender o escorpionismo e buscar soluções para este problema de saúde pública tem como ponto de partida o estudo da peçonha e seu mecanismo de ação a fim de usá-los como ferramenta para a compreensão de diversos fenômenos biológicos, no desenvolvimento de terapias mais eficientes para os casos de envenenamento, desenvolvimento de novos fármacos e utilização terapêutica (LORET-HAMMOCK, 2001).

A espécie mais estudada no Brasil é o escorpião *Tityus serrulatus*, visto que é o mais importante em termos de ocorrência e número de envenenamentos dentre as demais espécies que apresentam caráter endêmico, representando problema nas regiões de sua ocorrência. Comprovadamente, a peçonha do escorpião *T. serrulatus* é capaz de induzir uma resposta inflamatória sistêmica ocasionando a liberação de mediadores inflamatórios tanto em pacientes (ABDEL-HALEEM, 2006; D'SUZE et al., 2003; FUKUHARA et al., 2003; MAGALHÃES et al., 1999), quanto em modelos animais (DE MATOS et al., 1997; FIALHO et al., 2011; PESSINI et al., 2003; PETRICEVICH; PEÑA, 2002), produzindo alterações bioquímicas séricas e hematológicas (CUSINATO et al., 2010), indução de resposta nociceptiva e edematogênica na pata de animais de experimentação (NASCIMENTO et al., 2005; PESSINI et al., 2008), lesão e inflamação pulmonar aguda caracterizada por mecânica pulmonar alterada em modelo animal (COELHO et al., 2007; PERES et al., 2009) e em humanos, associados a miocardiocitólise (CUPO et al., 1994), dentre outros. Muitos estudos foram realizados para a compreensão dos efeitos da peçonha desse escorpião, fato este importante para o estabelecimento das condutas terapêuticas adequadas para tratar os casos de envenenamento para esta espécie.

Poucos são os estudos que abordam o escorpião *T. stigmurus* encontrados na literatura. Nishikawa et al. (1994) avaliaram a letalidade através da determinação da dose letal mediana (DL₅₀) da peçonha de sete espécies de escorpiões brasileiros, uma

delas, o *T. stigmurus*, que apresentou uma DL₅₀ de 0,773 mg/kg, o mais letal. Outros estudos apresentaram os casos de escorpionismo registrados em um determinado período de tempo relatando os principais sinais e sintomas do envenenamento por esse escorpião, o tratamento, a gravidade dos casos acompanhados e as mortes registradas, principalmente com crianças (ALBUQUERQUE et al., 2013; BARBOSA, 2014; GUARNIERI et al., 1996; LIRA-DA-SILVA et al., 2000).

Alguns estudos já foram desenvolvidos a fim de identificar as biomoléculas presentes na peçonha do *T. stigmurus*, através de análise proteômica e transcriptômica. Batista et al. (2007) fracionou a peçonha por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e as frações obtidas foram utilizadas para a determinação da massa molecular utilizando a espectrometria de massa. Em 2012, foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa o estudo do transcriptoma da glândula da peçonha de *T. stigmurus*, o que permitiu a primeira visão geral da expressão das moléculas presentes na glândula da peçonha desse animal em condições de repouso (sem pré-estimulação elétrica) (ALMEIDA et al., 2012). Um outro trabalho foi realizado com a peçonha a fim de investigar a presença de atividade enzimática. Foi observada uma atividade hialuronidásica significativa, além da capacidade para hidrolisar os substratos *Cathepsin K* (Abz-FLRRV-EDDnp) e dinorfina 1-13 que foram inibidos por 1,10-fenantrolina, mas não por fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), indicando a presença de metaloproteinases na peçonha (VENANCIO et al., 2013). Resultado semelhante foi obtido por Batista et al. (2007), que através do proteoma realizado com a peçonha de *T. stigmurus*, identificou uma hialuronidase que mostrou alta atividade contra o hialuronano *in vitro*.

Até o momento foram realizados poucos estudos com a peçonha do escorpião *Tityus stigmurus* (TstV) e/ou toxinas isoladas avaliando sua potencial atividade. Uma γ -toxina do *T. stigmurus* foi isolada, clonada e sequenciada, apresentando alta similaridade com outras γ -toxinas do *T. serrulatus* e *T. bahiensis*, porém não foram realizados testes de atividade biológica com a mesma (BECERRIL et al., 1996). Já Papp et al. (2009) purificaram um bloqueador de canal de potássio do tipo α , e por ensaios de eletrofisiologia *in vitro* avaliaram a atividade dessa toxina contra os canais de potássio do tipo voltagem-dependente (kv) kv1.2 e 1.3. A partir do transcriptoma da glândula de veneno do *T. stigmurus* (ALMEIDA et al., 2012), foi caracterizado outro bloqueador de canal de potássio do tipo β , através de modelagem por homologia,

dinâmica molecular e *docking* com o canal kv1.2, *in silico* (ALMEIDA et al., 2013). Duas outras sequências provenientes do transcriptoma realizado por Almeida et al. (2012), obtidas por via sintética foram estudadas em nosso laboratório, são elas: a Stigmurina, caracterizado como um peptídeo antimicrobiano (MELO et al., 2015) e o TistH, um peptídeo com ação hipotensora (MACHADO et al., 2015). Porém, até o momento, nada é encontrado na literatura sobre as alterações fisiopatológicas produzidas pela peçonha de *T. stigmurus* em modelo animal.

Considerando que *Tityus stigmurus* é um dos escorpiões de importância médico-sanitária no Brasil e que poucos são os estudos a respeito dos acidentes, aponta-se a necessidade dessa espécie ser melhor estudada. Por isso, o trabalho propõe avaliar alguns parâmetros inflamatórios e fisiopatológicos induzidos pelo envenenamento do escorpião *T. stigmurus* em modelos experimentais *in vivo*, visando entender melhor a fisiopatologia do envenenamento e assim contribuir para o desenvolvimento futuro de alternativas terapêuticas mais eficientes.



FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biologia dos escorpiões

2.1.1 Classificação e distribuição geográfica

Comprovadamente, os escorpiões existem há mais de 400 milhões de anos (fósseis do Carbonífero), sendo considerados os primeiros aracnídeos a habitarem o planeta. O seu exoesqueleto quitinoso, quase uniforme em todos os segmentos permitiu a fossilização de seus ancestrais e, por isso, compreende-se hoje a sua origem (CANDIDO, 1999; CRUZ, 1994).

Pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, os escorpiões são predadores terrestres inseridos na ordem Scorpiones, embora ocorram divergências quanto a classificação, pois as relações de parentesco entre os escorpiões e outros aracnídeos e dentro da própria ordem ainda são muito discutidas entre os especialistas, apesar de serem considerados oriundos de um grupo ancestral comum a todos os aracnídeos. Existem autores que indicam que eles se constituem como uma Classe e não como uma Ordem (FET; SOLEGLAD, 2005; PRENDINE; WHEELER, 2005). Com 14 famílias, 183 gêneros e aproximadamente 1800 espécies, os escorpiões são distribuídos em todos os continentes, com exceção da Antártida (REIN, 2012).

Os escorpiões potencialmente perigosos ao homem pertencem à família Buthidae, a única que tem ampla distribuição pelo mundo, com 48 gêneros e com aproximadamente 500 espécies (a maior em número e gênero) (LOURENÇO, 2004). Porém, apenas 25 espécies são consideradas perigosas ao homem. Os gêneros *Androctonus*, *Buthus*, *Leiurus*, *Buthotus* e *Heterometrus* são originários da África, principalmente no norte, Oriente Médio e Índia (BALOZET, 1971). O gênero *Parabuthus* tem sido relatado no sul da África (DEBONT et al., 1998), já o *Centruroides* é mais comum na América do Norte e Central (BRAVO-BECHERELLE; MAZZOTTI, 1961; DEHESA-DAVILA; POSSANI, 1994), enquanto escorpiões do gênero *Tityus* são originários da América do Sul e Trinidad e Tobago (BÜCHERL, 1971). No Brasil ocorrem cinco gêneros de Buthidae: *Isometrus*, *Ananteris*, *Microtityus*, *Rhopalurus* e *Tityus*. A esse último pertencem às espécies responsáveis pelos casos de

escorpionismo: *Tityus serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus* e *T. obscurus* (BRASIL, 2009).

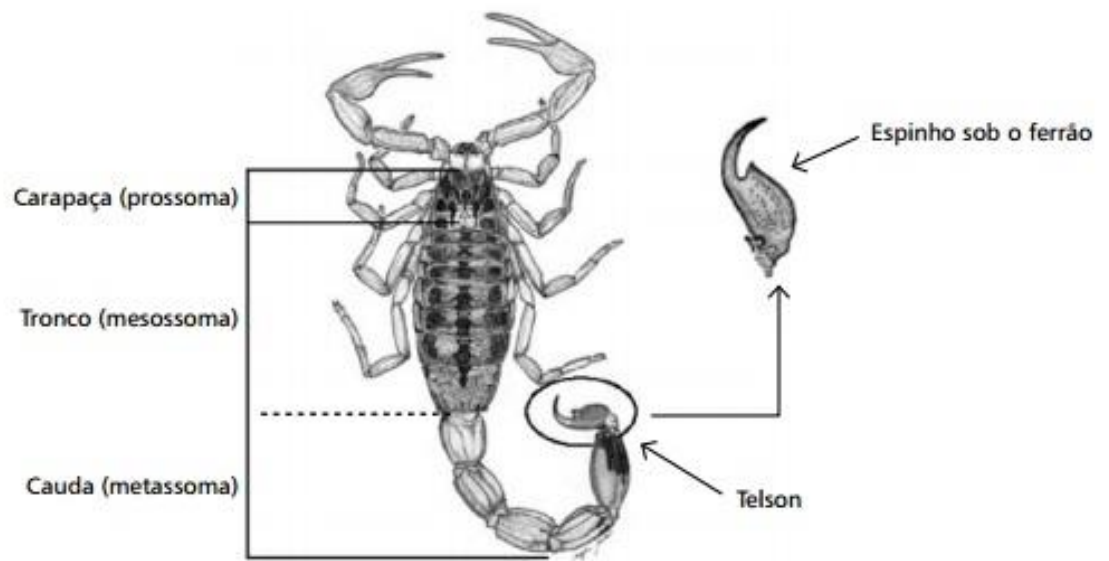
De acordo com dados do Ministério da Saúde, o escorpião *T. stigmurus* é uma espécie que predomina no Nordeste, nos seguintes estados: Pernambuco, Bahia, Ceará, Piauí, Paraíba, Alagoas, Sergipe e Rio Grande do Norte (BRASIL, 2001).

2.1.2 Morfologia

Os escorpiões apresentam corpo bem característico subdividido em duas regiões, o prossoma (cefalotórax) e o opistossoma (abdômen). O prossoma compreende a cabeça e os membros não apresentando segmentos, onde estão inseridos os apêndices, já o opistossoma apresenta segmentos. Essas duas partes não estão separadas e bem delimitadas, porém, o opistossoma (abdômen), é dividido em uma região anterior chamada mesossoma (pré-abdômen) de 8 segmentos e uma região posterior, o metassoma (pós-abdômen). O metassoma tem uma forma diferente das anteriores, é comprida e roliça, com uma cauda de 5 segmentos e no final, apresenta uma modificação chamada de télson ou aguilhão (ferrão) usado para inocular sua peçonha, onde está alocada um par de glândulas produtoras de veneno que desembocam em dois orifícios situados de cada lado da ponta do ferrão (BRASIL, 2009) (Figura 1).

No prossoma, o primeiro par de apêndices consiste de quelíceras, que se posicionam acima da boca e possuem não mais de três segmentos e na maioria das ordens, tem a forma de garras, porém pequenas. As presas são seguradas pelas pinças dos pedipalpos que formam o segundo par de apêndices, estruturas grandes e poderosas que podem ser usadas para segurar e dominar suas presas e também as fêmeas durante o acasalamento. Os escorpiões são muito sensíveis ao tato e ao deslocamento do ar, devido à presença de cerdas muito longas e finas, as tricobóteas, presentes nos pedipalpos. Em seguida, existem quatro pares de pernas (BRASIL, 2009).

Figura 1: Desenho esquemático de um escorpião. Vista dorsal. O mesossoma e o metassoma compõem o opistossoma. A cabeça e os membros compõem o prossoma.



FONTE: Adaptado de Manual de Controle de Escorpiões – Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasil, Ministério da Saúde, 2009.

Os olhos dos aracnídeos são simples ocelos. É no prossoma que se localizam um par de olhos medianos, na saliência cômodo-ocular, e dois a cinco pares de olhos laterais na borda da carapaça. Seus pequenos olhos são primitivos e só funcionam para perceber a luminosidade. Na porção ventral do mesossoma, se encontram o opérculo genital e os apêndices sensoriais em forma de pentes, que permitem a captação de estímulos mecânicos e químicos do meio por serem ricamente innervados, além de espiráculos que são aberturas externas dos pulmões (CLOUDSLEY-THOMPSON, 1968).

O escorpião *Tityus stigmurus* possui 6 a 7 cm de comprimento, apresenta o corpo amarelado, sem manchas nas pernas e palpos. A presença de um triângulo escuro na face dorsal anterior do cefalotórax seguida de uma faixa escura longitudinal e mediana bem definida no mesossoma são as características que o diferenciam do *Tityus serrulatus*, outra espécie que também conhecida como escorpião amarelo (Figura 2). Diferentemente do *T. stigmurus*, o *T. serrulatus* apresenta a face anterior do cefalotórax e do mesossoma todo escuro. Porém, ambos os escorpiões apresentam uma serrilha na face dorsal do 3º e 4º segmento da cauda (BRASIL, 2009).

Figura 2: Escorpião *Tityus stigmurus*.



FONTE: Adaptado de Fundação Nacional de Saúde – Brasil, Ministério da Saúde 2001.

2.1.3 Reprodução

Os escorpiões são dióicos e vivíparos. No período de acasalamento, o macho caminha a procura da fêmea e, quando a localiza, segura-a com os palpos, a fêmea pode ser receptiva ou não, mas se receptiva, ele a segura e caminham bastante, procurando um local adequado para a deposição e fixação do espermatóforo para que ocorra a fecundação e quando realizada, eles se separam (MATTHIESEN, 1966). As fêmeas apresentam um período de gestação variado, em geral, dura três meses para o gênero *Tityus*. Durante o parto, a fêmea eleva o corpo e faz um “cesto” com as pernas dianteiras para que os filhotes recém-nascidos subam no dorso e ali permaneçam por alguns dias até realizarem a primeira troca de pele (ecdise). Passados mais alguns dias, abandonam o dorso da mãe e passam a ter vida independente. O período entre o nascimento e a dispersão dos filhotes varia bastante, para *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* é de aproximadamente 14 dias (CANDIDO, 1999). Os escorpiões trocam de pele periodicamente e passam por um número limitado de mudas até a maturidade sexual, quando então param de crescer (POLIS, 1990).

Algumas espécies do gênero *Tityus*, como o *T. serrulatus*, possuem populações formadas apenas por fêmeas, cuja reprodução se dá por partenogênese (CANDIDO, 1999; MATTHIENSEN, 1971; MELLO-LEITÃO, 1939). Este fenômeno facilita sua dispersão; por causa da adaptação a qualquer ambiente, uma vez transportado de um local a outro (introdução passiva), instala-se e prolifera-se com muita rapidez. Além disso, a introdução de *T. serrulatus* em um ambiente pode levar ao desaparecimento de outras espécies de escorpiões devido à competição. Porém, alguns trabalhos consideram o *T. serrulatus* componente de um complexo com o *T. stigmurus*, apresentando quatro formas: *confluenciata*, *confluenciata/maculata*, *unifasciata* e *trifasciata*. Duas delas (*confluenciata/maculata* e *trifasciata*) se reproduzem sexualmente, ou seja, nesse complexo (*T. serrulatus/T. stigmurus*), existiriam populações sexuais e partenogenéticas (LOURENÇO et al., 1995; LOURENÇO; CLOUDSLEY-THOMPSON, 1999) e é essa característica a responsável pelo rápido espalhamento e multiplicação em áreas urbanas desses escorpiões, contribuindo assim para o aumento do número desses animais e conseqüentemente o aumento do número de acidentes (CANDIDO, 1999).

2.1.4 Habitat e hábitos

Diversos são os habitats que os escorpiões ocupam, desde pedras, madeiras, troncos podres, bromélias que crescem do chão ou ainda no alto das árvores, com algumas espécies que se enterram no solo úmido das matas, outras na areia dos desertos até as várias espécies que habitam cavernas ou que vivem ao longo das praias (POLIS, 1990). Esses animais encontram-se ainda escondidos junto às habitações humanas e em entulhos de construção (GUARNIERI, 1998).

Em particular, as espécies do gênero *Tityus* apresentam alta plasticidade ecológica com uma capacidade de dispersão razoável e por isso, são encontradas em ambientes perturbados ou modificados pela ação do homem como espécies oportunistas ou generalistas (LOURENÇO et al., 1996). A presença e proliferação de escorpiões em cidades têm sido vinculadas tanto a características fisiológicas destes animais, assim como a características socioeconômicas do local, como a alta densidade demográfica, crescimento desordenado, ausência de saneamento básico,

acúmulo de lixo e de material de construção, propiciando refúgio e alimentação para esses animais, já que esses ambientes são viveiros de insetos caseiros (LIRA-DA-SILVA et al., 2000). Porém, o comportamento adaptativo em cidades altamente urbanizadas está associado ao *T. serrulatus* e *T. stigmurus* (LIRA-DA-SILVA et al., 2000; LOURENÇO et al., 1996).

A alimentação dos escorpiões é composta principalmente de insetos, aranhas e pequenos vertebrados vivos, sendo portanto animais carnívoros. Porém em casos que não há alimento disponível, o animal diminui o seu metabolismo, ficando sobre jejum absoluto. No entanto há casos em que o canibalismo foi observado em consequência da competição pelo espaço quando estão em cativeiro, com alimentação restrita e espaço reduzido (CRUZ, 1994; GUARNIERI, 1998).

Dentre seus predadores estão camundongos, quatis, macacos, sapos, lagartos, corujas, seriemas, galinhas, algumas aranhas, formigas, escolopendras e os próprios escorpiões. O grande inimigo, todavia, tem sido o homem, através da utilização de agrotóxicos, fogo, desmatamento e pelo crescimento urbano explosivo (POLIS, 1990).

2.2 Peçonha

Os compostos biologicamente ativos presentes na peçonha dos escorpiões variam de acordo com a área habitada e o tipo de dieta consumida pelo animal (GUARNIERI et al., 1998). Quando extraído das glândulas de veneno por estimulação elétrica do télson do animal ou maceração da glândula, a peçonha é submetida ao processo de centrifugação, esta origina duas frações: uma insolúvel em água e outra solúvel. A fração insolúvel, que é não tóxica, mas pode conter toxinas, é constituída por mucoproteínas e restos de membrana. Na fração solúvel estão presentes os componentes tóxicos, rico em uma mistura de peptídeos de natureza básica, que possuem baixa massa molecular (neurotoxinas) e em menor proporção outros compostos como aminoácidos livres, sais inorgânicos, lipídeos, nucleotídeos, moléculas de baixa massa molecular como serotonina e histamina, inibidores de protease, liberadores de histamina, aminoácidos e outros componentes orgânicos (WATT; SIMARD, 1984; GWEE, CHEAH; GOPALAKRISHNAKONE, 1996).

2.3 Toxinas escorpiônicas

De forma geral, o principal constituinte da peçonha de escorpiões é um grupo de moléculas resistentes ao aquecimento, estabilizadas por pontes dissulfeto, de natureza básica e de baixa massa molecular, que são as neurotoxinas. A dedicação de muitos pesquisadores ao estudo do mecanismo de ação da peçonha de escorpiões levou a descoberta desse grupo de toxinas responsáveis pela imobilização de presas e na defesa contra predadores (BOSMANS; TYTGAT, 2007). As neurotoxinas são os componentes mais importantes da peçonha de escorpiões e afetam os mecanismos de permeabilidade iônica de membranas excitáveis através da interação específica com canais de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- (ISMAIL, 1995; POSSANI et al., 1999). Apesar das neurotoxinas atuarem em alvos moleculares distintos, possuem um motivo estrutural semelhante, constituído por uma ou duas α -hélices e duas a três β -folhas estabilizadas por cisteínas (MOUHAT et al., 2004; KOBAYASHI et al., 1991). Algumas toxinas que agem em canais de cálcio apresentam o motivo “*inhibitor cystine knot*” (ICK) (ZHU et al., 2003).

Além dos peptídeos que interferem na permeabilidade das membranas aos íons, outros compostos com estrutura e função diferentes têm sido encontrados na peçonha de escorpiões. Elas variam de tamanho entre 13-50 aminoácidos e compartilham baixos graus de similaridade. Essa nova classe de biomoléculas foi denominada de *Non-Dissulfide-Bridged-Peptide* (NDBP) por não possuírem resíduos de cisteína e apresentam diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, hemolítica, imunomoduladora e potencializadores de bradicinina (LUO et al., 2005; ZENG et al., 2005).

Alguns estudos foram desenvolvidos a fim de identificar as biomoléculas presentes na peçonha de *T. stigmurus* através de análise proteômica e transcriptômica. Batista et al. (2007) fracionou a peçonha por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e as frações obtidas foram utilizadas para a determinação da massa molecular utilizando a espectrometria de massa. Quatro toxinas foram totalmente sequenciadas, semelhantes a toxinas de canal de sódio e de canal de potássio encontradas na peçonha de *T. serrulatus* e, um novo peptídeo rico em prolina

de função desconhecida. Também foram parcialmente sequenciadas duas enzimas: hialuronidase e lisozima.

Através do estudo de transcriptoma realizado por Almeida et al. (2012) também foi identificado um repertório de toxinas putativas presentes na glândula do veneno do *T. stigmurus*. Toxinas de canal de potássio (KTx) e de canal de sódio (NaTx) do tipo α e β , hipotensinas, peptídeos antimicrobianos, lectinas, peptídeos aniônicos, metaloproteases e peptídeos ricos em cisteína foram identificados como possíveis moléculas que compõem a peçonha desse escorpião.

2.3.1 Toxinas que agem nos canais de sódio

Os canais de sódio presentes nas células são considerados um dos componentes mais importantes na fisiopatologia do envenenamento, já que são os alvos de uma das principais neurotoxinas presentes na peçonha de escorpiões (BOSMANS; TYTGAT, 2007). Os canais de sódio são proteínas que formam poros e são responsáveis pela excitabilidade e propagação de potenciais de ação nas células excitáveis (HILLE, 2001). Formados por duas subunidades, uma α e três β , em mamíferos, e uma α e uma TipE, em insetos, esses canais apresentam estrutura tridimensional, tipologia e uma sequência de aminoácidos conservados na subunidade α para ambos. Os canais Na^+ voltagem-dependentes (Nav) ainda apresentam diferentes isoformas expressas em células de mamíferos (Nav 1.1 a Nav 1.9) (CESTÈLLE; CATTERAL, 2000).

As toxinas escorpiônicas se ligam a sítios encontrados na subunidade α dos canais de sódio voltagem-dependentes, apresentando cadeia longa e estrutura secundária altamente conservada estabilizada por 3 a 4 pontes dissulfeto, divididas em dois grupos: α e β -Toxinas. As α -Toxinas são peptídeos formados por cerca de 60 a 70 aminoácidos que se ligam ao sítio 3, prolongando o potencial de ação de células excitáveis, podendo matar indivíduos induzindo paralisia ou arritmias (BOSMANS; TYTGAT, 2007). Já as β -Toxinas possuem cerca de 60 a 65 aminoácidos, com afinidade de ligação ao sítio 4, alterando a dependência da voltagem de ativação para potenciais mais negativos, gerando assim, potenciais de ação espontâneos e contínuos (CESTÈLLE; CATTERAL, 2000).

Alvos moleculares para diversas toxinas, os canais de sódio sofrem alterações significativas da sua função como a liberação de neurotransmissores, e essa alteração é a principal responsável pelos efeitos tóxicos da peçonha, e que tem despertado o interesse de vários pesquisadores para o uso dessas moléculas em uma variedade de abordagens e estudos interdisciplinares (CESTÈLLE; CATTERAL, 2000).

No estudo dos transcritos da glândula do veneno do *T. stigmurus*, foram identificados apenas 2 *clusters* de codificação para sequências de α -NaTx e 3 *clusters* para sequências de β -NaTx. Este fato pode ser associado com menor letalidade do envenenamento em humanos por *T. stigmurus* quando comparado com os acidentes ocasionados por *T. serrulatus*, visto que as NaTx são a classe de neurotoxinas mais expressas na glândula desse escorpião (ALMEIDA et al., 2012; ALVARENGA et al., 2012).

2.3.2 Toxinas que agem nos canais de potássio

Os canais de potássio presentes nas células são muito importantes na fisiopatologia do envenenamento, pois atuam em processos fisiológicos como a excitabilidade celular, liberação de neurotransmissores, secreção de hormônios, regulação da secreção de fluidos, ativação de linfócitos dentre outros. Estes canais apresentam a maior diversidade entre os canais iônicos e podem ser agrupados em quatro famílias: os canais dependentes de voltagem (Kv, com 12 subfamílias) (GUTMAN et al., 2005), os ativados por cálcio (Kca, com 5 subfamílias) (WEI et al., 2005), os retificadores de influxo (Kir, com 7 subfamílias) (KUBO et al., 2005) e aqueles com dois poros *in tandem* (K2P, com 16 subfamílias) (GOLDSTEIN et al., 2005). São conhecidos aproximadamente 100 subtipos de canais que regulam o fluxo do íon potássio (MILLER, 2000). Estes canais pertencem à família dos canais tetraméricos, constituídos de estruturas proteicas arranjadas em subunidades que, comumente, são organizadas em seis segmentos transmembrânicos helicoidais (PRINGOS et al., 2011).

Os canais de potássio alvos de interação das toxinas escorpiônicas são aqueles da família KCa e Kv, mas a maioria das toxinas escorpiônicas agem sobre aqueles regulados por voltagem (Kv) (PANYI et al., 2006). A família de canais de

potássio voltagem-dependente (Kv) se expressa heterologicamente dependendo do tecido e varia segundo o grupo taxonômico ao qual pertence o organismo. Formados por mais de 40 tipos diferentes, os canais de potássio regulados por voltagem são classificados em 12 subfamílias (Kv1-Kv12) estruturalmente similares. Há relatos na literatura que as subfamílias Kv1, Kv4 e Kv10 dos canais de potássio são sítios de ligação para toxinas escorpiônicas e que estas se ligam a porção extracelular do poro condutor ocluindo assim a passagem de íons (bloqueio físico), ou pela modulação da parte sensível à voltagem (MOUHAT et al., 2004).

Em geral, as toxinas escorpiônicas bloqueadoras de canais de potássio são compostas por 20-70 aminoácidos, apesar da maioria não possuir mais que 40. Essas toxinas são estabilizadas por 3 a 4 pontes dissulfeto e apresentam um domínio estrutural conservado, o “motivo $\alpha\beta$ ”. São agrupadas em 4 famílias (α , β , γ e κ) de acordo com o seu tamanho molecular, localização de cisteínas e similaridade de suas estruturas primárias (TYTGAT et al., 1999).

α -KTx é uma família de toxinas de cadeia curta e se constitui de duas fitas- β unidas a uma α -hélice por 3 ou 4 ligações dissulfeto. Já as β -KTxs são constituídas de 60-65 aminoácidos compostas de uma estrutura α -hélice e duas fitas- β , unidas por três ligações dissulfeto (RODRÍGUEZ DE LA VEJA; POSSANI, 2005; TYTGAT et al., 1999). Estas toxinas apresentam duas extremidades bem caracterizadas com diferentes relações estrutura/função. A região N-terminal, que apresenta similaridade com defensinas de insetos, é responsável pela atividade citolítica e/ou antimicrobiana da toxina, enquanto que a porção C-terminal é responsável pela atividade bloqueadora de canais de potássio (DIEGO-GARCÍA et al., 2008; ROGOWSKI et al., 1994; LEGROS et al., 1996).

As γ -KTxs são constituídas de uma estrutura em α -hélice e duas fitas- β (RODRÍGUEZ DE LA VEJA; POSSANI, 2005), unidas por quatro ligações dissulfeto e distribuídas em cinco subfamílias (GURROLA et al., 1991; KOROLKOVA et al., 2001; CORONA et al., 2002). Já as poucas toxinas de cadeia curta da família κ -KTx foram isoladas das peçonhas de *Heterometrus fulvies*, *Heterometrus soubufer* e *Opisthacanthus madagascariensis* e assim designadas por causa de sua nova estrutura de “bi-hélice” (SRINIVASAN et al., 2002; NIRTHANAN et al., 2005). Compõem-se de duas estruturas em α -hélice paralelas estabilizadas por duas

ligações dissulfeto (NIRTHANAN et al., 2005) e são de natureza básica, com dois novos membros da subfamília k-KTx 2, meramente ácidos (CHEN et al., 2012).

Foram identificados 10 *clusters* de codificação para sequências de α -KTX e 3 *clusters* para sequências de β -KTX através do estudo dos transcritos da glândula do veneno do *T. stigmurus* e as toxinas de canal de potássio foram a terceira classe de toxina mais expressa dentre todos os transcritos avaliados (ALMEIDA et al., 2012). Dois *clusters* foram semelhantes a peptídeos da peçonha de *T. serrulatus* (PIMENTA et al., 2003). Um deles tem uma sequência mais curta, com um comprimento de 62 aminoácidos, e a sua possível sequência madura compartilha 91% de identidade com TST-17, uma KTx da peçonha do *T. stigmurus* identificada utilizando proteômica (BATISTA et al., 2007).

Papp et al. (2009) purificaram um bloqueador de canal de potássio do tipo α , e por ensaios de eletrofisiologia avaliaram a atividade dessa toxina contra os canais de potássio do tipo voltagem-dependente Kv1.2 e Kv1.3 *in vitro* e a partir do transcriptoma da glândula do veneno do *T. stigmurus* (ALMEIDA et al., 2012), foi caracterizado outro bloqueador de canal de potássio do tipo β , através de modelagem por homologia, dinâmica molecular e *docking* com kv1.2 *in silico* (ALMEIDA et al., 2013).

2.3.3 Non-Dissulfide-Bridged-Peptide (NDBP)

Além dos peptídeos que interferem na permeabilidade das membranas aos íons, outros compostos com estrutura e função diferentes têm sido encontrados na peçonha de escorpiões. Elas variam de tamanho entre 13-50 aminoácidos e compartilham baixos graus de similaridade. Essa nova classe de biomoléculas foi denominada de *Non-Dissulfide-Bridged-Peptide* (NDBP) por não possuírem resíduos de cisteína e apresentam diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, hemolítica, imunomoduladora e potencializadores de bradicinina (LUO et al., 2005; ZENG et al., 2005).

A Stigmurina, caracterizada como um peptídeo antimicrobiano teve a sequência obtida do transcriptoma realizado por Almeida et al. (2012). Os ensaios de atividade biológica foram realizados com o peptídeo obtido por via sintética, o qual apresentou ação contra bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* meticilina

resistente (MRSA) (ATCC 33591) (bactérias Gram positivas) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Gram negativa), além de apresentar atividade contra os fungos *Candida albicans* (ATCC 90028), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. glabrata* (ATCC 90030) e ser tóxico contra linhagens celulares SiHa e Vero E6 *in vitro* (MELO et al., 2015). Os peptídeos antimicrobianos foram a segunda classe de toxinas mais expressas com 9 clusters e 138 clones no estudo do transcriptoma da glândula do veneno do *T. stigmurus* (ALMEIDA et al., 2012).

Também proveniente do transcriptoma da glândula do veneno do *T. stigmurus* (ALMEIDA et al., 2012), foi estudada a sequência de um possível peptídeo potencializador de bradicinina (PPB), também obtido por via sintética, nomeado de TistH. Observou-se que em ratos normotensos TistH foi capaz de potencializar a ação hipotensora da bradicinina e induzir um efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica com liberação endotélio dependente de óxido nítrico (NO), demonstrando inibição independente da enzima convertidora de angiotensina. Além disso, o TistH não apresenta efeito citotóxico em eritrócitos de cavalo (MACHADO et al., 2015).

2.4 Escorpionismo

2.4.1 Epidemiologia

Provas evolutivas mostram que a peçonha de escorpiões está associada à captura das presas e à sua digestão, e apenas secundariamente relacionado ao comportamento defensivo (CANDIDO, 1999). No entanto, o contato físico entre os seres humanos e escorpiões é fruto da modificação do seu ambiente natural pelo desmatamento e pela ocupação do homem, causando uma quebra na cadeia alimentar, acabando também com seus locais de abrigo. Com a escassez, esses animais passaram a procurar alimento e abrigo em residências, terrenos baldios e áreas de construção e essa ocupação desordenada resulta no contato com seres humanos e em uma picada de caráter defensivo. Se a peçonha exerce um resultado grave ou fatal, o incidente é definido como "escorpionismo", que consiste no processo de envenenamento causado pela picada dos escorpiões (LOURENÇO et al., 1995).

Os acidentes por escorpiões são considerados de importância médico-sanitária no Brasil, não só pela incidência, mas também pela potencialidade da peçonha de algumas espécies que resultam em quadros clínicos graves, podendo ser fatal para o indivíduo que foi picado, principalmente em crianças (BÜRCHERL, 1968).

Foi na região Sudeste com Maurano (1915) e Vital Brasil (BRASIL, 1907), seguidos mais tarde por Magalhães (1929, 1945) e Bürchel (1969) que os estudos sobre a peçonha de escorpiões surgiram no país. Os escorpiões são os responsáveis pela maior ocorrência de acidentes com animais peçonhentos no Brasil. Quase metade das notificações relacionadas a acidentes com animais peçonhentos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) é devido a estes animais. Em 2012, houve 65.008 casos de acidentes com escorpiões, ou seja, 45% do total de notificações no ano (BRASIL, 2013).

O problema do escorpionismo no Nordeste ainda é pouco conhecido, com alguns registros esporádicos feitos pelas Secretarias Estaduais de Saúde, sendo o *T. stigmurus* o principal responsável por esses casos na região (BRASIL, 2001). O primeiro caso foi reportado em Recife, onde registraram acidentes com *T. stigmurus* e crianças, culminando em um óbito (EICKSTEDT, 1983). Na Bahia, foram notificados 237 casos causados pelo escorpião *Tityus stigmurus* no período de 1982 a 1995 e tratados pelo Centro de Informações Antiveneno. Os acidentes ocorreram principalmente no município de Salvador (89,4%), com uma distribuição mensal irregular dos casos e todos evoluídos para cura, sem óbitos (LIRA-DA-SILVA et al., 2000).

Dados do Centro de Assistência Toxicológica de Pernambuco mostraram que entre 2006 e 2010 as picadas do escorpião *T. stigmurus* responderam por mais de 60% dos casos registrados envolvendo animais peçonhentos no estado. Segundo dados, 28,8% das vítimas que foram picadas eram crianças e independente do tempo decorrido para um prognóstico, a maioria dos casos apresentaram sintomas leves. Porém, três crianças apresentaram casos moderados, que resultaram na morte por choque cardiogênico e/ou edema pulmonar ou sintomas neurológicos graves, sendo, pela primeira vez, a morte atribuída a *T. stigmurus*, confirmado pela presença do escorpião. A maior incidência de casos foi na região metropolitana de Recife com aumento dos casos durante a estação chuvosa (ALBUQUERQUE et al., 2013).

As notificações do Sistema de Informações de Agravos de Notificações (SINAN) dos acidentes ocorridos no estado do Rio Grande do Norte no período de 2007 a 2011 mostraram a ocorrência de 10.251 acidentes, sem marca de sazonalidade. O sexo feminino e os indivíduos de 40 a 59 anos de idade foram os mais acometidos. 96,48% dos acidentes foram classificados clinicamente como grau leve. As manifestações locais foram observadas em 93,96% dos indivíduos, sendo os pés (26,46%) e dedos das mãos (24,90%) as regiões mais atacadas. A taxa de letalidade foi de 0,058%. Os municípios da região metropolitana da capital do estado registraram as maiores incidências. O estado do RN apresentou elevado número de acidentes por escorpiões, sendo observado maior número de acidentes em municípios mais urbanizados (BARBOSA, 2014).

2.4.2 Quadro clínico

Após a picada, surgem os sinais e sintomas do envenenamento, que são variados e vão desde dores locais a alterações sistêmicas graves. De forma geral, o quadro clínico depende da gravidade do acidente. Num estudo com 361 casos registrados com o *T. stigmurus* na região metropolitana de Recife, no local da picada os sinais e sintomas mais comumente observados foram dor (78,1%), parestesia (16,6%), edema (15,7%), lesão cutânea (11,3%) e hiperemia (6%) e os principais sinais e sintomas gerais foram vômitos (10,2%) sudorese (7,5%) e sonolência (6,3%) (GUARNIERI et al., 1996). Já os envenenamentos por *T. stigmurus* na Bahia, caracterizaram-se por manifestações locais: dor (94,4%), dormência (30%), edema (17,8%), eritema (17,8%) e parestesia (15,6%) e sistêmicos: cefaleia (14%), vômitos (4,4%) e sudorese (3,3%). A maioria dos envenenamentos (94%) apresentou quadro leve e todos evoluíram para cura (com ausência de letalidade), com o restabelecimento dos pacientes, inclusive nos casos graves (LIRA-DA-SILVA et al., 2000).

Albuquerque et al. (2013) relataram a morte de três crianças causadas por picadas de *T. stigmurus*. O quadro clínico dessas três crianças foram considerados casos moderados que resultaram na morte por choque cardiogênico e/ou edema pulmonar ou sintomas neurológicos graves. Pela primeira vez, a morte atribuída a *T. stigmurus* foi confirmada pela presença do escorpião e caracterizado levantamentos

epidemiológicos e clínicos de casos pediátricos de escorpionismo registrados no Centro de Assistência Toxicológica de Pernambuco. Os sinais e sintomas locais observados foram: dor (71,6%), parestesia (17,2%), edema (2,3%) e eritema (2,3%) e os sistêmicos foram: vômitos (18,2%), diaforese (4,8%), dispneia (3,9%), sonolência (3,5%), taquicardia (3,4%), náuseas (2,9%), hipertermia (1,9%), sialorreia (0,5%), cefaléia (0,5%), palidez (0,4%), tonturas (0,2%), convulsão (0,2%), desmaio (0,2%), dor abdominal (0,2%), agitação (0,2%), taquipnéia (0,2%), bradicardia (0,2%), calafrios (0,1%), hipotonia (0,1%), astenia (0,1%), tremores (0,1%), vermelhidão (0,1%) e edema (0,1%).

2.4.3 Classificação clínica e tratamento

Dependendo da intensidade dos sintomas apresentados pelos pacientes picados, o “escorpionismo” pode ser classificado em graus de gravidade, agrupando-os em casos leves, moderados ou graves (CUPO et al., 2003). A gravidade depende de fatores como a espécie e tamanho do escorpião, a quantidade de peçonha inoculada, região da picada, a massa corporal do acidentado e a sensibilidade do paciente a peçonha. Todos esses fatores influenciam na evolução do quadro, assim como o diagnóstico precoce e o atendimento médico em curto espaço de tempo decorrido entre a picada e a administração do soro (BRASIL, 2001).

O paciente classificado como leve apresenta sinais e sintomas locais, como dor e sensação de queimação, não há tratamento específico e no geral há o combate a dor e o paciente fica em observação no ambiente hospitalar por 6 a 12 horas. Nos casos moderados as manifestações clínicas presentes são os sinais e sintomas locais e alguns sistêmicos como agitação, sonolência, sudorese, náuseas, poucos vômitos, hipertensão arterial, taquicardia e taquipnéia. O tratamento específico é 2-3 ampolas de soro antiescorpiônico, de 5 mL com potência de 1 mg/mL principalmente para crianças até 7 anos de idade e no geral há o tratamento sintomático, o combate à dor e o paciente fica em observação durante 12-24 horas. Já nos casos graves o paciente apresenta sinais e sintomas locais e sistêmicos, com vômitos profusos e frequentes, náuseas, sialorréia, lacrimejamento, sudorese profusa, agitação, alteração de temperatura, taquicardia, hipertensão arterial, taquipnéia, tremores, espasmos

musculares, paralisias até convulsão, podendo evoluir para bradicardia, bradipnéia, edema pulmonar agudo, colapso cardiocirculatório e culminar em coma e morte. Nesses casos, o tratamento específico é realizado com 4 – 6 ampolas de soro antiescorpiônico e no geral há o tratamento sintomático, o combate à dor e o paciente deve receber internação hospitalar com cuidados intensivos, monitorização e manutenção das funções vitais (BRASIL, 2001).

2.5 Peçonha e toxinas escorpiônicas agindo na inflamação

A inflamação é um processo fisiopatológico desencadeado por vários estímulos diferentes, como agentes químicos, físicos, infecciosos que induz uma resposta do sistema imune (HERSH; BODEY, 1970). Sabe-se que essa resposta a diferentes estímulos que induz a liberação de mediadores endógenos, entre eles histamina, serotonina, bradicinina, metabólitos do ácido araquidônico, neuropeptídeos, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, citocinas, dentre outros (CASTELLHEIM et al., 2009). Esses mediadores são responsáveis pelos sinais cardinais da inflamação (dor, calor, rubor, edema e perda de função) e estão envolvidos na ativação de células leucocitárias para o local da injúria.

As vias e os mecanismos pelo qual a peçonha de escorpiões modulam o sistema imunológico ainda não estão claros, porém peçonha de animais contém diferentes toxinas capazes de modular o sistema imunológico, podendo levar a desordens inflamatórias. Há fortes indícios de que processos inflamatórios, locais e sistêmicos, são ocasionados pelos venenos dos escorpiões do gênero *Tityus* (PEREIRA, 2007). Os sinais que podem ser encontrados em vítimas de acidentes com escorpiões são halo eritematoso e edema local, além de dor (HOREN, 1972; WILSON, 1987). Estes sinais indicam que os venenos de escorpiões podem induzir reações inflamatórias locais. Já em níveis sistêmicos o escorpionismo é caracterizado pela presença de níveis aumentados de citocinas pro-inflamatórias, como as interleucinas (IL) IL-1 α , IL-1 β , IL-6 (MAGALHÃES et al., 1999), TNF- α (AMARAL et al., 1994), IFN- γ (interferon gama) e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) (MAGALHÃES et al., 1999).

Uma possível e importante ação dessas citocinas recai sobre o sistema hematopoiético, podendo estimular a produção de leucócitos e sua mobilização do sangue para um tecido inflamado. Esse processo, conhecido como migração, é composto de etapas nas quais os leucócitos margeiam o endotélio, passando por momentos de rolagem e aderência, para posteriormente migrar para o tecido (LAWRENCE; SPRINGER, 1991; MAYADAS et al., 1993). Essas etapas são comandadas por uma série de moléculas de adesão, que são expressas tanto no endotélio quanto no leucócito e são fundamentais para o desenvolvimento da resposta inflamatória.

A maioria dos dados clínicos e experimentais sobre o escorpionismo em nosso país referem-se a estudos com o *Tityus serrulatus*, porém outra espécie de nossa fauna, o *Tityus stigmurus*, também é causadora de acidentes, no entanto, há carência na literatura de estudos que relatem sobre o envenenamento induzido por esse animal. Como pertencem ao mesmo gênero, os venenos de ambos contem principalmente toxinas que atuam sobre canais iônicos, que respondem por grande parte dos sintomas associados ao escorpionismo.

Estudos utilizando a peçonha bruta de *Tityus serrulatus* revelaram que o mesmo pode induzir uma resposta inflamatória aguda quando inoculado na cavidade peritoneal de ratos, através de mecanismos mediados por citocinas inflamatórias, tais como IL-6, IL-1 α e TNF- α (PESSINE et al., 2003). Fialho et al. (2011) demonstrou que o veneno era capaz de induzir o recrutamento de células do sistema imune tanto para órgãos linfóides, baço e linfonodos, como para o sangue e reforçou que após a administração ocorre aumento de citocinas séricas inflamatórias, indicando que o veneno é capaz de induzir uma resposta inflamatória imediata. Um dos principais problemas do envenenamento pelo *T. serrulatus* são as alterações que ocorrem em nível pulmonar, que são caracterizadas pelo infiltrado de células mono e polinucleares no pulmão (PERES et al., 2009). Geralmente essas células migram do sangue periférico para o tecido, motivo pelo qual o veneno causa neutrofilia no sangue e diminuição dessa população celular na medula óssea (BORGES et al., 2000; COELHO et al., 2007). Peres et al. (2009) mostrou que o veneno também é capaz de alterar a mecânica e a pressão pulmonar, devido a presença de enzimas gelatinolíticas e metaloproteases, agentes envolvidos no processo inflamatório.

Outro estudo utilizando o veneno do *Tityus discrepans* demonstrou os efeitos inflamatórios causado pelo envenenamento em carneiros, com elevação de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e infiltrado leucocitário em vários órgãos (pâncreas, pulmões, intestino e fígado), além de efeitos neurotóxicos (D'SUZE et al., 2003). Pinto et al. (2009) mostrou o efeito inflamatório causado pelo veneno do *Tityus fasciolatus* através de análises histológicas em ratos, onde foi encontrado formação de halos hemorrágicos e infiltrado leucocitário tanto no pulmão como no coração, porém não no sangue.

Apesar de vários estudos demonstrarem o efeito inflamatório do envenenamento em várias espécies do gênero *Tityus*, até o momento não existem estudos exibindo o efeito inflamatório do envenenamento por *Tityus stigmurus*, o que torna esse trabalho inédito.



OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos inflamatórios e fisiopatológicos induzidos pelo envenenamento do escorpião *Tityus stigmurus* em modelos experimentais *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos sistêmicos do envenenamento por administração da peçonha do escorpião *T. stigmurus* pela via intraperitoneal em camundongos, em diferentes intervalos de tempo;
- Coletar órgãos (pulmão, rim, baço, coração e fígado) para determinação do peso relativo;
- Avaliar as alterações bioquímicas séricas causadas pelo envenenamento;
- Dosagem de citocinas (TNF- α e IL-10) no soro;
- Observar os efeitos locais do envenenamento através do modelo de peritonite e detectar a presença de células inflamatórias na cavidade peritoneal através de contagem global e diferencial de leucócitos, dosagem de mieloperoxidase, além da dosagem de nitrito, proteínas totais e citocinas (TNF- α e IL-10) em diferentes intervalos de tempo;
- Observar os efeitos locais do envenenamento através do modelo de edema de pata em diferentes intervalos de tempo.



MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Peçonha

Os escorpiões *Tityus stigmurus* foram coletados na cidade de Natal e mantidos em cativeiro na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, mediante a autorização Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (protocolo nº 34113-1 ICMBio/Sisbio). A peçonha bruta dos animais foi obtida por estimulação elétrica dos télsons, diluídos em PBS estéril, centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante, contendo a fração solúvel foi estocado a -20 °C até o uso. A concentração da peçonha foi expressa em termos de proteínas (µg/mL), dosadas pelo método do ácido bicinconínico (BCA), utilizando-se albumina bovina sérica como padrão, conforme descrição do fabricante (PIERCE, EUA).

4.2 Animais de experimentação

O estudo foi realizado com camundongos (*Mus musculus*) BALB/c, machos e fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da UFRN. Todos os animais receberam água e ração comercial *ad libitum* em condições ambientais controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro e escuro de 12 horas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte com o número de protocolo 028/2014 e realizado de acordo com as diretrizes brasileiras do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONSEA). Grupos com cinco animais (n=5) foram utilizados para cada grupo.

4.3 Determinação da dose letal mediana (DL₅₀)

A toxicidade da peçonha de *T. stigmurus* foi avaliada de acordo com Finney (1971) por meio da determinação da dose letal mediana (DL₅₀) em camundongos, definida como aquela capaz de causar a morte de 50% dos animais de experimentação em 48 h, quando administrado intraperitonealmente.

Para a determinação da DL₅₀, foram testadas as doses 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 µg por 20 g de animal injetadas por via intraperitoneal em 200 µL de PBS estéril. Um grupo que recebeu o mesmo volume contendo PBS estéril foi utilizado como controle. Os grupos que possuíam n amostral igual a 6. A taxa de sobrevivência dos animais foi observada até 48 horas da administração da peçonha e do PBS. Ao final do experimento, os animais sobreviventes foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg), por via intraperitoneal e foi realizado deslocamento cervical para eutanásia.

4.4 Avaliação dos efeitos sistêmicos induzidos pelo envenenamento com o escorpião *Tityus stigmurus*

4.4.1 Indução do envenenamento

A fim de avaliar os efeitos sistêmicos do envenenamento induzido pelo escorpião *T. stigmurus*, e estabelecer uma dose para avaliar a cinética do envenenamento, os animais receberam intraperitonealmente 125, 250 ou 375 µg/kg da peçonha em 200 µL de PBS estéril. Um grupo em que os animais receberam igual volume de tampão salina-fosfato (PBS) estéril foi utilizado como controle. Após 6 horas, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p), para a coleta do sangue, a fim de obter o soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos.

Escolhida a melhor dose capaz de alterar significativamente os parâmetros bioquímicos, sem ocasionar óbitos, o experimento foi repetido utilizando-se a dose fixa escolhida (375 µg/kg), avaliando-se diferentes intervalos de tempo (6 e 24 h), para assim determinar a cinética de tempo do envenenamento. Para isso, foram coletados o sangue para avaliação do perfil bioquímico sérico, além da coleta dos órgãos e pesagem dos mesmos para determinação do peso relativo e dosagem de marcadores inflamatórios.

4.4.2 Avaliação do perfil bioquímico sérico

O sangue dos animais foi coletado pelo plexo retro-orbital. O soro foi obtido através de incubação por 30 min a 37 °C do sangue total com posterior centrifugação por 5 min a 1500 rpm a 4 °C. As dosagens bioquímicas dos animais de experimentação foram realizadas no analisador automático Labmax Plenno (Labtest Diagnóstica®). Foram determinados os níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina, ácido úrico, amilase sérica, creatina quinase (CK) e sua isoenzima MB (CK-MB) utilizando os kits comerciais da Labtest Diagnóstica®.

4.4.3 Determinação do peso relativo dos órgãos

Após anestesia, os animais de experimentação foram, pesados em balança analítica e a retirada dos órgãos através de procedimento cirúrgico foi realizada. Em seguida os órgãos foram lavados 5 vezes com PBS e pesados. O peso relativo foi determinado através da divisão do peso do órgão com o peso do corpo e multiplicado por 100.

4.4.4 Dosagem de citocinas

A determinação da concentração das citocinas TNF- α e IL-10 foi realizada com o soro dos animais de experimentação utilizando kits comerciais da *eBioscience* de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, as placas foram sensibilizadas com 100 μ L do anticorpo de captura respectivo de cada citocina e incubadas overnight a 4 °C. Após o período de incubação, as placas sensibilizadas foram lavadas 3 vezes com a solução de lavagem (PBS 1x, Tween 0,05%), o excesso removido com papel absorvente e em seguida foi adicionado 250 μ L da solução de bloqueio em cada poço e incubada a temperatura ambiente por 1 hora. O processo de lavagem foi repetido e foi adicionado 100 μ L por poço da curva padrão de cada citocina e as amostras analisadas e incubadas a temperatura ambiente por 2 horas.

O processo de lavagem foi repetido e após foi adicionado 100 µL por poço de *Avidin-*HRP** e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos, a lavagem foi repetida e adicionado 100 µL da solução de TMB, incubado por 15 minutos a temperatura ambiente, os poços foram novamente lavados e em seguida foi adicionado 50 µL da solução de parada em cada poço. Por fim, as absorbâncias foram mensuradas em leitora de microplacas (BioTek®) a 450 e 570 nm.

4.5 Avaliação dos efeitos locais induzidos pelo envenenamento com o escorpião *Tityus stigmurus*

4.5.1 Avaliação da atividade indutora de peritonite

4.5.1.1 Indução do envenenamento

A fim de avaliar os efeitos locais do envenenamento induzido pelo escorpião *T. stigmurus* em modelo animal, e estabelecer uma dose para avaliar a cinética do envenenamento, os animais receberam intraperitonealmente 125, 250 e 375 µg/kg de veneno em 200 µL. Outro grupo de animais recebeu igual volume de tampão salina-fosfato (PBS) estéril. Após 6 horas, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p) para a coleta do lavado peritoneal.

Escolhida a melhor dose capaz de alterar significativamente a migração de células para o peritônio, sem ocasionar óbitos, o experimento foi repetido utilizando-se a dose fixa escolhida (375 µg/kg), avaliando-se diferentes intervalos de tempo (6 e 24 h), para assim determinar a cinética de tempo do envenenamento.

4.5.1.2 Avaliação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal

Os exsudados peritoneais foram coletados através da lavagem da cavidade peritoneal com 3 mL de PBS gelado estéril. O lavado obtido foi utilizado para contagem global e diferencial de leucócitos, determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO), dosagem de nitrito e proteínas totais.

4.5.1.3 *Contagem global e diferencial de leucócitos*

O lavado peritoneal foi diluído em solução de Türk (1,5% de ácido acético e 0,01% de violeta de genciana), na proporção 1:10, para a contagem global em câmara de Neubauer.

Para realização da contagem diferencial, uma alíquota do lavado peritoneal foi centrifugado durante 5 min a 1500 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e ao botão de células foi adicionado 500 µL de PBS gelado. As lâminas foram previamente desengorduradas e utilizando citocentrífuga (5 min a 500 rpm) foram obtidos os centrifugados, que foram corados com o panótico rápido da Labtest®. A contagem das células foi realizada em microscópio óptico utilizada a objetiva de imersão de maior aumento (100x). Foram contadas 500 células diferenciando-se os tipos celulares, mono e polimorfonucleares.

4.5.1.4 *Quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO)*

A quantificação da enzima MPO foi realizada como marcador bioquímico indireto da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal conforme descrito na literatura com algumas modificações (BRADLEY et al., 1982). Uma alíquota de 100 µL do lavado peritoneal coletado dos animais foi misturado com 100 µL tampão HTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio) 0,5 % em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0 e agitados em vórtex por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 5 min a 4° C e o sobrenadante misturado com 200 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0 contendo 0,0005 % de peróxido de hidrogênio e 0,167 mg/mL de *o*-dianisidina. A mensuração da atividade foi realizada a 460 nm, em leitura cinética de 1 em 1 min, até 5 min, em leitora de microplacas (BioTek®). Uma unidade de MPO foi definida como o equivalente ao consumo de 1 µmol de peróxido de hidrogênio por minuto, sendo que 1 µmol de peróxido de hidrogênio fornece uma mudança de absorvância de $1,13 \times 10^{-2}$ (DO/min) (POSADAS et al., 2004). Os resultados encontrados foram expressos em U/mL de lavado.

4.5.1.5 *Dosagem de nitrito*

Uma alíquota do lavado peritoneal foi centrifugado a 1500 rpm por 5 min a 4 °C. A concentração de nitrito foi determinada a partir do sobrenadante obtido dessa centrifugação, através da reação de Griess, utilizando uma solução de nitrito de sódio como padrão. Em uma microplaca foram pipetados 50 µL das amostras em triplicata, adicionado 50 µL de sulfanilamida e incubado por 5 min a temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, também ao abrigo de luz, foi adicionado 50 µL solução de NEED (dihidrocloridrato de N-1-naftiletlenodiamina 0,1%) e a absorbância foi mensurada a 540 nm em leitora de microplaca (BioTek®). A concentração de nitrito foi expressa em µM (ALBANO et al., 2013).

4.5.1.6 *Dosagem de proteínas*

O Método de Bradford (microensaio) foi usado para a quantificação de proteínas a partir do sobrenadante do mesmo lavado do item descrito anterior (4.5.2.3). Albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão e a absorbância foi mensurada em leitora de microplaca (BioTek®) a 595 nm (BRADFORD et al., 1976).

4.5.1.7 *Dosagem de citocinas*

A determinação da concentração de citocinas (TNF- α e IL-10) foi realizada com o sobrenadante do mesmo lavado do item descrito anterior (4.5.2.3) utilizando kits comerciais da *eBioscience* de acordo com as recomendações do fabricante já descrito no item 4.4.4.

4.5.2 Avaliação da atividade edematogênica

A atividade edematogênica da peçonha do escorpião *T. stigmurus* foi avaliada utilizando o modelo *in vivo* de edema da pata como descrito na literatura com algumas modificações (NASCIMENTO et al., 2005). Grupos de cinco animais foram tratados com PBS ou diferentes doses do veneno (2,5; 5,0 e 7,5 µg/pata) por via intraplantar na pata posterior direita. A espessura das patas posteriores direita dos animais de experimentação foram medidas antes da injeção do veneno (valor basal) e nos tempos 15, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos após a injeção com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess, São Paulo, SP, Brasil). O edema foi expresso como a porcentagem da diferença entre a espessura da pata antes (valores basais) e após a injeção da peçonha e PBS.

4.6 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão médio. Para significância estatística, a análise de variância (Anova) de uma ou duas vias, ou teste t, dependendo do caso, foram utilizados, realizados no programa GraphPad Prism ®. $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da dose letal mediana (DL₅₀)

A determinação da DL₅₀ da peçonha de *T. stigmurus* revelou que a dose 7,5 µg/20 g de animal (0,375 mg/Kg) não apresentou letalidade e a partir da dose 20 µg/20 g de animal (1 mg/Kg) observou-se 100% de letalidade dos animais testados. A DL₅₀ (limite de confiança de 95%) calculadas pela análise de Probit para a peçonha do *T. stigmurus* foi 10 µg/20 g de animal (0,5 mg/Kg). A DL₅₀ desta espécie foi anteriormente determinada por Nishikawa et al. (1994), correspondendo a 17 µg/22 g de animal (0,773 mg/Kg) via i.p.

5.2 Avaliação dos efeitos sistêmicos induzidos pelo envenenamento com o escorpião *Tityus stigmurus*

5.2.1 Avaliação do perfil bioquímico sérico

O envenenamento com *T. stigmurus* foi avaliado *in vivo* através de injeção do veneno por via intraperitoneal. Os camundongos dos grupos inoculados com o veneno apresentaram piloereção, comportamento nociceptivo (demonstração de incômodo após o toque e busca constante por uma posição mais cômoda), salivação, dispnéia, hiperatividade seguida de hipoatividade e defecação excessiva. Nenhum animal veio a óbito ou sofreu sangramento durante os experimentos. Após seis horas da aplicação do PBS e das doses de veneno (125, 250 e 375 µg/kg), os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado para a obtenção do soro e a realização de dosagens bioquímicas a fim de determinar uma dose para ser estudada a cinética do envenenamento.

Os parâmetros bioquímicos foram analisados (Tabela 1). Ácido úrico, creatinina, CK, CK-MB, AST e ALT foram as variáveis analisadas que apresentaram diferença significativa quando comparadas com o grupo PBS e entre as diferentes doses de TstV testadas.

Tabela 1: Dados bioquímicos após 6 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c. Foi injetado via i.p. PBS e as doses 125, 250 e 375 µg/kg TstV. Após 6 horas foi realizada a coleta do sangue e processamento para obtenção do soro. N=5, ***p ≤ 0,05 quando comparado com o grupo PBS, ### quando o grupo que recebeu 375 µg/kg TstV é comparado com o grupo que recebeu 125 µg/kg TstV e +++ comparado com o grupo 250 µg/kg TstV. Os resultados foram expressos em média +/- erro padrão Os valores sem marcação apresentaram p > 0,05. Análise estatística pelo teste de Tukey.

Variável	Controle		TstV	
	PBS	125µg/kg	250µg/kg	375µg/kg
AST (U/L)	163,7 ± 23,6	272,4 ± 51,6 [#]	272,4 ± 51,68 ⁺	442,4 ± 148,6 ^{***}
ALT (U/L)	54,2 ± 13,2	72,3 ± 11,9 ^{##}	61,2 ± 12,2 ⁺⁺	129 ± 35,2 ^{**}
CK (U/L)	651 ± 141	1459,6 ± 116,3 ^{*#}	1791,8 ± 388,6 ^{**}	2193,7 ± 352,7 ^{***}
CK-MB (U/L)	292,8 ± 41,9	368,8 ± 12,5 [#]	450,6 ± 57,4	573,1 ± 15,5 [*]
Amilase (U/L)	77,6 ± 52,4	388,6 ± 89,6	542,5 ± 69,5	835,5 ± 380,5
Ácido úrico (mg/dL)	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,2 [#]	1,4 ± 0,24 ⁺	2,3 ± 0,22 ^{**}
Creatinina (mg/dL)	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02 ^{##}	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,02 ^{**}
Glicose (mg/dL)	104 ± 22,5	119,2 ± 20,9	141 ± 6,8	117,6 ± 13,6
Triglicérides (mg/dL)	58,3 ± 10,2	102,2 ± 23,4	90,6 ± 19,9	80,5 ± 2,5
Colesterol total (mg/dL)	95,3 ± 13,7	115,8 ± 7,3	112,2 ± 11,4	97,5 ± 4,5

FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

Os resultados obtidos foram determinantes para escolha da dose para o estudo da cinética do envenenamento causado pela peçonha do *T. stigmurus* em animais de experimentação. Os parâmetros bioquímicos que apresentaram diferença significativa foram usados para a escolha da dose a ser utilizada no estudo de cinética. Portanto, a dose 375 µg/kg TstV foi selecionada para ser avaliada nos tempos de 6 e 24 h (Tabela 2).

Tabela 2: Dados bioquímicos após 6 e 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c. Foi injetado via i.p. PBS e a dose de 375 µg/Kg TstV. Após 6 e 24 horas foi realizado a coleta do sangue e processamento para obtenção do soro. N=5, ***p ≤ 0,05 quando comparado com o grupo PBS. Os resultados foram expressos em média +/- erro padrão. Os valores sem marcação não apresentaram p > 0,05. Análise estatística pelo teste de Tukey.

Tempo	6 horas		24 horas	
	PBS	375 µg/kg TstV	PBS	375 µg/kg TstV
AST (U/L)	160 ± 28	279,6 ± 68,8*	201,6 ± 44,5	228,1 ± 46,8
ALT (U/L)	60,3 ± 9,1	106,5 ± 13,6**	40,2 ± 7,0	51,8 ± 4,5
CK (U/L)	876,8 ± 208,9	1179,8 ± 108,7**	1333,6 ± 342,2	1340,6 ± 322
CK-MB (U/L)	288,2 ± 74,7	393,5 ± 62,9*	433,4 ± 97,5	472,9 ± 86,3
Amilase (U/L)	364 ± 20	674 ± 74,4***	415,1 ± 82,2	434 ± 21
Ácido úrico (mg/dL)	0,704 ± 0,08	0,636 ± 0,1	1,268 ± 0,1	1,15 ± 0,1
Creatinina (mg/dL)	0,2 ± 0,003	0,3 ± 0,0192*	0,29 ± 0,05	0,29 ± 0,026
Glicose (mg/dL)	126,3 ± 3,7	114,5 ± 3,75*	121,83 ± 14,8	124,66 ± 15,22
Triglicerídeos (mg/dL)	93,6 ± 19,7	78,2 ± 9,7	146,6 ± 33	130,8 ± 19,1
Colesterol total (mg/dL)	86,6 ± 4,4	90,75 ± 5,6	110,5 ± 20,5	103,5 ± 6,3

FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

O metabolismo oxidativo da glicose fornece grande parte da energia utilizada pelo organismo, que é regulada por muitos hormônios (insulina, somatostatina e glucagon liberados pelas células pancreáticas; epinefrina e cortisol liberados pela adrenal; hormônio do crescimento e o adrenocorticotrófico liberados pela hipófise e a tiroxina liberada pela tireóide) que participam na manutenção adequada dos níveis sanguíneos da glicose em condições estáveis ou em estresse. Assim a quantificação da glicose sanguínea é frequentemente realizada para monitorar o sucesso desses mecanismos reguladores. Um desvio pronunciado, seja para níveis muito elevados ou

muito baixos, é indicativo de homeostasia ineficiente (BURTIS; ASHWOOD; TIETZ, 2001). Os resultados revelaram que os níveis de glicose após 6 h apresentaram-se diminuídos quando comparados com o grupo tratado com PBS, diferentemente da hiperglicemia observada depois do envenenamento por *T. serrulatus*, que pode ser causada por uma liberação maciça de catecolaminas pela adrenal, observada em seres humanos (CUPO et al., 1994) e animais experimentais (CORRÊA et al., 1997; VASCONCELOS et al., 2004). Além disso, a liberação de catecolaminas e substâncias vasoativas induz edema cerebral e pulmonar que são importantes causas de morte em envenenamento causado por escorpião (AMARAL et al., 1993; TEIXEIRA et al., 1997; VASCONCELOS et al., 2005; ANDRADE et al., 2007), resultados não observados para o TstV em 6 e 24 h.

Os dados revelaram que AST mostrou-se alterada apenas em 6 h (com significância estatística) e não em 24 h, quando comparados com os valores basais do grupo PBS (Tabela 2), assim como o ALT. AST e ALT são duas aminotransferases (ou transaminases) que catalisam a transferência reversível de um grupo amina entre um aminoácido e um α -cetoácido. Ambas são mais frequentemente determinadas e estão amplamente distribuídas no organismo, mas são particularmente abundantes no fígado, devido ter um papel fundamental na síntese proteica e no redirecionamento dos aminoácidos para outras vias. Porém, essas enzimas não são encontradas apenas no fígado, pois rins, coração e músculo esquelético apresentam quantidades moderadas de ALT, enquanto miocárdio, músculo esquelético e eritrócitos apresentam quantidades moderadas de AST. Essas enzimas são excelentes indicadores do dano hepático, quando ambas encontram-se elevadas. A lesão hepática aguda, pode resultar em aumento da AST e ALT (BURTIS; ASHWOOD; TIETZ, 2001; WALLACH, 2009). Ribeiro (2008), estudando o envenenamento por *T. serrulatus* em cães adultos observou aumento significativo da AST até 6h após inoculação do veneno, mesmo período em que houve aumento da enzima ALT, também presente em hepatócitos. Portanto, ao se correlacionar a análise de ambas é possível associá-las a lesão hepática reversível, já que em 24 h as enzimas retornaram aos níveis basais.

A creatinina é derivada da creatina, que é sintetizada no fígado e é a principal fonte de alta energia para o metabolismo muscular. A creatina, perde uma molécula de água e forma a creatinina, que é excretada pelos rins. Assim, a creatinina sérica

pode ser usada para diagnosticar comprometimento da função renal (WALLACH, 2009). A creatinina quando comparada com os valores basais do grupo PBS mostrou-se aumentada apenas em 6 h, indicando uma possível disfunção renal transitória. A alta quantidade de AST presente no soro dos animais envenenados pode revelar a origem e intensidade da lesão em algum tecido ou órgão exceto o fígado, como os rins, (CORRÊA et al., 1997; PESSINI et al., 2001), visto que os níveis de creatinina também estão aumentados. Esta hipótese pode ser fortalecida com a análise histopatológica dos órgãos dos animais de experimentação que receberam veneno de *T. stigmurus*, visto que a análise do peso relativo dos órgãos não apresentou diferença significativa quando comparados com o grupo PBS em 6 (Gráfico 1) e 24 h (Gráfico 2). Alterações histopatológicas graves no fígado e nos rins dos animais que receberam o veneno de *Androctonus australis hector* foram observadas e caracterizadas por edema associado com hemorragia, necrose, e infiltração de células inflamatórias, mudanças essas concomitante com uma elevação acentuada na atividade metabólica enzimática de AST, ureia e ácido úrico (LAMRAOUI; ADI-BESSALEM; LARABADJEBARI, 2015).

Assim como os valores de AST, ALT e creatinina, CK e CK-MB apresentaram-se aumentados quando comparado com os valores basais do grupo que apenas recebeu PBS em 6h com significância estatística. A CK é uma enzima que catalisa a interconversão do trifosfato de adenosina e do fosfato de creatina, controlando o fluxo de energia dentro das células, principalmente no músculo. CK é uma molécula dimérica que consiste de um par de dois monômeros diferentes denominados M e B, originando três isoenzimas: CK1 (BB), CK2 (MB), CK3 (MM), assim cérebro e músculo liso (BB), músculo cardíaco (MB e MM) e músculo esquelético (MM e cerca de 1% de MB), são as principais fontes teciduais de CK. A CK é liberada na circulação frente a qualquer isquemia, lesão ou inflamação muscular e o aparecimento de CK-MB no soro sugere liberação pelo miocárdio, particularmente nos contextos clínicos da dor torácica e alterações no eletrocardiograma (BURTIS; ASHWOOD; TIETZ, 2001; WALLACH, 2009).

Correa et al. (1997) encontraram valores elevados de CK em ratos após receberem veneno de *T. serrulatus* e a Tityustoxina-I isolada. Cordeiro et al. (2006) obtiveram dosagens séricas de CK-MB aumentadas em cães 6 h após o envenenamento por *T. serrulatus* e também encontraram elevação de CK-MB em

duas das cinco crianças admitidas no centro de terapia intensiva do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, vítimas de acidente escorpiônico, sendo que uma delas apresentou também aumento significativo de CK e alterações eletrocardiográficas compatíveis com infarto agudo do miocárdio (AMARAL et al., 1991).

Os resultados observados são sugestivos de lesão no miocárdio pelo TstV. Estudos mostram que as alterações cardíacas resultam da intensa liberação de catecolaminas por ação do veneno de *T. serrulatus* em canais iônicos neuronais e glândula adrenal (FREIRE-MAIA; FERREIRA, 1961; HENRIQUES et al., 1968) e que acarretam lesões por induzirem aumento do consumo de oxigênio pelos miócitos. Com isso, podem ocorrer hipóxia e degenerações focais. Além disso, Fatani et al. (1998) investigaram a participação de cininas no envenenamento de coelhos por *Leiurus quinquestriatus* e encontraram alta correlação entre a sua concentração plasmática e alterações cardiovasculares. Porém, a confirmação de lesão cardíaca se dará com a análise histopatológica dos corações dos animais que receberam TstV.

Os níveis de amilase no soro dos animais tratados com TstV também se apresentaram aumentados significativamente em 6 h quando comparado aos valores basais dos animais que receberam PBS. A amilase é uma enzima digestiva que normalmente atua no espaço extracelular clivando amido em monossacarídeos, sendo as glândulas salivares e o pâncreas as principais fontes orgânicas de amilase. Assim, a inflamação do pâncreas induz a liberação de amilase e de outras enzimas secretadas por ele e a pesar do aumento da amilase sérica ser quase sempre de origem pancreática, existem outras fontes clinicamente significativas, como a inflamação das glândulas salivares e a incapacidade de pacientes com danos renais eliminarem a amilase liberada na circulação (BROBST, 1997; KRAMER; HOFFMANN, 1997; WALLACH, 2009).

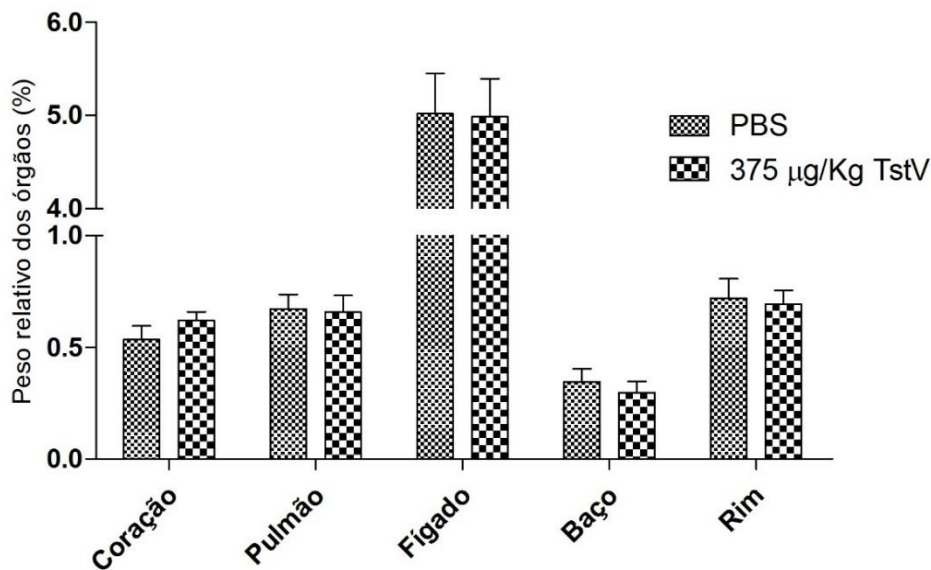
Nos acidentes escorpiônicos humanos existem relatos de pancreatite (SANKARAN et al., 1983; BUCARETCHI et al., 1995; FLETCHER; FLETCHER; FAINTER, 1996; CUPO et al., 2003; MELO et al., 2004). Novaes et al. (1982) demonstraram significativo aumento na secreção de amilase e alteração na composição do suco pancreático em ratos anestesiados após injeção da peçonha de *T. serrulatus*. O mesmo autor relatou, em 2002, alterações histopatológicas compatíveis com o diagnóstico de pancreatite. A confirmação da lesão pancreática

será dada com o resultado da análise histopatológica dos órgãos dos animais de experimentação.

5.2.2 Determinação do peso relativo dos órgãos

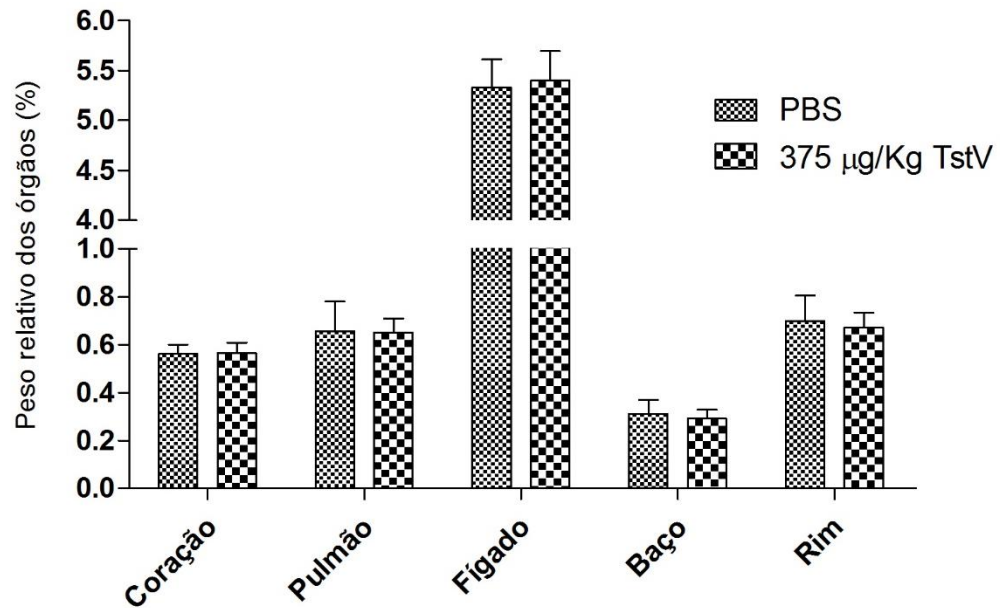
Além da avaliação de parâmetros bioquímicos, foi realizada a coleta de órgãos e estes mesmos órgãos foram pesados antes de serem separados para a análise histopatológica e calculado o peso relativo para cada um dos animais tratados com PBS e TstV. Porém, não foram observadas diferenças significativas do peso relativo dos órgãos entre os grupos analisados nos tempos 6 (Gráfico 1) e 24 h (Gráfico 2).

Gráfico 1: Peso relativo dos órgãos após 6 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c. Foi injetado via i.p. PBS e 375 µg/kg TstV.



Após 6 horas foi realizada a coleta e pesagem dos órgãos. N=5. As barras sem marcação apresentaram $p > 0,05$ quando comparados com o grupo PBS pelo teste de Tukey.
 FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

Gráfico 2: Peso relativo dos órgãos após 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c. Foi injetado via i.p. PBS e 375 µg/kg TstV.



Após 24 horas foi realizada a coleta e pesagem dos órgãos. N=5. As barras sem marcação apresentaram $p > 0,05$ quando comparados com o grupo PBS pelo teste de Tukey.

FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

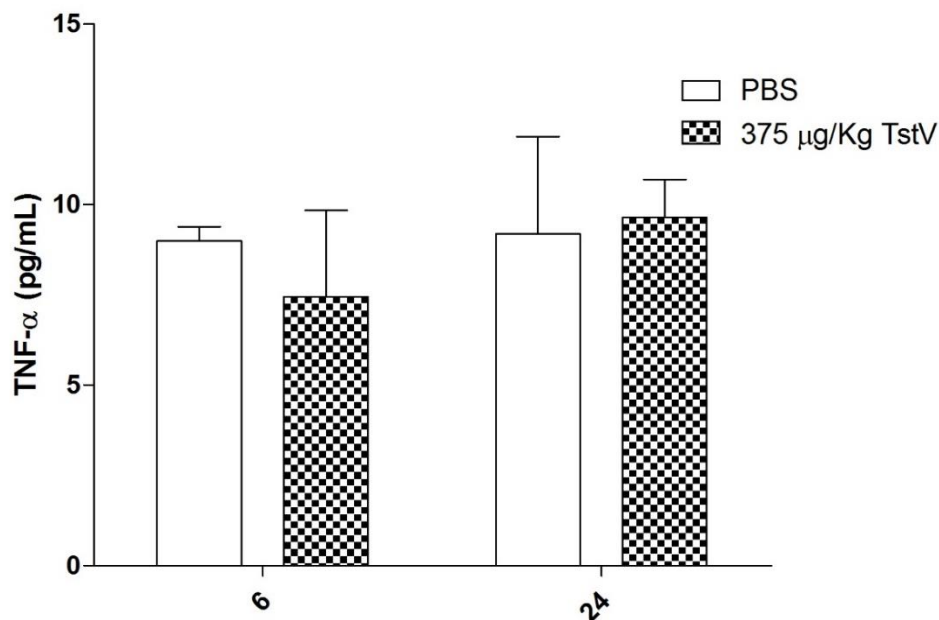
A análise dos órgãos foi realizada na tentativa de detectar alterações no peso relativo dos mesmos, visto que o edema é uma característica marcante do escorpionismo, e o mais estudado é aquele que ocorre nos pulmões por ser um achado importante nas vítimas fatais. A gênese do edema pulmonar ainda é motivo de controvérsia, podendo ser considerada cardiogênica ou inflamatória. Os trabalhos desenvolvidos por alguns poucos grupos brasileiros avaliando a origem inflamatória do edema pulmonar foram realizados com o veneno do *T. serrulatus* (DE MATOS et al., 2001; FREIRE-MAIA; PINTO; FRANCO, 1993; FREIRE-MAIA; CAMPOS; AMARAL, 1994; DE MATOS et al., 1997; AMARAL et al., 1994).

5.2.3 Dosagem de citocinas

A análise das citocinas no soro dos animais que receberam PBS e TstV também foi realizada e observou-se que a peçonha de *T. stigmurus* não foi capaz de induzir um aumento de TNF- α nos tempos 6 e 24 h (gráfico 3). TNF- α é uma das citocinas liberadas durante a resposta inflamatória aguda tanto em pacientes

envenenados por *T. serrulatus* (FUKUHARA et al., 2003), quanto em ratos que receberam na cavidade peritoneal peçonha de *T. serrulatus* em 4 h (PESSINI et al., 2003), diferentemente do que foi observado no nosso estudo a concentração de TNF- α não apresentou-se aumentada em 6 e 24 h. Porém, resultado semelhante ao nosso foi observado num estudo realizado por Fialho et al. (2011), que injetou 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da peçonha de *T. serrulatus* por via subcutânea em camundongos BALB/c e observou aumento da concentração de TNF- α no soro apenas em 30 min e com 6 h a concentração de TNF- α era cerca de 20 pg/mL .

Gráfico 3: Concentração sérica de TNF- α após 6 e 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c. Foi injetado via i.p. PBS e 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TstV.

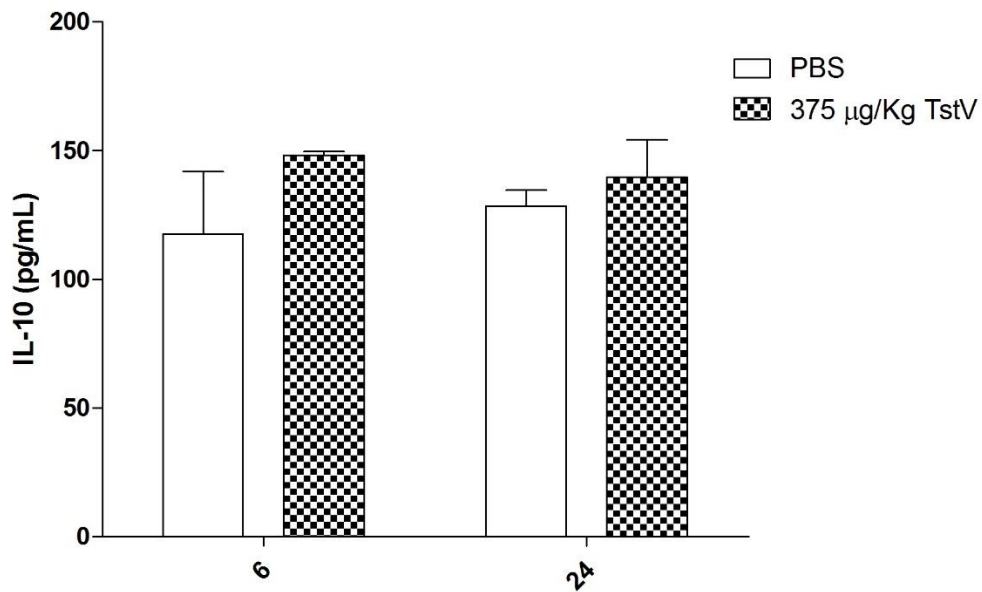


Após 6 e 24 horas foi realizada a coleta do sangue para obtenção do soro e realização da dosagem de TNF- α . N=4. As barras sem marcação apresentaram $p > 0,05$ quando comparados com o grupo PBS pelo teste de Tukey (ANOVA).

Para as análises de IL-10, pode-se observar a indução de um aumento na concentração sérica da mesma em 6 h, mesmo não sendo significativo (gráfico 4). A liberação de IL-10 já foi observada no plasma de pacientes envenenados (casos moderados e graves) (FUKUHARA et al., 2003; MAGALHÃES et al., 1999) como em modelos de envenenamento moderado a grave em animais de experimentação (PETRICEVICH; PEÑA, 2002) que apresentou concentração de IL-10 semelhante ao

que foi observado no nosso estudo em 6 h. Outros escorpiões como o *Centruroides noxius* e o *Androctonus australis Hector*, também pertencentes a família Buthidae, induziram o aumento da liberação de IL-10 (PETRICEVICH, 2010; ADI-BESSALEM et al., 2008), que é um mediador liberado como parte do mecanismo regulatório que limita os danos quando a resposta imune é estabelecida (MOORE et al., 2001).

Gráfico 4: Concentração sérica de IL-10 após 6 e 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c. Foi injetado via i.p. PBS e 375 µg/kg TstV.



Após 6 e 24 horas foi realizada a coleta do sangue para obtenção do soro e realização da dosagem de IL-10. N=4. As barras sem marcação apresentaram $p > 0,05$ quando comparados com o grupo PBS pelo teste de Tukey.

FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

Após a picada, surgem os sinais e sintomas do envenenamento, que são variados e vão desde dores locais a alterações sistêmicas graves. De forma geral, o quadro clínico depende da gravidade do acidente. No local da picada, os sinais e sintomas mais comumente observados para os casos de envenenamento com o *T. stigmurus* são dor, dormência, parestesia, edema, e os principais sintomas sistêmicos são vômitos, sudorese, cefaléia e sonolência (GUARNIERI et al., 1996; LIRA-DASILVA et al., 2000).

Em geral, os casos de envenenamento por *T. stigmurus* são leves. Dados do Centro de Assistência Toxicológica de Pernambuco mostraram que entre 2006 e 2010

as vítimas que sofreram picadas por *T. stigmurus* foram crianças e independente do tempo decorrido para um prognóstico, a maioria dos casos apresentaram sintomas leves, porém há relato de casos moderados que resultaram na morte por choque cardiogênico e/ou edema pulmonar ou sintomas neurológicos graves (ALBUQUERQUE et al., 2013). Já nos acidentes ocorridos no estado do Rio Grande do Norte no período de 2007 a 2011 96,48% foram classificados clinicamente como grau leve; as manifestações locais foram observadas em 93,96% dos indivíduos e a taxa de letalidade foi de 0,058%. (BARBOSA, 2014).

Diferenças na composição do veneno entre animais da mesma espécie são comuns. Fatores ambientais relacionados a predação, como abundância de alimento ou alterações climáticas podem ser responsáveis por variações na constituição do veneno desses animais (ALBUQUERQUE et al., 2013; GUARNIERI et al., 1996). Além disso, a quantidade de veneno injetado no local da picada, a idade e a suscetibilidade de cada indivíduo ao veneno são fatores que podem explicar os diferentes sinais e sintomas que determinam os graus de gravidade e os achados clínicos observados nos casos de envenenamento (BRASIL, 2001; CUPO et al., 2003; LIRA-DA-SILVA et al., 2000; OLIVEIRA, 2009).

5.3 Avaliação dos efeitos locais induzidos pelo envenenamento com o escorpião *Tityus stigmurus*

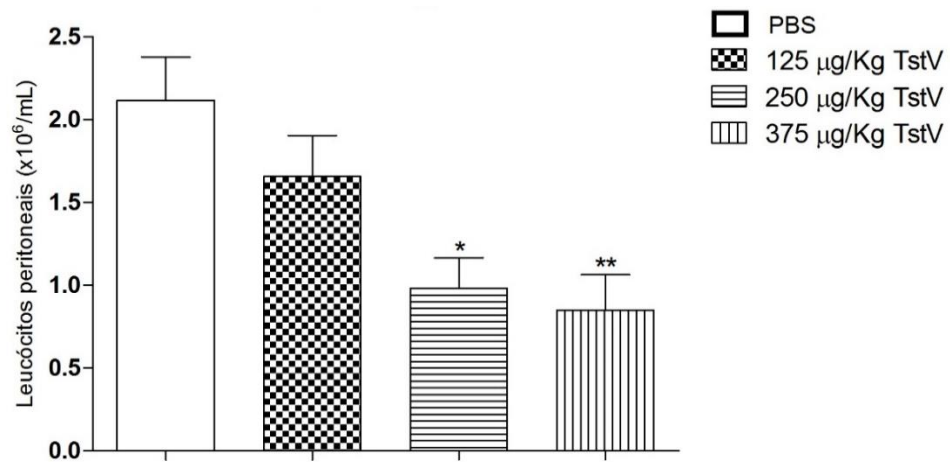
5.3.1 Avaliação da atividade indutora de peritonite

O envenenamento com *T. stigmurus* foi avaliado a nível local *in vivo* através do modelo de peritonite. Os camundongos dos grupos inoculados com a peçonha apresentaram os mesmos sinais e sintomas observados já citados anteriormente (5.2). Nenhum animal veio a óbito ou sofreu sangramento durante os experimentos. Após seis horas da aplicação do PBS e das doses da peçonha (125, 250 e 375 µg/kg), os lavados peritoneais foram coletados para contagem global de leucócitos, extração e quantificação da atividade de MPO, dosagem de nitrito e proteínas totais a fim de determinar uma dose para ser estudada a cinética do envenenamento.

Não foi observado um aumento significativo na migração celular para a cavidade peritoneal na contagem global de leucócitos (Gráfico 5) e sim uma

diminuição das células presentes no peritônio dos animais que receberam as doses de 250 e 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de veneno de *T. stigmurus* (TstV). Comportamento semelhante foi observado na dosagem da atividade de MPO, uma enzima derivada de neutrófilos que estima a presença dos mesmos em amostras biológicas (BRADLEY et al., 1982). O grupo tratado com PBS, apresentou maior atividade da enzima MPO que os grupos tratados com as doses de 125, 250 e 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TstV com significância estatística (Gráfico 6).

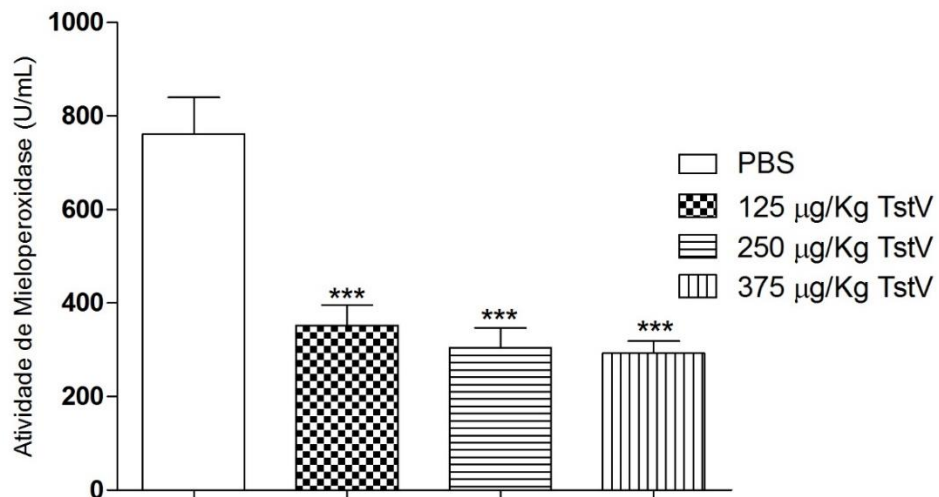
Gráfico 5: Leucócitos da cavidade peritoneal após 6 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.



PBS e as doses 125, 250 e 375 $\mu\text{g/kg}$ TstV foram injetados via i.p. Após 6 horas foi realizada a coleta do lavado peritoneal e o número de células foi determinado em câmara de Neubauer. $N=5$, $***p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo PBS. As barras sem marcação apresentaram $p > 0,05$. Análise estatística pelo teste de Tukey.

FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

Gráfico 6: Atividade de Mieloperoxidase do lavado peritoneal após 6 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.



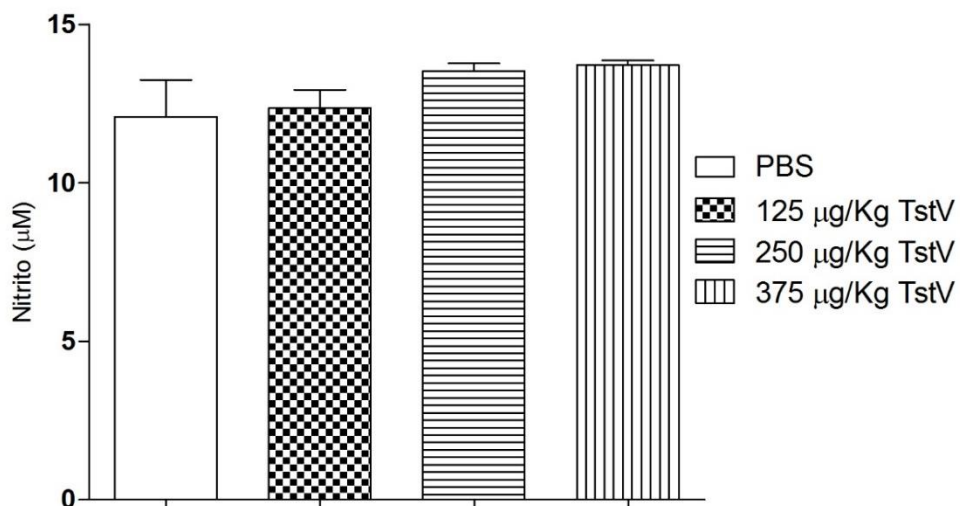
PBS e as doses 125, 250 e 375 $\mu\text{g/kg}$ TstV foram injetados via i.p. Após 6 horas foi realizada a coleta do lavado peritoneal e a extração da enzima e sua quantificação foi realizada. $N=5$, $***p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo PBS. Análise estatística pelo teste de Tukey.

FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

A dosagem de nitrito também foi realizada no mesmo material biológico. Em meio aquoso, o nitrito é estável por várias horas e ele é um dos produtos da degradação do óxido nítrico (NO) (STAMLER; SINGELS; LOSCALZO, 1992), que é conhecido por estar envolvido em múltiplas reações de importância biológica, tal como ser um mediador endógeno no controle de tónus vascular devido à sua potente atividade vasodilatadora (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991) e também tem sido implicado na gênese de uma variedade de condições patológicas tais como inflamação, aterosclerose, hipertensão vascular e lesões nas quais ocorre a infiltração de células inflamatórias (BÜSSE; MÜLSCH, 1990; LIBBY; HANSSON, 1991; PETRICEVICH; PEÑA, 2002). Porém, os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos que receberam PBS e os tratados com a peçonha de *T. stigmurus* (Gráfico 7).

Ainda do sobrenadante do lavado peritoneal foi realizada a determinação da concentração de proteínas totais pelo método Bradford e não foram detectadas concentrações proteicas nas amostras analisadas.

Gráfico 7: Concentração de Nitrito do sobrenadante do lavado peritoneal após 6 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.

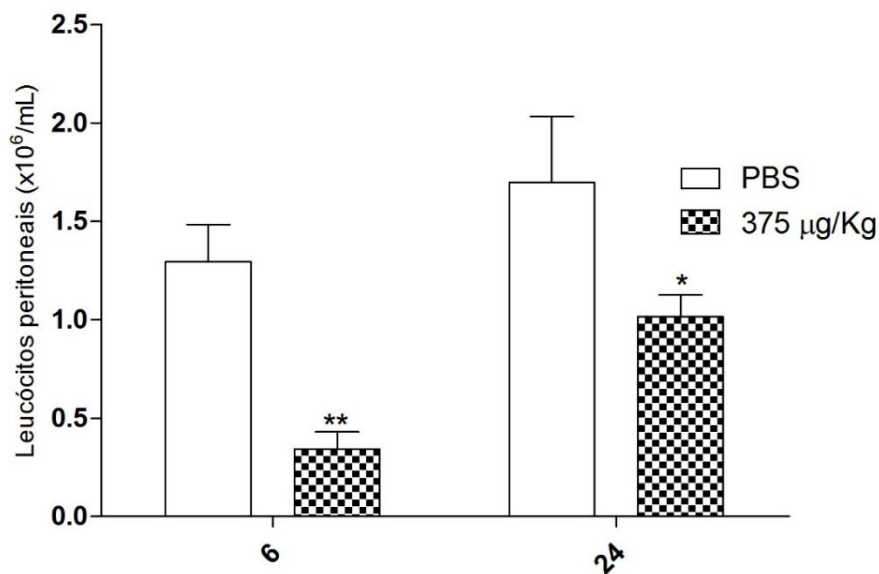


PBS e as doses 125, 250 e 375 µg/kg TstV foram injetados via i.p. Após 6 horas foi realizada a coleta do lavado peritoneal e determinada a concentração de nitrito pelo método de Griess. N=5, ***p ≤ 0,05 quando comparado com o grupo PBS. As barras sem marcação apresentaram p > 0,05. Análise estatística pelo teste de Tukey.

FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

Resultados do estudo cinético, utilizando a dose de 375 µg/kg TstV, do envenenamento nos tempos 6 e 24 h foram semelhantes ao experimento anterior quando avaliada a presença de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais de experimentação. O grupo que recebeu a dose de 375 µg/kg de TstV, apresentou menor número de leucócitos quando comparado ao grupo que recebeu apenas PBS (Gráfico 8).

Gráfico 8: Leucócitos da cavidade peritoneal após 6 e 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.

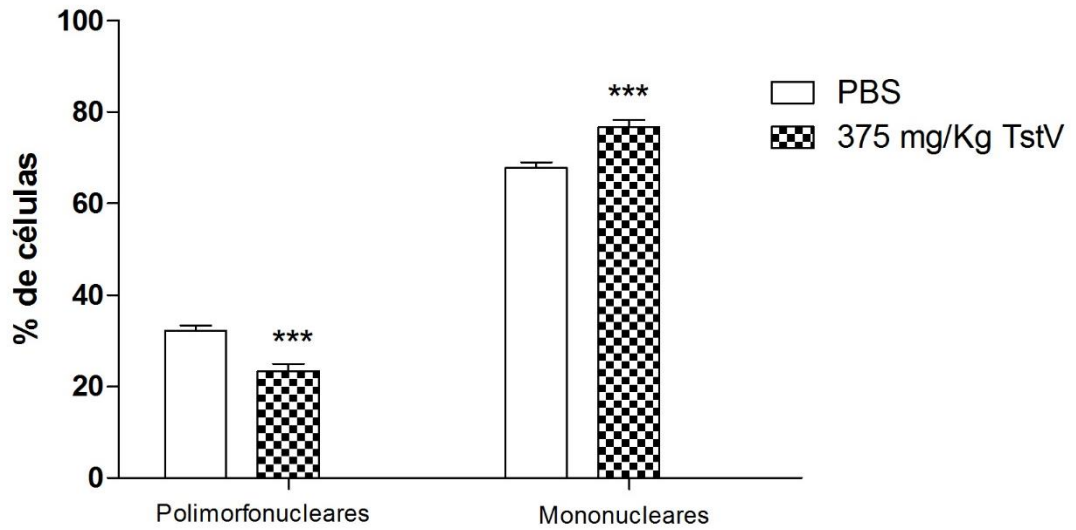


PBS e 375 µg/kg TstV foram injetados via i.p. Após 6 e 24 horas foi realizada a coleta do lavado peritoneal e o número de células foi determinado em câmara de Neubauer. N=5, ***p ≤ 0,05 quando comparado com o grupo PBS. Análise estatística pelo teste de Tukey.

FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

Na contagem diferencial em 6 h, observou-se uma redução do número de polimorfonucleares quando comparado ao PBS com diferença significativa e um aumento na população de mononucleares (gráfico 9). Já em 24 h, não foi observado um perfil com diferença significativa entre as populações celulares (gráfico 10), corroborando com o observado até o momento.

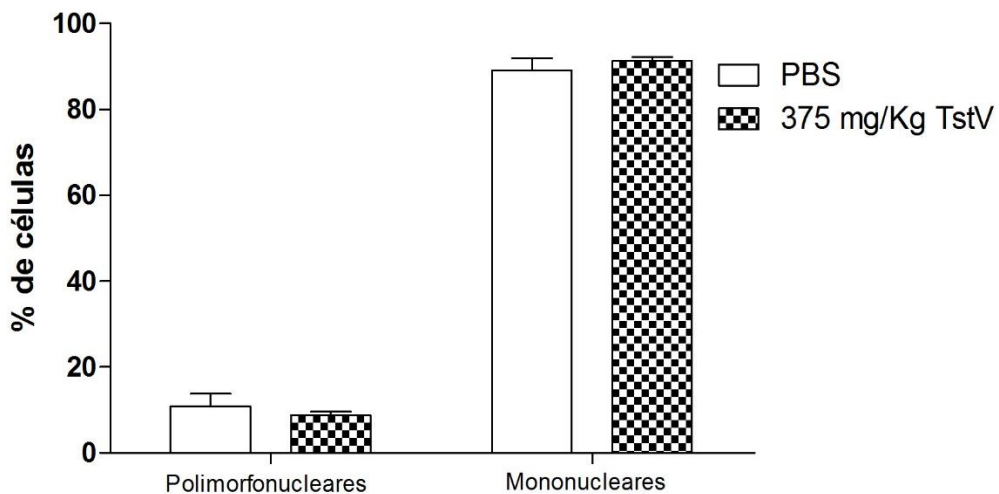
Gráfico 9: Contagem diferencial dos leucócitos da cavidade peritoneal após 6 h a administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c expressos em valores relativos.



PBS e 375 µg/kg TstV foram injetados via i.p. Após 6 horas foi realizada a coleta do lavado peritoneal e foi determinado o valor relativo de poli e mononucleares. N=5, *** $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo PBS. Análise estatística pelo teste de Tukey.

FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

Gráfico 10: Contagem diferencial dos leucócitos da cavidade peritoneal após 24 h a administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c expressos em valores relativos.

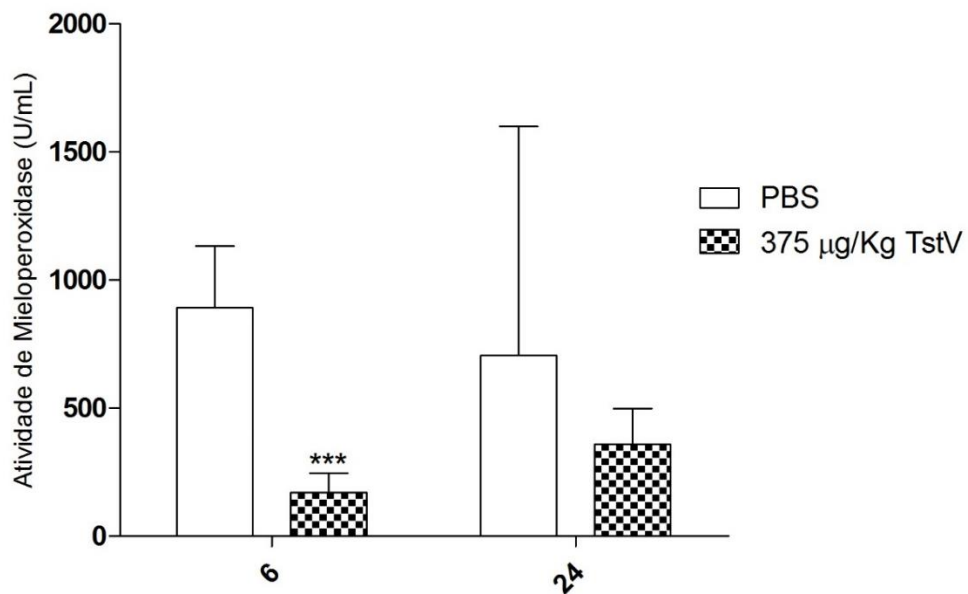


PBS e 375 µg/kg TstV foram injetados via i.p. Após 24 horas foi realizada a coleta do lavado peritoneal e foi determinado o valor relativo de poli e mononucleares. N=5, *** $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo PBS. As barras sem marcação apresentaram $p > 0,05$. Análise estatística pelo teste de Tukey.

FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

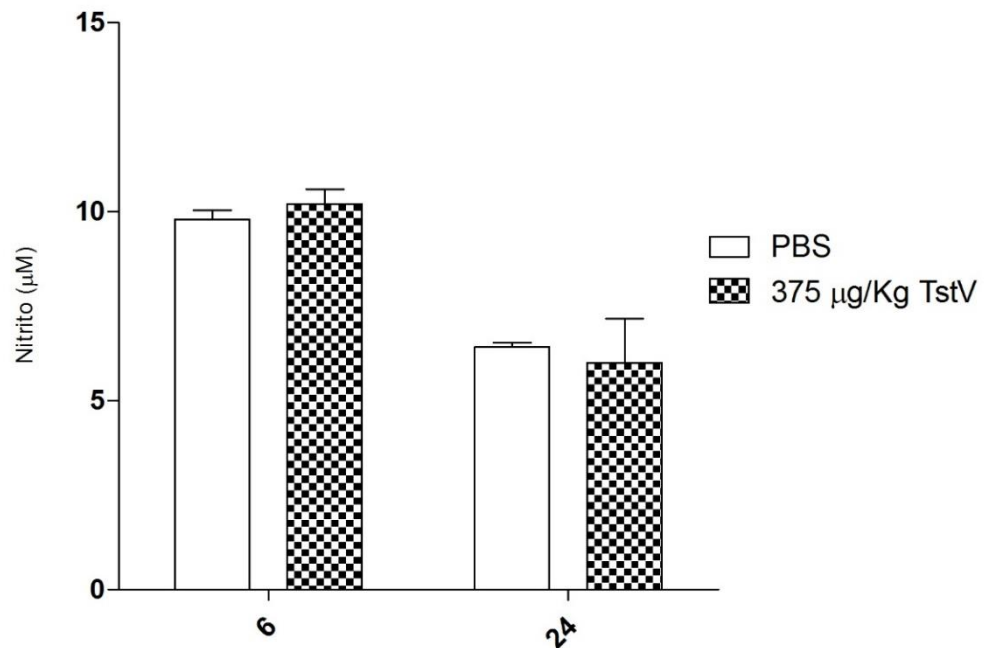
Quando avaliada a atividade da MPO, o grupo que recebeu 375 µg/kg de TstV apresentou atividade significativa menor quando comparado ao grupo PBS em 6h, porém sem diferença significativa entre os grupos quando analisado em 24 h (Gráfico 11). Já a concentração de nitrito no sobrenadante do lavado peritoneal não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados quando avaliados em 6 e 24 h (Gráfico 12). Proteínas totais também não foram detectadas no sobrenadante do lavado coletado nos tempos avaliados, como observado anteriormente, assim como não foram detectadas concentrações de citocinas (TNF-α e IL-10) no lavado peritoneal dos animais de experimentação tanto para o grupo PBS quanto para o grupo tratado com TstV nos tempos 6 e 24 h.

Gráfico 11: Atividade de Mieloperoxidase do lavado peritoneal após 6 e 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.



PBS e 375 µg/kg TstV foram injetados via i.p. Após 6 e 24 horas foi realizada a coleta do lavado peritoneal, a extração da enzima e sua quantificação. N=5, ***p ≤ 0,05 quando comparado com o grupo PBS. As barras sem marcação apresentaram p > 0,05. Análise estatística pelo teste de Tukey. FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

Gráfico 12: Concentração de Nitrito do sobrenadante do lavado peritoneal após 6 e 24 h da administração de PBS e TstV em camundongos BALB/c.



PBS e 375 µg/kg TstV foram injetados via i.p. Após 6 e 24 horas foi realizada a coleta do lavado peritoneal e determinada a concentração de nitrito pelo método de Griess. N=5. As barras sem marcação apresentaram $p > 0,05$ quando comparados com o grupo PBS pelo teste de Tukey.

FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

Dessa forma, verificou-se que a injeção intraperitoneal de veneno não foi capaz de induzir a migração de células inflamatórias para a cavidade peritoneal nas doses 125, 250 e 375 µg/kg TstV em 6 h e na dose 375 µg/kg TstV em 6 e 24 h quando comparadas com o grupo PBS. Pelo contrário, observou-se evidências de uma possível atividade anti-inflamatória, uma vez que houve diminuição do número de células recrutadas para o peritônio e uma diminuição da migração de neutrófilos para o local. De fato, estudos-pilotos estão sendo realizados no nosso laboratório, em que se observou que a peçonha, administrada pela via subcutânea, foi capaz de diminuir em 44% a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal em resposta ao zimosan (dados não publicados).

Mesmo as peçonhas de escorpiões serem consideradas como agentes pró-inflamatórios (ADI-BESSALEM et al., 2008; PESSINI et al., 2008), Haong et al. (2014) reportaram a ação analgésica e anti-inflamatória do veneno de *Heterometrus laoticus* e suas frações em modelo animal, e nas frações testadas foram identificadas duas toxinas bloqueadoras de canal de potássio. Dessa forma, a capacidade do veneno

não induzir a migração celular para o peritônio pode ser explicada pela presença de alguma toxina com ação anti-inflamatória como detectado no trabalho citado anteriormente, porém são necessários testes para confirmação desta hipótese. Estudos com a peçonha de *T. fasciolatus* também apresentaram resultados semelhantes aos nossos dados sem diferença significativa entre o grupo que recebeu peçonha e água purificada quanto ao número de leucócitos totais no sangue (PINTO, 2009). O *T. fasciolatus*, assim como o *T. stigmurus* é um escorpião de importância médica, porém associados aos casos de envenenamento de menor gravidade quando comparado com os acidentes que ocorrem com *T. serrulatus* (BRASIL, 2009).

Outro estudo realizado com uma serpente, a *Crotalus durissus terrificus*, também mostrou atividade anti-inflamatória da peçonha quando injetada por via subcutânea, inibindo a migração de polimorfonucleares para a cavidade peritoneal de animais induzida por carragenina injetada por via i.p. (NUNES et al., 2007). Além disso, foram publicados resultados que comprovaram que a peçonha de *T. serrulatus* quando injetada por via subcutânea em camundongos com sepse induzida por ligadura cecal, foi capaz de diminuir a letalidade, reduzir o número de polimorfonucleares na cavidade peritoneal e reduzir a inflamação pulmonar (MACIEL, et al., 2014). Porém, outros trabalhos realizados com a peçonha de *T. serrulatus* mostram que ela é capaz de induzir uma resposta inflamatória ocasionando a liberação de mediadores inflamatórios tanto em pacientes (ABDEL-HALEEM, 2006; D'SUZE et al., 2003; FUKUHARA et al., 2003), quanto em modelos animais (DE MATOS et al., 1997; PESSINI et al., 2003; PETRICEVICH; PEÑA, 2002).

Apesar da peçonha do escorpião *T. stigmurus* apresentar perfil eletroforético semelhante a peçonha de *T. serrulatus*, e o soro produzido contra a peçonha deste escorpião ser capaz de reconhecer regiões antigênicas no TstV (NISHIKAWA et al., 1994; BECERRIL et al., 1996), além de apresentar neurotoxinas que interagem com canais iônicos de sódio e potássio com alta similaridade com toxinas do *T. serrulatus* e essas toxinas desempenharem um papel na resposta imunológica com citado anteriormente, as peçonhas apresentam diferenças entre si, uma delas é a maior expressão de toxinas de canal de potássio na peçonha do *T. stigmurus*, (ALMEIDA et al., 2012) enquanto que há uma maior expressão das toxinas bloqueadoras de canal de sódio no *T. serrulatus* (ALVARENGA et al., 2012).

Os mecanismos pelos quais as toxinas que compõem as peçonhas de escorpiões são capazes de ativar o sistema imunológico e induzir uma reação inflamatória ainda não estão claros, embora alguns grupos sugiram hipóteses, como por exemplo a despolarização das células nervosas periféricas pela peçonha, com a liberação de neuropeptídeos como a substância P, que se ligam aos receptores de taquicininas (NK1) presente na superfície de células inflamatórias como macrófagos e mastócitos, levando-os a produção e liberação de mediadores inflamatórios. Outros trabalhos relatam que as neurotoxinas exerçam ação direta nos canais iônicos presentes na superfície das células do sistema imune, e tais canais possam ter um papel importante na ativação de linfócitos e macrófagos, participando da liberação de citocinas, da proliferação, eliminação de células alvo, da adesão celular, quimiotaxia e da ativação de fatores de transcrição inflamatórios (FIALHO et al., 2011; DE MATOS et al., 2001; MATOS, TEIXEIRA; FREIRE-MAIA, 1999; PERES et al., 2009).

Estudos mostram que os valores de nitrito estão aumentados em 2 e 6 h após o envenenamento com uma DL₅₀ do veneno do escorpião *T. serrulatus*, além de apresentar um aumento significativo de citocinas no soro (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e interferon gama) (PETRICEVICH; PEÑA, 2002;). O nitrito é um marcador de óxido nítrico (NO) expirado. O NO é produzido a partir da ação de três isoformas conhecidas da enzima óxido nítrico sintetase (NOS 1 e 3 - constitutivas e NOS 2 - induzível) e expressas constitucionalmente em várias células, como fibras nervosas (NOS 1a), células endoteliais (NOS 1b e NOS 3) e neutrófilos (NOS 1c), que produzem o NO em níveis basais para controle de tônus vascular sistêmico e pulmonar, assim como na transmissão do impulso em neurônios centrais e periféricos. Já a forma induzível da enzima (NOS 2) produz quantidades muitas vezes maiores de NO que as formas constitutivas e sua expressão já foi identificada em macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, hepatócitos, células endoteliais, mastócitos, histiócitos e fibroblastos. A expressão da NOS 2 é estimulada por interferon gama, lipopolissacarídeo bacteriano, TNF α , IL-1 e outras interleucinas, e inibida por IL-10, glicocorticoides e aminoguanidina (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

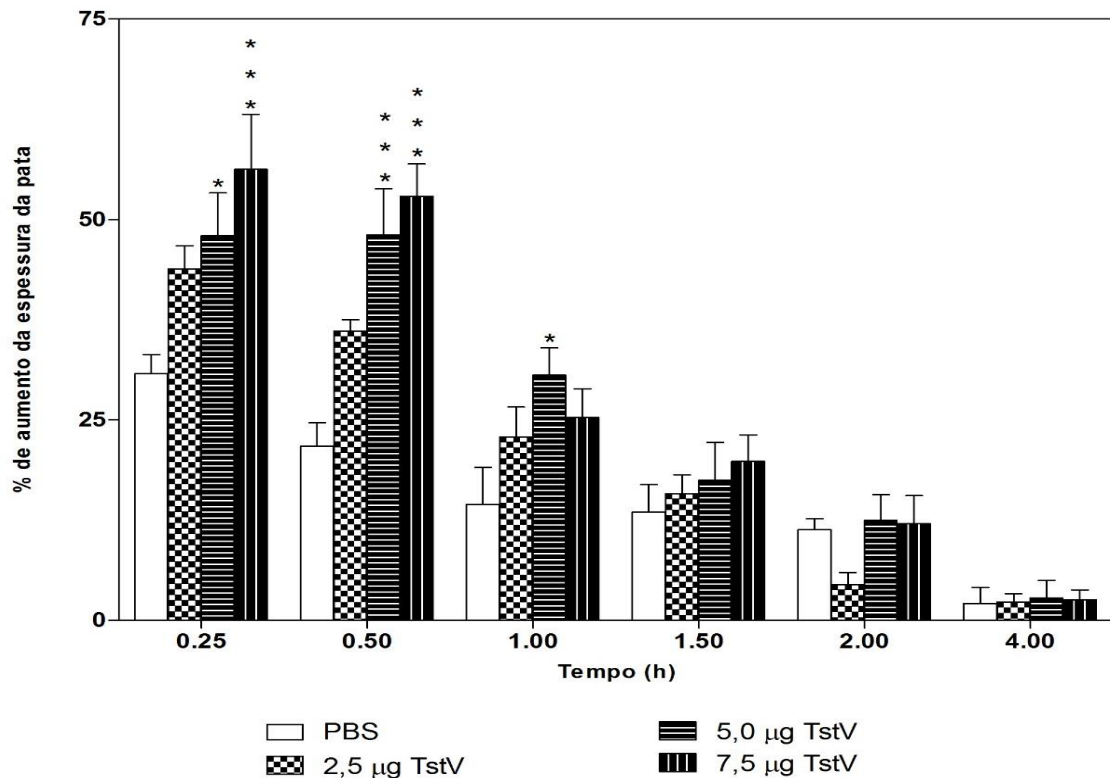
Envenenamento grave induzido pela injeção de peçonha foi associado com a elevação nos níveis séricos de várias citocinas e de NO (ADI-BESSALEM et al., 2012; PETRICEVICH, 2000; PETRICEVICH; PEÑA, 2002; PETRICEVICH; LEBRUN, 2005; RAOURAOUA-BOUKARI et al., 2012). Porém os resultados não mostram diferença

significativa entre os grupos tratados com PBS e TstV, assim a concentração de nitrito detectada pode estar relacionada a produção de valores basais de NO para a manutenção de alguns processos do organismo como já citado anteriormente (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

Os variados sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes envenenados por animais peçonhentos relacionam-se tanto com as diferentes características dos animais produtores de peçonha quanto dos pacientes. Com relação aos animais, as características podem estar relacionadas ao gênero, localização geográfica, hábitos alimentares e variação individual podendo influenciar na toxicidade do veneno. Já as características relacionadas aos pacientes incluem idade, sexo, fatores genéticos, condições fisiológicas e imunológicas. Porém pouco se sabe sobre a influência desses aspectos nas manifestações clínicas e na severidade dos envenenamentos (PADILLA et al., 2003).

*5.3.2 Indução do envenenamento com o escorpião *T. stigmurus* através do modelo de edema de pata*

Vítimas de envenenamento escorpiônico frequentemente apresentam edema no local da picada (HOREN, 1972; WILSON, 1987). Os dados mostraram que a injeção intraplantar da peçonha de *T. stigmurus* induziu a formação de edema significativo nas doses de 5,0 e 7,5 µg nos tempos 15, 30 minutos e 1 hora. A dose mais baixa (2,5 µg) induziu a formação do edema, porém não foi significativo. O pico máximo de formação do edema ocorreu em 15 minutos após a injeção da peçonha (Gráfico 13), indicando que esta resposta se desenvolve rapidamente. Uma vez que o edema atingiu o nível máximo, decresce com o tempo e em 4 horas já não existe mais.

Gráfico 13: Ação edematogênica da peçonha do escorpião *T. stigmurus*

A peçonha de *T. stigmurus* (TstV) (2,5 a 7,5 µg/pata) e PBS foram injetados na pata posterior direita dos animais e o edema formado foi mensurado nos tempos 0.25; 0.5; 1; 1.30; 2 e 4 h. O edema foi expressado como a diferença entre a espessura da pata após (no respectivo tempo) e antes (valores basais) da injeção da peçonha e do PBS, calculada como se segue: $[(\text{tempo de espessura} - \text{espessura antes da injeção}) \div \text{espessura antes da injeção}] \times 100$. N = 5. *p < 0.05 e ***p < 0.001 quando comparado com o grupo controle PBS pelo teste de Tukey.

FONTE: Resultados experimentais (autoria própria).

Os resultados observados corroboram com outros estudos realizados utilizando a peçonha de outros escorpiões. Nascimento et al. (2005) caracterizaram a resposta nociceptiva e edema induzido pela peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* em modelo animal e investigou farmacologicamente de forma preliminar os mecanismos envolvidos nessas respostas. A injeção intraplantar de peçonha de *T. serrulatus* (10 µg) induziu um edema acentuado que atingiu um pico em 30 min e durou cerca de 1 h, que foi inibida pela prometazina, indicando que a histamina atua nos receptores H1 pode ser importante para a formação do edema. Há duas prováveis fontes deste autacóide: liberação endógena a partir de mastócitos ou conteúdo intrínseco da peçonha. Ciproheptadina também inibiu o edema, indicando o possível envolvimento de 5-HT. Esta suposição seria apoiada pelo fato de que estas aminas podem ser encontradas nas peçonhas de escorpião, como o *L. laevifrons* e *T. serrulatus* (BASU

et al., 1990). Além disso, tais aminas podem ser liberadas por mastócitos estimulados (HOLZER, 1998). Dessa forma, a ação edematogênica observada no presente estudo pode estar relacionada com a presença dessas aminas bioagênicas na peçonha do *T. stigmurus*. Além disso, algumas aminas encontradas nas peçonhas de escorpiões, como cadaverina e serotonina, podem aumentar a atividade da histamina (BJELDANES et al., 1978; LAVICH et al., 2003), indicando que as interações entre estas aminas podem resultar num sinergismo.

Estudos realizados com a peçonha do escorpião *Buthus martensi* exibiram também a indução da formação de edema. Porém, o edema foi parcialmente suprimido pelo Composto 48/80 que atua na degranulação crônica de mastócitos. Também foi observada a redução significativa do edema em 8 horas quando os animais receberam pirilamina que é antagonista dos receptores H1 e cimetidina um antagonista dos receptores H2, indicando que a histamina é importante, visto que já é sabido que ela atua nos pequenos vasos levando ao aumento da permeabilidade vascular, com a exteriorização das proteínas e líquidos plasmáticos para os espaços extracelulares, causando o edema (HOLZER, 1998; LIU et al., 2007).

Além do envolvimento da histamina, serotonina e da degranulação dos mastócitos na formação do edema, tem sido mostrado que a peçonha do escorpião *Buthus martensi* pode ser marcadamente reduzida por resiniferatoxina (RTX), sugerindo que há um possível componente neurogênico, principalmente fibras aferentes primárias sensíveis a capsaicina, contribuindo para a resposta inflamatória induzida pela peçonha desse escorpião (BAI et al., 2008). Estudos semelhantes foram realizados com a peçonha de *Tityus serrulatus* e uma de suas toxinas, a tityustoxin (TsTX) quando mantidos em contato com a extremidade periférica do nervo ciático e safeno de rato, induziram respostas inflamatórias nas áreas inervadas (LEME et al., 1978).

Outra hipótese para explicar os mecanismos envolvidos na ação edematogênica da peçonha de escorpiões foi realizada por Pessini et al. (2008). Os resultados mostraram que cininas e o óxido nítrico são substancialmente envolvidos no edema de pata, hipernocicepção mecânica e *flinches*.

Apesar da confirmação da presença de ação edematogênica do veneno do *T. stigmurus* em modelo de edema de pata, os resultados apresentados até aqui são

preliminares. A realização da extração e quantificação da atividade de MPO, dosagem de nitrito, proteínas e de citocinas (IL- β , TNF- α , IL-6 e IL-10), assim como a análise histopatológica serão essenciais para caracterizar o edema induzido pela peçonha do escorpião *T. stigmurus*.

Ao todo, os presentes resultados e os relatados por outros investigadores indicam que as peçonhas de diferentes espécies de importância médica, apesar de induzir respostas semelhantes, possam atuar através de mecanismos distintos, justificando, assim, a investigação das respostas induzidas por cada uma delas. Isto conduziria a uma melhor compreensão da resposta do homem contra potentes toxinas animais e também subsidiar informações em uma abordagem farmacológica mais racional para aliviar os sinais e sintomas associados ao escorpionismo.

O estudo proposto é pioneiro para a espécie de escorpião abordada, visto que a peçonha do *T. stigmurus* é pouco estudada, assim como o papel das toxinas que compõem esse veneno. Desta forma, o trabalho proporcionou entender melhor a fisiopatologia do envenenamento, bem como possibilitar a utilização da peçonha, ou componentes deste, para outros fins através da caracterização parcial do envenenamento induzido por *T. stigmurus* em animais de experimentação.



CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- A primeira demonstração da resposta edematogênica induzida pela peçonha de *T. stigmurus* em animais de experimentação.
- Quanto ao potencial inflamatório da peçonha, os resultados parciais revelaram que a mesma não foi capaz de induzir a migração de células para o peritônio dos animais de experimentação, bem como não foi observado alteração dos níveis de nitrito no lavado peritoneal, assim como proteínas totais, TNF- α e IL-10 e diminuição da atividade de MPO nos tempos 6 e 24 h.
- Alterações bioquímicas importantes foram observadas como o aumento nos níveis de CK, CK-MB, AST, ALT, creatinina, amilase e ácido úrico, indicativo de lesões em órgão como coração, fígado, rins e pâncreas apenas em 6 h. Além disso, não foram observados aumento nos níveis séricos de TNF- α e IL-10 em 6 e 24 h.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HALEEM, A. H.; MEKI, A. R.; NAOMAN, H. A.; MOHAMED, Z. T. Serum levels of IL-6 and its soluble receptor, TNF- α and chemokine RANTES in scorpion envenomed children: Their relation to scorpion envenomation outcome. *Toxicon*, v. 47, p. 437-444, 2006.
- ADI-BESSALEM, S.; MENDIL, A.; HAMMOUDI-TRIKI, D.; LARABA-DJEBARI, F. Lung immunoreactivity and airway inflammation: their assessment after scorpion envenomation. **Inflammation**, vol. 35, p. 501-8, 2012.
- ADI-BESSALEMA, S.; HAMMOUDI-TRIKIA, D.; LARABA-DJEBARI, F. Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. **Experimental and Toxicologic Pathology**, vol., 60, p. 373–380, 2008.
- ALBUQUERQUE, C.M.R.; NETO, P. L. S.; AMORIM, M. L. P.; PIRES, E. C. V. Pediatric epidemiological aspects of scorpionism and report on fatal cases from *Tityus stigmurus* stings (Scorpiones: Buthidae) in State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 46, p. 484-489, 2013.
- ALBANO, M. N. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 612-617, 2013.
- ALMEIDA, D. D.; TORRES, T. M.; SCORTECCI, K. C.; KOBASHI, L. S.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S. R. B. M.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; JUNQUEIRA-de-AZEVEDO, I. L. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. **BMC Genomics**, v. 13, p. 1471-2164, 2012.
- ALMEIDA, D. D.; TORRES, T. M.; BARBOSA, E. G.; LIMA, J. P. M. S.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Molecular approaches for structural characterization of a new potassium channel blocker from *Tityus stigmurus* venom: cDNA cloning, homology modeling, dynamic simulations and docking. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 430, p. 113–118, 2013.
- ALVARENGA, E. R.; MENDES, T. M.; MAGALHÃES, B. F.; SIQUEIRA, F. F.; DANTAS, A. E.; BARROCA, T. M.; HORTA, C. C. KALAPOTHAKIS, E. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **Open Journal of Genetics**, 2012.
- AMARAL, C.F.S.A.; LOPES, J.A.; MAGALHAES, R.A.; et al. Eletrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial damage after *Tityus serrulatus* scorpion poisoning. **The American Journal of Cardiology**, v.67, p.655-657, 1991.

- AMARAL, C.F.S., BARBOSA, A.J.A., LEITE, V.H.R., TAFURI, W.L., REZENDE, N.A. Scorpion sting-induced pulmonary oedema: evidence of increased alveolo-capillary membrane permeability. **Toxicon**, vol. 32, p. 999–1003, 1994.
- AMARAL, C.F.S., RESENDE, N.A., FREIRE-MAIA, L. Acute pulmonar oedema after Tityus serrulatus scorpion sting in children. **Am. J. Cardiol.** v. 71, p. 242–245, 1993.
- ANDRADE, M.V., LISBOA, F.A., PORTUGAL, A.L., ARANTES, R.M.E., CUNHA-MELO, J.R. Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines. *Comp. Biochem. Physiol.* **A Mol. Integr. Physiol.** V. 146, p. 581–587, 2007.
- BAI, C. Z, TONG LIU B, XUE-YAN PANG A, FENG JIANG A, MING CHENG A, YONG-HUA JI. Functional depletion of capsaicin-sensitive primary afferent fibers attenuates rat pain-related behaviors and paw edema induced by the venom of scorpion *Buthus martensi* Karch. **Neuroscience Research**, vol. 62, p. 78–85, 2008.
- BALAZET, L. Scorpionism in the old world. In: W. Bücherl e E. E. Buckley (Ed.). *Venomous Animals and Their Venoms. Scorpionism in the old world.* New York: **Academic Press**, v. 3, p. 349-371, 1971.
- BARBOSA I. R. Scorpionism aspects in the Rio Grande do Norte state. **Rev.Saúde.Com**, vol. 10, p. 43-53, 2013.
- BATISTA, C.V.F. ; ROMÁN-GONZÁLEZ, S.A. ; SALAS-CASTILLO, S.P. ; ZAMUDIO, F.Z. ; GÓMEZ-LAGUNAS, F. ; POSSANI, L.D. Proteomic analysis the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. **Comparative Biochemistry and Physiology**. vol., 146, p.147-157, 2007.
- BASU, A., GOMES, A., GOMES, A., DASGUPTA, S.C., LAHIRI, S.C. Histamine, 5-HT & hyaluronidase in the venom of the scorpion *Lychas Laevifrons* (Pock). **Indian J. Med. Res.** vol. 92, p. 371–373, 1990.
- BECERRIL, B.; CORONA, M.; MEJIA, M. C.; MARTIN, B. M.; LUCAS, S.; BOLIVAR, F.; POSSANI, L. D. Toxic peptides and genes encoding toxin c of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. **Biochem. J**, v. 313, p. 753-760, 1996.
- BOSMANS, F., TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. **Toxicon**, v. 49, p. 142-158, 2007.
- BJELDANES, L.F., SCHUTZ, D.E., MORRIS, M.M. On the aetiology of scombroid poisoning: cadaverine potentiation of histamine toxicity in guinea-pig. **Food Cosmet. Toxicol.** vol.,16, p. 157–159, 1978.
- BORGES, A.; BERMINGHAM, E.; HERRERA, N.; ALFONZO, M. J.; SANJUR, O. I. Molecular systematic of the neotropical scorpion genus *Tityus* (Buthidae): The historical biogeography and venom antigenic diversity of toxic Venezuelan species. **Toxicon**, v. 55, p. 436-454, 2010.

- BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, vol. 72, p. 248–254, 1976.
- BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 78, p. 206-209, 1982.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Controle de Escorpiões. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Escorpionismo. In: Comed/Asplan/Fns (Ed.). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. Escorpionismo, p. 39-47.
- BRASIL, Ministério da Saúde alerta sobre animais peçonhentos. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2013/11/ministerio-da-saude-alerta-sobre-animais-peconhentos-1> />. Acesso em: 30 de nov. 2015.
- BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do envenenamento pela picada do escorpião e seu tratamento. **Revista Médica de São Paulo**, v. 10, p. 385-390, 1907.
- BRAVO-BECHERELLE, M. A. e MAZZOTTI, L. Geographic distribution of mortality from scorpion stings in Mexico. **Rev Inst Salubr Enferm Trop**, v. 21, Dec, p. 129-40, 1961.
- BROBST, D.F. Pancreatic Function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5ed. San Diego:Academic Press, p.353-366, 1997.
- BÜSSE R, MÜLSCH A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett**, vol. 275, p. 87–90, 1990.
- BUCARETCHI, F.; BARACAT, C.E.; NOGUEIRA, R.J.N. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.37, n.4, p.331-336, 1995.
- BÜCHERL, W. Brazilian scorpions and spiders. I. Biology and of scorpions and effects of their venoms. II. The poisonous and aggressive spiders of the genus *Phoneutria perty*. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 1, p. 181-190, 1968.
- BÜCHERL, W. Escorpionismo no Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 34, p. 9-24, 1969.
- BÜCHERL, W. Classification, biology, and venom extraction of scorpions. In: Bücherl, W. & Buckley, E.E. (Eds.). **Venomous Animals and Their Venoms, Venomous Invertebrates**. Academic Press, Nova York, v. 3, p. 317-347, 1971.

Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 5th Ed., W.B. **Saunders Company**, Philadelphia, PA, 2001.

CANDIDO, D.M. Escorpiões. In: Joly, C.A.; Bicudo, C.E.M. (Eds.). Biodiversidade do estado de São Paulo. FAPESP, São Paulo, p. 25-34. 1999. Disponível em: <http://www.biota.org.br/pdf/v5cap03.pdf>. Acesso em 18/06/2012. Acesso em: 25/09/2012.

CASTELLHEIM, A.; BREKKE, O. L.; ESPEVIK, T.; HARBOE, M.; MOLLNES, T. E. Innate Immune Responses to Danger Signals in Systemic Inflammatory response Syndrome and Sepsis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, p. 479–491, 2009.

CESTÈLE, S. e CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v. 82, p. 883-892, 2000.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cir. Brasileira**. São Paulo, v. 17, n. 6, 2002.

CHEN, Z.Y.; ZHEN, D.Y.; HU, Y.-T.; HE, Y.-W.; PAN, N.; DING, L.-P.; CAO, Z.-J. Structural and Functional Diversity of Acidic Scorpion Potassium Channel Toxins. **PLoS ONE**, v. 7, p. 35154, 2012.

CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. Spider, scorpion, centipedes and mites. Oxford: **Pergamon Press**, p. 278, 1968.

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.

CORONAS, F. V.; DE ROODT, A. R.; PORTUGAL, T. O.; ZAMUDIO, F. Z.; BATISTA, C. V. F.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; POSSANI, L. D. Disulfide bridges and blockage of Shaker B K⁺-channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. **Toxicon**, v. 41, p. 173-179, 2002.

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

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

CRUZ, E. F. S. Biologia dos Escorpiões. In: Barraviera, B. Venenos Animais – Uma Visão Integrada. Rio de Janeiro: **Editora de Publicações Científicas Ltda**, p. 135-150, 1994.

- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Sarvier, **FAPESP**, v. 1, p. 182-197, 2003.
- CUPO, P., JURCA, M., AZEVEDO-MARQUES, M.M., OLIVEIRA, J.S.M., HERING, S.E. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 36, p. 67–76, 1994.
- CUSINATO, D.A.C.; SOUZA, A. M.; VASCONCELOS, F.; GUIMARÃES, L.F.L.; LEITE, F.P.; GREGÓRIO, Z.M.O.; GIGLIO, J.R. ; ARANTES, E.C. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, vol. 56, 2010.
- DEBONT, T.; SWERTS, A.; VAN DER WALT, J. J.; MULLER, G. J.; VERDONCK, F.; DAENENS, P. e TYTGAT, J. Comparison and characterization of the venoms of three *Parabuthus* scorpion species occurring in southern Africa. **Toxicon**, v.36, n.2, Feb, p.341-52, 1998.
- DEHESA-DAVILA, M. e POSSANI, L. D. Scorpionism and serotherapy in Mexico. **Toxicon**, v.32, n.9, Sep, p.1015-8, 1994.
- DE LA VEGA, R. C. R., POSSANI, L. D. Currents views on scorpion toxins specific for K⁺ channels. **Toxicon**, v. 43, p. 865-875, 2005.
- DE MATOS, I. M.; ROCHA, A. O.; LEITE, R.; FREIRE-MAIA, L. Lung oedema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**. v. 118, p.143-8, 1997.
- DE-MATOS, I. M.; TALVANI, A.; ROCHA, O. O.; 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. 863-7, 2001.
- DIEGO-GARCÍA E, ABDEL MOTTALEB Y, SCHWARTZ EF, DE LA VEGA RC, TYTGAT J, POSSANI LD. Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. **Cell Mol Life Sci**. vol., 65(1), p.187–200, 2008.
- D'SUZE, G.; MONCADA, S.; GONZÁLEZ, C.; SEVCIK, C.; AGUILAR, V.; ALAGÓN, A. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. **Toxicon**. v. 41, p. 367-75, 2003.
- EICKSTEDT, V. R. D. Escorpionismo por *Tityus stigmurus* no Nordeste do Brasil (Scorpiones; Buthidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 47/48, p. 133-137, 1983.
- FATANI, A.J.; FURMAN, B.L.; ZEITLIN, I.J. The involvement of plasma kinins in the cardiovascular effects of *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom in anaesthetized rabbits. **Toxicon**, v.36, n.3, p.523-536, 1998.

FET, V. e SOLEGLAND, M. E. Contributions to scorpion systematic. I. On recent changes high level taxonomy. **Euscorpius**, v. 31, p. 1-13, 2005.

FIALHO, E. M.; MACIEL, M. C.; SILVA, A. C.; REIS, A. S.; ASSUNÇÃO, A. K.; FORTES, T. S; SILVA, L. A., GUERRA, R. N; KWASNIEWSKI, F. H.; NASCIMENTO, F. R. Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**. v. 58, p. 480-5, 2011.

FINNEY, D.J. Probits analysis. 3rd ed. **Cambridge University Press**, 1971.

FLETCHER, P.L.; FLETCHER, M.; FAINTER, L.K.; et al. Action of new world scorpion venom and its neurotoxins in secretion. **Toxicon**, v.34, n.11/12, p.1399-1411, 1996.

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

FREIE-MAIA, L. e FERREIRA, M. C. Estudo do mecanismo da hiperglicemia e da hipertensão arterial produzidas pelo veneno de escorpião no cão. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, p. 11-22, 1961.

FREIRE-MAIA, L.; PINTO, G. I. e FRANCO, I. Mechanism of the cardiovascular effects produced by purified scorpion toxin in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 188, n.1 , Jan, p. 207-13, 1993.

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

GWEE, M. C.; CHEAH, L. S.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Involvement of the L-arginine-nitric oxide synthase pathway in the relaxant responses of the rat isolated anococcygeus muscle to a scorpion (*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*) venom. **Toxicon**, v. 33, p. 1141–1150, 1996.

GOLDSTEIN, S. A. N.; BAYLISS, D. A.; KIM, D.; LESAGE, F.; PLANT, L. D. International Union of Pharmacology . LV . Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 3445-3459, 2005.

GUARNIERI, M.C. ; LIMA, P.K. ; PIMENTEL, D.C.C. ; MAIA, K.C. ; ANDRADE, L.R. ; VALENÇA, R.C. ; VASCONCELOS, C.M.L. ; PORTO, M.L. ; OLIVEIRA, A.E. Clinical aspects and treatment of scorpion stings in the region of Recife Brazil. **Toxicon**, vol. 34, p.331-331, 1996.

GUARNIERI, M. C. Ação deletéria e benéfica das peçonhas de serpentes, aranhas, escorpiões e insetos. **XXII Congresso Brasileiro de Zoologia**. Recife, p. 16-21, 1998.

GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; LAZDUNSKI, M.; MCKINNON, D., PARDO, L. A. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacol Ver**, v. 57, p. 473–508, 2005.

GURROLA, G. B.; AREVALO, C.; SREEKUMAR, R.; LOKUTA, A. J.; WALKER, J. W. e VALDIVIA, H. H. Activation of ryanodine receptors by imperatoxin A and a peptide segment of the II-III loop of the dihydropyridine receptor. **J Biol Chem**, v. 274, n.12, Mar 19, p.7879-86, 1991.

HENRIQUES, M. C., GAZZINELLI, G., DINIZ, C. R. AND GOMEZ, M. V. Effect of the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* on adrenal gland catecholamines. **Toxicon**, 5, p. 175-179, 1968.

HERSH, E. M.; BODEY, G. P. Leukocytic. **Mechanisms in Inflammation**. Vol. 21: 105-132, 1970.

HILLE, B. Ions channel of excitable membranes. Sunderland, MA, **Sinauer Associates**, Inc, 2001.

HOANG, A. N.; HOANG D.M. VO, NGUYEN P. VO, KSENIYA S. KUDRYASHOVA, OKSANA V. NEKRASOVA, ALEXEY V. FEOFANOV, MIKHAIL P. KIRPICHNIKOV, TATYANA V. ANDREEVA, MARINA V. SEREBRYAKOVA, VICTOR I. TSETLIN, YURI N. UTKIN. Vietnamese *Heterometrus laoticus* scorpion venom: Evidence for analgesic and anti-inflammatory activity and isolation of new polypeptide toxin acting on Kv1.3 potassium channel, **Toxicon**, vol. 77, p. 40–48, 2014.

HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **Gen. Pharmacol.** vol. 30, p. 5–11, 1998.

HOREN, W.P. Insect and scorpion sting. **J. Am. Med. Assoc.**, vol. 221, p. 894–898, 1972.

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

KOBAYASHI, Y.; TAKASHIMA, H.; TAMAOKI, H.; KYOGOKU, Y.; LAMBERT, P.; KURODA, H.; CHINO, N.; WATANABE, T. X.; KIMURA, T.; SAKAKIBARA, S. e ET AL. The cystine-stabilized alpha-helix: a common structural motif of ion channel blocking neurotoxic peptides. **Biopolymers**, v.31, n. 10, Sep, p.1213-20, 1991.

KOROLKOVA, Y. V.; KOZLOV, S. A.; LIPKIN, A. V.; PLUZHNIKOV, K. A.; HADLEY, J. K.; FILIPPOV, A. K.; BROWN, D. A.; ANGELO, K.; STROBAEK, D.; JESPERSEN, T.; OLESEN, S. P.; JENSEN, B. S. e GRISHIN, E. V. An ERG channel inhibitor from the scorpion *Buthus eupeus*. **J Biol Chem**, v. 276, n. 13, Mar 30, p. 9868-76, 2001.

KRAMER, J.W.; HOFFMANN, W.E. Clinical Enzimology. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5ed. San Diego:Academic Press, p. 303-325, 1997.

KUBO, Y.; ADELMAN, J. P.; CLAPHAM, D. E.; JAN, L. Y.; KARSCHIN, A.; KURACHI, Y.; LAZDUNSKI, M. International Union of Pharmacology . LIV .

Nomenclature and Molecular Relationships of Inwardly Rectifying Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 509-526, 2005.

LAMRAOUI, A.; ADI-BESSALEM, S.; LARABA-DJEBARI, F. Immunopathologic effects of scorpion venom on hepato-renal tissues: Involvement of lipid derived inflammatory mediators. **Exp Mol Pathol**. vol., 99(2), p. 286-96, 2015.

LAVICH, T.R., CORDEIRO, R.S., CALIXTO, J.B., SILVA, P.M., MARTINS, M.A. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-voked thermal hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol**. Vol. 462, p. 185–192, 2003.

LAWRENCE, M.B.; SPRINGER, T.A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. **Cell**, v. 65, p. 859-73, 1991.

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 apamin-binding site. **FEBS Lett.**, vol., 390, p. 81–84, 1996.

LEME, J.G., PIMENTA, A.F., RAULINO-FILHO, M., DINIZ, C.R. Sensory nerves and inflammation: evidence for the release of a neurogenic permeability factor by tityustoxin. **J. Pathol.**, vol. 124, p. 165–176, 1978.

LIBBY P, HANSSON GK. Biology of disease: involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. **Lab Invest.**, vol. 64, p. 5–15, 1991.

LIU, T., BAI, Z.T., PANG, X.Y., CHAI, Z.F., JIANG, F., JI, Y.H. Degranulation of mast cells and histamine release involved in rat pain-related behaviors and edema induced by scorpion *Buthus martensi* Karch venom. **Eur. J. Pharmacol.**, vol. 575, p. 46–56, 2007.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; AMORIM A. M.; BRAZIL T. K. Poisonous sting by *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) in the state of Bahia, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, p. 239–245, 2000.

LORET, E.; HAMMOCK, B. Structure and Neurotoxicity of Venoms. In: P. Brownell & G. Polis (Eds.), **Scorpion biology and research**, New York, v. 5, p. 431, 2001.

LOURENÇO, W. R. *Humicolous microcharmids* scorpions: a new genus and species from Madagascar. **C. R. Biol.** 327(1), 77-83, 2004.

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.; CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L.; CUELLAR, O.; VON EICKSTEDT, V. R.; BARRAVIERA, B.; KNOX, M. B. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. **J. Venom Anim. Toxins**, v. 2, p. 121-134, 1996.

LOURENÇO, W. R. Cuellar, O. Scorpions, scorpionism, life history strategies and parthenogenesis. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 1, p. 50-64, 1995.

LUO, F.; ZENG, X. C.; HAHIN, R.; CAOP, Z. J.; LIU, H.; LI, W. X. Genomic organization of four novel nondisulfide-bridged peptides from scorpion *Mesobuthus martensii* Karsck: gaining insight into evolutionary mechanism. **Peptides**, v. 26, p. 2427-2433, 2005.

MACHADO, R. J. A.; LEÔNIDAS G.M.J.; MONTEIRO, N. K. V.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; PORTARO, F.C.V.; BARBOSA, E. G.; BRAGA, V. A.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Homology modeling, vasorelaxant and bradykinin-potentiating activities of a novel hypotensin found in the scorpion venom from *Tityus stigmurus*. **Toxicon**, vol. 101, p. 11-18, 2015.

MACIEL, M. C. G.; FIALHO, E. M. S.; GUERRA, R. N. M.; BORGES, V. M.; KWASNIEWSKI, F. H.; NASCIMENTO, F. R. F. *Tityus serrulatus* scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. **Toxicon**, vol. 89, p. 1-8, 2014.

MAGALHÃES, O. Contribuição para o conhecimento de picadas de escorpiões no Brasil. Anais da Faculdade Universidade de Minas Gerais, v. 1, p. 69-111, 1929.

MAGALHÃES, O. O escorpionismo. (Monografias do Instituto Oswaldo Cruz. IV. Memória), Rio de Janeiro, 1945.

MAGALHÃES, M. M.; PEREIRA, M. E.; AMARAL, C. F.; REZENDE, N. A.; CAMPOLINA, D.; BUCARETCHI, F.; GAZZINELLI, R. T.; CUNHA-MELO, J. R. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**. v. 37, p.1155-64, 1999.

MATOS, I. M.; TEIXEIRA, M. M.; FREIRE-MAIA, L. L. R. Pharmacological evidence that neuropeptides mediate part of the actions of scorpion venom on the guinea pig ileum. **Eur J Pharmacol**. vol., 368(2-3), p. 231-6, 1999.

MATTHIENSEN, F. A. Aspectos Morfológicos e Biológicos dos Escorpiões. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. p. 115, 1966.

MATTHIENSEN, F. A. The breeding of *Tytilus serrulatus* (Lutz & Mello, 1922) in captivity (Scorpiones, Buthidae). **Rev. Bras. Pesq. Méd. e Biológicas**, v. 4, p. 299-300, 1971.

MAURANO, H. R. Do escorpionismo. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1915.

MAYADAS, T.N.; JOHNSON, R.C.; RAYBURN, H.; HYNES, R.O.; WAGNER, D.D. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. **Cell**, v. 74, p. 541-554, 1993.

MELO, E. T.; ESTRELA, A. B.; SANTOS, E. C. G.; MACHADO, P. R. N. L.; FARIAS, K. J. S.; TORRES, T. M.; CARVALHO, E. D.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; BARBOSA, E. G.; LIMA, J. P. M. S.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*: Stigmurin. **Toxicon**, vol., 6, p. 3–10, 2015.

MELO, M. M.; SILVA JÚNIOR, P. G. P.; VERCOSA JÚNIOR, D. Escorpionismo. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 90-97, 2004.

MELLO-LEITÃO, C. Revisão do Gênero *Tityus*. **Physiology**, v. 17, p. 57-76, 1939.

MILLER, C. An overview of the potassium channel family. **Genome Biology**, v. 1, p. 1-5, 2000.

MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Res**, vol. 43, p. 109–142, 1991.

MOORE, K. W; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, vol, 19, p. 683-765, 2001.

MOUHAT, S.; ANDREOTTI, N.; JOUIROU, B.; SEBATIER, J. M. Animal toxins acting in voltage-gated potassium channels. **Current of Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 2503-2518, 2004.

NASCIMENTO JUNIOR, E.B.; COSTA, K.A.; BERTOLLO, C.M.; et al. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v.45, n.7, p.585-593, 2005.

NIRTHANAN S, PIL J, ABDEL-MOTTALEB Y, SUGAHARA Y, GOPALAKRISHNAKONE P, JOSEPH JS, SATO K, TYTGAT J. Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to κ -KTx1.3, a non-toxic homologue of κ -hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. **Biochemical Pharmacology**. vol., 69, p. 669–678, 2005.

NISHIKAWA A. K.; CARICATI, C. P.; LIMA, M. L.; DOS SANTOS M. C.; KIPNIS, T. L.; EICKSTEDT, V. R.; KNYSAK, I.; DA SILVA, M. H.; HIGASHI, H. G.; DA SILVA, W. D. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. **Toxicon**, vol 32, p. 989-998, 1994.

NOVAES, G.; CATANZARO, O. L.; BERALDO, W. T.; FREIRE-MAIA, L. Effect of purified scorpion toxin (tityustoxin) on the pancreatic secretion of the rat. **Toxicon**, v.20, n.5, p.847-853, 1982.

NOVAES, G.; QUEIROZ, A.C.; QUEIROZ, A.P.; et al. Estudo histopatológico do pâncreas de ratos intoxicados pelo veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.1, n.1, p.1-6, 2002.

NUNES, F. P.B.; SAMPAIO, S. C.; SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, vol. 49, p. 1090–1098, 2007.

PADILLA, A.; GOVEZENSKY, T.; POSSANI, L. D.; LARRALDE, C. Experimental envenoming of mice with venom from the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*: differences in mortality and symptoms with and without antibody therapy relating to differences in age, sex and strain of mouse. **Toxicon**, vol., 41, p. 959-65, 2003.

PANYI, G.; POSSANI, L. D.; RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C.; GÁSPÁR, R.; VARGA, Z. K⁺ channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression. **Current pharmaceutical design**, v. 12, p. 2199-220, 2006.

PAPP, F.; BATISTA, C. V. F.; VARGA, Z.; HERCEG, M.; ROMÁN-GONZÁLEZ, S. A.; GASPAR, R.; POSSANI, L. D.; PANYI, G. Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. **Toxicon**, v. 54, p. 379-389, 2009.

PEREIRA, R. L. Efeitos inflamatórios de venenos de escorpiões do gênero *Tityus* (Scorpiones, Buthidae) e sua modulação pelo fator ativador de plaquetas (PAF). 2007. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológica) - Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, 2007.

PERES, A. C.; NONAKA, P.N.; DE CARVALHO, P. T.; TOYAMA, M. H.; SILVA, C. A.; VIEIRA, R.P.; DOLHNIKOFF, M.; ZAMUNER, S. R.; DE OLIVEIRA, L. V. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. **Toxicon**. v. 53, p. 779-85, 2009.

PESSINI, A.C.; KANASHIRO, A.; MALVAR, D.C.; et al. Inflammatory mediators involved in the nociceptive and oedematogenic responses induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom injected into rat paws. **Toxicon** , v.52, p.729-736, 2008.

PETRICEVICH, V.L., LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators Inflamm.**, vol. 24, p. 39–49, 2005.

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, p. 1495–1504, 2001.

PESSINI, A. C.; DE SOUZA, A. M.; FACCIOLI, L. H.; GREGÓRIO, Z. M. O., ARANTES, E. C. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 765-774, 2003.

PETRICEVICH, V. L.; PEÑA C. F. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Mediators Inflamm.** v. 11, p. 173–180, 2002.

PETRICEVICH, V. L. Scorpion venom and the inflammatory response. Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation. **Article ID 903295**, p. 1-16, 2010.

PIMENTA, A. M. C.; ALMEIDA, F. D. M.; DE LIMA, M. E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, 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.

PINTO, M. C. L. *Tityus fasciolatus* e *Tityus serrulatus*: caracterização eletrocardiográfica e laboratorial do envenenamento em ratos. 2009. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

POLIS, G. A. The Biology of Scorpions. **Stanford University Press California**, p. 587, 1990.

PRENDINI, L. e WHEELER, W. C. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy and standards for peer review in online publishing. **Cladistics**, v. 21, p. 446-494, 2005.

POSSANI, L. D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M.; TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. **Eur. J. Biochem.** v. 264, p. 287-300, 1999.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

PRINGOS, E.; VIGNES, M.; MARTINEZ, J.; ROLLAND, V.; MOUSSERON, M. & E, P. Peptide Neurotoxins That Affect Voltage-Gated Calcium Channels: A Close-Up on ω -Agatoxins. **Toxins**, v. 3, p. 17-42, 2011.

RAOURAOUA-BOUKARI R, SAMI-MERAH S, HAMMOUDI-TRIKI D, MARTIN-EAUCCLAIRE MF, LARABA-DJEBARI F. Immunomodulation of the inflammatory response induced by *Androctonus australis* hector neurotoxins: biomarker interactions. **Neuroimmunomodulation**, vol. 19(2), p. 103-110, 2012.

RIBEIRO, E. L. Avaliação clínica e laboratorial de cães submetidos ao envenenamento escorpiônico experimental por *Tityus serrulatus* Lutz e Melo, 1922. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

REIN, J. O. The Scorpions Files. **Trondheim: Norwegian University of Science and Technology**, 2012.

RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C. e POSSANI, L. D. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. **Toxicon**, v. 43, n. 8, Jun 15, p. 865-75. 2004.

ROGOWSKI R.S., KRUEGER B.K., COLLINS J.H., BLAUSTEIN M.P. Tityustoxin Ka blocks voltage-gated non-inactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by α -dendrotoxin in synaptosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** vol., 91, p.1475–1479, 1994.

STAMLER J. S., SINGEL D. J, LOSCALZO J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, vol. 258, p.1898-902, 1992.

SANKARAN, H.; DEVENEY, C.W.; BARTHOLOMEW, C.; et al. Action of the venom of the scorpion *Tityus trinitatis* on pancreatic insulin secretion. **Biochemical Pharmacology**, v.32, n.6, p.1001-1004, 1983.

SRINIVASAN, K. N.; SIVARAJA, V.; HUYS, I.; SASAKI, T.; CHENG, B.; KUMAR, T. K.; SATO, K.; TYTGAT, J.; YU, C.; SAN, B. C.; RANGANATHAN, S.; BOWIE, H. J.; KINI, R. M. e 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. **J Biol Chem**, v. 277, n. 33, Aug 16, p. 30040-7, 2002.

TEIXEIRA, C.F.P., GALANTE, F., MANZOLI, S., STEIL, A.A., JANCAR, S. Inflammatory reaction induced by *Tityus serrulatus* crude venom (TSV) in the lung of rats. *J. Venom. Anim. Toxins*. v. 3, p. 111–111, 1997.

TYTGAT, J.; CHANDY, K.G.; GARCIA, M.L.; GUTMAN, G.A.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F.; VAN DER WALT, J.J.; POSSANI, L.D. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. **Trends Pharmacol. Sci**, v. 20, p. 444–447, 1999.

VASCONCELOS, F., LANCHOTE, V.L., BENDHACK, L.M., GIGLIO, J.R., SAMPAIO, S.V., ARANTES, E.C. Effects of voltage-gated Na_v channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. Endocrinol.** v.141, p. 85–92, 2005.

VASCONCELOS, F., SAMPAIO, S.V., GARÓFALO, M.A.R., GUIMARÃES, L.F.L., GIGLIO, J. R., ARANTES, E.C. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **J. Ethnopharmacol.** v. 95, p. 385–392, 2004.

VENANCIO, E. J.; PORTARO, F. C. V.; KUNIYOSHI, A. K.; CARVALHO, D. C.; PIDDE-QUEIROZ, G.; TAMBOURGI, D. V. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. **Toxicon**, vol. 69, p. 180–190, 2013.

WALLACH, J. B. Interpretação de exames laboratoriais, 8 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 2009.

WATT, D. D. e SIMARD, J. M. Neurotoxic proteins in scorpion venom. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, Nova York, v. 3, p. 181-221, 1984.

WEI, A. D.; GUTMAN, G. A.; ALDRICH, R.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; WULFF, H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated channels. *Pharmacol.* vol., 57, p. 463–472, 2005.

WILSON, J.M. The scorpion story. *Br. Med. J.*, vol. 295, p. 1642–1644, 1987.

ZENG, X. C.; CORZO, G.; HAHIN, R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life*, v. 57, p. 13-21, 2005.

ZHU, S.; DARBON, H.; DYASON, K.; VERDONCK, F. e TYTGAT, J. Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. *Faseb J*, v. 17, n. 12, Sep, p. 1765-7, 2003.

APÊNDICE

Esboço do artigo a ser submetido à revista *Toxicon*.

Inflammatory and pathophysiological parameters of envenoming induced by the scorpion *Tityus stigmurus* in mice

Ilanna T. M. G. Pinheiro ^{a,b}, Juliana F. Silva ^{a,c}, Vivian N. Silbiger ^{d,b}, Matheus F. Fernandes-Pedrosa ^{a,c*}

^a *Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil*

^b *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil*

^c *Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil*

^d *Laboratório de Bioquímica Clínica e Biologia Molecular Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil*

ABSTRACT

Scorpion bites are responsible for significant morbidity and pediatric mortality in many parts of the world and represents a public health problem in Brazil. *Tityus stigmurus* is a scorpion specie of medical importance that occur in the Brazilian Northeast. In this context, this work proposed to analized the inflammatory and pathophysiological parameters after *Tityus stigmurus* scorpion envenoming *in vivo* by intraperitoneal injection of 375 µg/kg of venom in BALB/c mice to evaluate its local and systemic effects. For this purpose, the total and differential leukocyte number, myeloperoxidase activity, nitrite levels and total protein were quantified in peritoneal exsudate, as well as, serum biochemical parameters and cytokine (TNF-α and IL-10) levels were analyzed. Alterations in relative organs weight of the experimental animals were also assessed. The results showed that the venom was not able to induce the migration of cells into the peritoneum of experimental animals. However, significant biochemical abnormalities were observed as the increase in CK, CK-MB, AST, ALT, creatinine, amylase, and uric acid. Moreover, it was observed lesions in organs such as heart,

liver, kidney and pancreas and increase in IL-10 serum. This is the first time that partial characterization of the envenoming induced by *T. stigmurus* in mice was carried out.

Keywords: *Tityus stigmurus*. Envenoming. Inflammation. Paw edema.

*Corresponding author. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Gal. Cordeiro de Farias, s/n, CEP 59012-570, Natal, RN, Brazil.
Email address: mpedrosa@ufrnet.br (M.F. Fernandes-Pedrosa).

1. Introduction

Accidents by scorpions are considered a public health problem in Brazil, due to the increasing number of accidents and the severity of the clinical condition, which may be fatal (Bürcherl, 1968). The scorpion species potentially dangerous to humans belong to the family Buthidae (Lourenço, 2004) and five genus are present in Brazil, they are: *Isometrus*, *Ananteris*, *Microtityus*, *Rhopalurus* and *Tityus*. The scorpion species responsible for the cases of medical relevance in Brazil belongs to the genus *Tityus*. The scorpion species *Tityus stigmurus* has medical importance especially in Northeastern Brazil (Brasil, 2009).

In general, envenoming by scorpions are responsible for significant morbidity and pediatric mortality in many parts of the world and represents a public health problem in Brazil. The scorpionism problem in Northeast it's very neglected, with some sporadic records made by State Health Departments, and *T. stigmurus* is a mainly responsible to scorpionism cases in region (Brasil, 2001). The first case was reported in Recife city, where reported accidents involving children and *T. stigmurus*, culminating in one death (Eickstedt, 1983). The main signs and symptoms caused by envenoming with this specie at the bite site are pain, paresthesia and swelling, and major systemic symptoms are vomiting, sweating and drowsiness (Guarnieri et al., 1996; Lira-da-Silva et al., 2000). Cases considered moderate resulted in death by cardiogenic shock and/or pulmonary edema or severe neurological symptoms in children (Albuquerque et al., 2013).

The most studied species in Brazil is *Tityus serrulatus*, because it is the most important in terms of occurrence and number of envenomings among other species, showing also an endemic character. *T. serrulatus* venom is able to induce a systemic inflammatory response causing the release of inflammatory mediators both in patients (Abdel-Haleem, 2006; D'Suze et al., 2003; Fukuhara et al., 2003; Magalhães et al., 1999), and in animal models (De Matos et al., 1997; Fialho et al., 2011; Pessini et al., 2003; Petricevich e Peña, 2002), as well as serum and hematologic biochemical abnormalities (Cusinato et al., 2010), nociceptive response formation of paw edema in experimental animals (Nascimento et al., 2005; Pessini et al., 2008), injury and acute pulmonary inflammation characterized by pulmonary mechanics modified in animal model (Coelho et al., 2007; Peres et al., 2009) and in humans, associated to myocardial injury (Cupo et al., 1994). Many studies were conducted to understand the effects of scorpion venom, an important fact for the establishment of appropriate therapeutic approaches to treat cases of envenoming for this species.

Few studies with the scorpion *T. stigmurus* are found in the literature. Thus, considering that *T. stigmurus* is one of the scorpions of importance to public health in Brazil and that there are few studies about the accidents, it is necessary to study it better. Therefore, the study proposes to evaluate some inflammatory and pathophysiological parameters after *Tityus stigmurus* scorpion envenoming *in vivo*, to better understand the pathophysiology of envenoming, thus contributing to the future development of more effective therapeutic alternatives for the treatment of its toxic effects.

2. Methods

2.1 Venom

Tityus stigmurus were collected in Natal city (Rio Grande do Norte, Brazil) and maintained in *Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN* (Brazil) with authorization of *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente* (protocol nº 34113-1 ICMBio/Sisbio). The venom was obtained by electrostimulation applied to the scorpion and collected with a micropipette, and stored at -20°C . Venom was pooled from more than 40 adult specimens and named TstV. Venom concentration was expressed as

protein, assayed by the bicinchoninic acid method (BCA), using bovine serum albumin as standard as described by the manufacturer (Pierce, USA).

2.2 Animals

BALB/c male and females mice (6 to 8 weeks, 20 and 30 g) were obtained from the *Biotério do Centro de Ciências da Saúde (UFRN)* in a controlled environment under a 12/12-h light/dark cycle. Water and food were available *ad libitum* until the day of experiment. The animals were handled according to the guidelines of the Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA and the Ethics Committee of UFRN (protocol nº. 028/2014) approved the study. Groups of five animals were used (n=5).

2.3 Lethality

The lethal dose (LD₅₀) was estimated by injecting intraperitoneally (i.p.) with increasing doses of venom into groups of 3 female and 3 male mice. Deaths occurring during 48 h were recorded and LD₅₀ was calculated by probit (Finney, 1971).

2.4 Local and systemic effects evaluation induced by *Tityus stigmurus* envenoming

2.4.1 Envenoming induction

For envenomation, the mice were injected by intraperitoneal route with non-lethal doses of TstV (125, 250 ou 375 µg/kg) and euthanized 6 h after. The control group received only sterile PBS and the animals were sacrificed after the same period of time. The animals were euthanized with an anesthetic ketamine/xylazine (80/10 mg/kg) by intraperitoneal route for the collection of different biological material (blood, peritoneal washing and organs) to analyze the local and systemic effects of venom. Chosen the best dose able to significantly change the above parameters without causing deaths, the experiment was repeated using the chosen fixed-dose (375 µg/kg).

It was evaluated different time intervals (6 and 24 h) and determined the time kinetics of envenoming.

2.4.2 Serum biochemical profile

The animals' blood was collected from the retroorbital plexus. The serum was obtained by incubating for 30 min at 37 ° C following by centrifugation for 5 min at 1500 rpm at 4°C. Biochemical testing of experimental animals were carried out in the automatic analyzer LabMax Plenno (Labtest Diagnóstica®). We determined the levels of glucose, triglycerides, total cholesterol, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine, uric acid, amylase, creatine kinase (CK) and its MB isoenzyme (CK-MB) using commercial kits Labtest Diagnóstica®.

2.4.3 Isolation of peritoneal cells

The peritoneal cavity of the animals was washed with 3 mL of cold sterile PBS. The peritoneal wash obtained was used for total leukocyte count, determination of myeloperoxidase activity (MPO), nitrite, total protein and cytokines levels (TNF- α and IL-10).

2.4.3.1 Total and differential count of peritoneal cells

For total peritoneal cell determination, nine volumes of the total cellular suspension were added to 1 volume of 0.05% crystal violet dissolved in 30% acetic acid. The cells were counted using a bright-line Neubauer chamber. Differential cell counts were determined using the cytopspin system (500 rpm/5 min), fixed, and stained with the Instant-Prov kit (Newprov, Pinhais, Brazil). The percentage of cell subpopulations was calculated based on the count of 100 cells and expressed as relative value.

2.4.3.2 *Myeloperoxidase (MPO) activity*

The quantification of MPO enzyme was used as an indirect biochemical marker of neutrophil migration to the peritoneal cavity as described in the literature with some modifications (Bradley et al., 1982). One hundred microlitres of the total peritoneal fluid collected was mixed with 100 μ L of HTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) in 0.5% potassium phosphate buffer 50 mM pH 6.0 and vortexed for 30 seconds. Then the samples were centrifuged at 10,000 g for 5 min at 4 °C and the supernatant mixed with 200 μ L of 50 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 containing 0.0005% hydrogen peroxide and 0.167 mg / mL of *o*-dianisidina. The measurement of activity was carried out at 460 nm in kinetic reading in a microplate reader (BioTek®). One unit of MPO is defined as the equivalent to the consumption of 1 μ mol of hydrogen peroxide per minute, and 1 μ mol of hydrogen peroxide provides a change in absorbance of 1.13×10^{-2} (OD / min) (POSADAS et al., 2004). The results were expressed as U/mL.

2.4.3.3 *Total protein determination*

Bradford method (Microassay) was used for the quantification of protein from the supernatant of the same item described in the previous washing (2.4.3). Bovine serum albumin (BSA) was used as standard and the absorbance was measured in a microplate reader at 595 nm (BRADFORD et al., 1976).

2.4.3.4 *Nitrite determination*

Peritoneal lavage was centrifuged at 1500 rpm for 5 min at 4°C. The concentration of nitrite was determined from the supernatant by the Griess reaction, using sodium nitrite as standard solution. In one microplate was pipetted 50 μ L of the samples in triplicate, added 50 μ L of sulfanilamide and incubated for 5 min at room temperature and protected from light. Then, also under light, it was added 50 μ L solution NEED (dihydrochloride N-1-naphthylethylenediamine 0.1%) and the absorbance was measured at 540 nm in microplate reader (BioTek®). The concentration of nitrite was expressed in μ M (ALBANO et al., 2013).

2.5 Cytokine determination

The levels of cytokines TNF- α and IL-10 in mice serum and peritoneal washing were determined by two-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using kits from *eBioscience*. In brief, ELISA plates were coated with 100 μ L (1 mg/mL) of the monoclonal antibodies anti-TNF- α and IL-10 and incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C. The wells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS/Tween-20 0,05%) and 250 μ L of blocking solution for 1 h at room temperature. After washing, 100 μ L of duplicate serum samples and the standard curve were added to each well. After 2 h of incubation at room temperature, the wells were washed and incubated with 100 μ L of the biotinylated monoclonal antibodies anti-TNF- α and IL-10 as second antibodies for 30 min at room temperature. After a final wash, the reaction was developed by the addition of 100 μ L of TMB to each well and incubated for 15 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 50 μ L of H₂SO₄ 2N. Optical densities were measured at 450 and 570 nm in a microplate reader.

2.6 Statistical analyses

Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed by Student's t-test, and the level of significant was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Lethality

Among the doses of TstV venom tested in mice, the dose capable of causing 50% of death was 10 μ g/20 g (0.5 mg/Kg) of animal. The starting dose of 30 μ g/mice showed 100% lethality of the assayed animals. It was observed during the course of the experiment that most deaths occurred within the first three hours after venom injection and particularly in groups of animals receiving the highest doses (data not shown). After 24 h of venom injection there were no deaths in either group.

3.2 Local and systemic effects evaluation induced by *Tityus stigmurus* envenoming

3.1.1 Serum biochemical profile

Some biochemical parameters were also evaluated (Table 1). Uric acid, creatinine, CK, CK-MB, AST and ALT were the variables that showed a significant difference when compared between PBS group and different doses of TstV tested.

Table 3

Biochemical data after 6 hours of administration of PBS and TstV in BALB/c mice.

Variable	Control		TstV	
	PBS	125 µg/kg	250 µg/kg	375 µg/kg
AST (U/L)	163.7 ± 23,6	272.4 ± 51.6 [#]	272.4 ± 51.6 ⁺	442.4 ± 148.6 ^{***}
ALT (U/L)	54.2 ± 13.2	72.3 ± 11.9 ^{##}	61.2 ± 12.2 ⁺⁺	129 ± 35.2 ^{**}
CK (U/L)	651 ± 141	1459,6 ± 116,3 ^{**}	1791,8 ± 388,64 ^{**}	2193,75 ± 352,75 ^{***}
CK-MB (U/L)	292.8 ± 41.95	368.8 ± 12.5 [#]	450.6 ± 57.4	573.1 ± 15.5 [*]
Amilase (U/L)	77.6 ± 52.4	388.6 ± 89.6	542.5 ± 69.5	835.5 ± 380.5
Uric acid (mg/dL)	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2 [#]	1.4 ± 0.2 ⁺	2.3 ± 0.2 ^{**}
Creatinine (mg/dL)	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.02 ^{##}	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.02 ^{**}
Glucose (mg/dL)	104 ± 22.5	119.2 ± 20.9	141 ± 6.8	117.6 ± 13.6
Triglycerides (mg/dL)	58.3 ± 10.2	102.2 ± 23.4	90.6 ± 19.9	80.5 ± 2.5
Total chlesterol (mg/dL)	95.3 ± 13.7	115.8 ± 7.3	112.2 ± 11.4	97.5 ± 4.5

It was injected i.p. PBS and doses 125, 250 and 375 µg/kg TstV. After 6 hours was performed the blood collection and processing to obtain the serum. N = 5, *** p ≤ 0.005 compared with the PBS group, ### when the group which received 375 µg/kg TstV is compared with the group that received 125 µg/kg TstV +++ and compared with the group which received 250 µg/kg TstV. The values unmarked presented p > 0.05. Statistical analysis using the Tukey test.

The results were decisive for the choice of dose for envenoming kinetics study caused by *T. stigmurus* venom in experimental animals. Were choice the dose of 375 µg/kg TstV (Table 2).

Table 4

Biochemical data after 6 and 24 hours of administration of PBS and TstV in BALB/c mice.

Time	6 hours		24 hours	
Variable	PBS	375 µg/kg TstV	PBS	375 µg/kg TstV
AST (U/L)	160 ± 28	279.6 ± 68.8*	201.6 ± 44.5	228.1 ± 46.8
ALT (U/L)	60.3 ± 9.1	106.5 ± 13.6**	40.2 ± 7.04	51.8 ± 4.56
CK (U/L)	876.8 ± 208.96	1179.8 ± 108.7**	1333.6 ± 342.2	1340.6 ± 322
CK-MB (U/L)	288.2 ± 74.7	393.5 ± 62.9*	433.4 ± 97.5	472.9 ± 86.3
Amylase (U/L)	364 ± 20	674 ± 74.4***	415.1 ± 82.2	434 ± 21
Uric acid (mg/dL)	0.704 ± 0.08	0.636 ± 0.1	1.268 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Creatinine (mg/dL)	0.2 ± 0.003	0.30 ± 0.01*	0.29 ± 0.05	0.2917 ± 0.02688
Glucose (mg/dL)	126.3 ± 3.7	114.5 ± 3.7*	121.8 ± 14.8	124.6 ± 15.2
Triglycerides (mg/dL)	93.6 ± 19.7	78.2 ± 9.7	146.6 ± 33	130.8 ± 19.1
Total cholesterol (mg/dL)	86.6 ± 4.4	90.7 ± 5.6	110.5 ± 20.5	103.5 ± 6.3

It was injected i.p. PBS and 375 µg/kg TstV. After 6 and 24 hours was performed the blood collection and processing to obtain the serum. N = 5, *** p ≤ 0.05 compared with the PBS group, ### when the group which received 375 µg/kg TstV is compared with the group that received 125 µg/kg TstV +++ and compared with the group which received 250 µg/kg TstV. The values unmarked presented p > 0.05. Statistical analysis using the Tukey test.

3.1.2 Relative organ weight

Organ harvesting was performed and these same organs were weighed. It was calculated relative weight of each animal treated with PBS and TstV. However, there

were no significant differences in the relative organ weights between the groups analyzed in 6 (Fig. 1) and 24 h (Fig. 2).

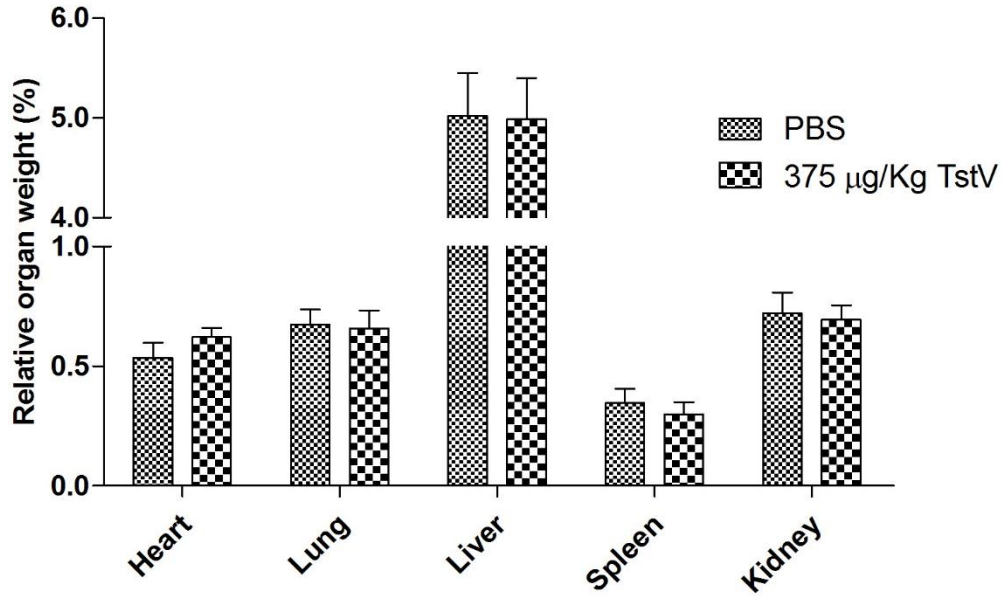


Fig. 1. Relative organ weight after 6 h administration of PBS and TstV in BALB/c mice. It was injected i.p. PBS and 375 µg/kg TstV. After 6 hours was performed collect and weighing the organs. N = 5, *** $p \leq 0.05$ compared with the PBS group. The unmarked bars with $p > 0.05$. Statistical analysis using the Tukey test.

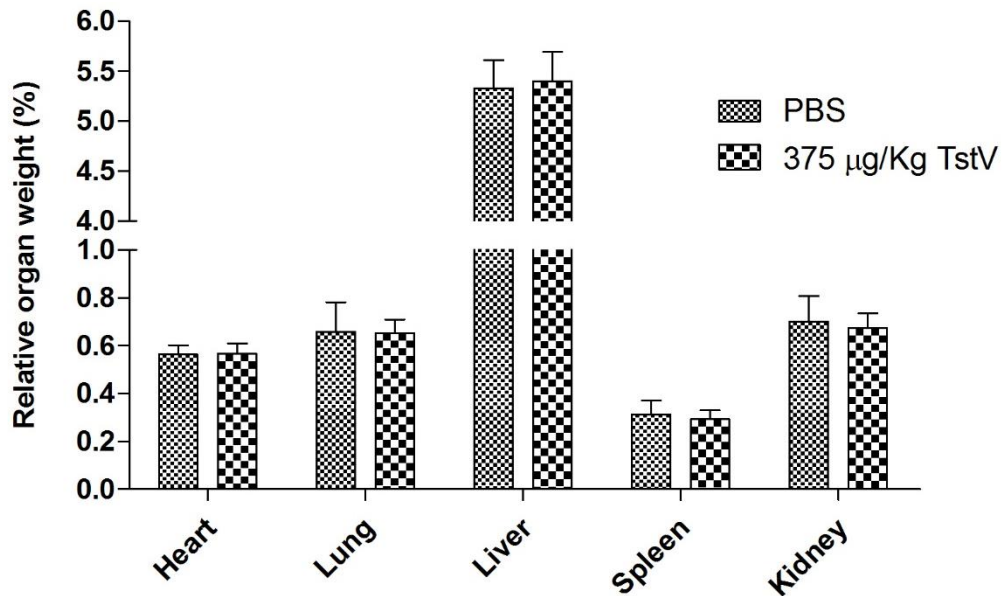


Fig. 2. Relative organ weight after 24 h administration of PBS and TstV in BALB/c mice. It was injected i.p. PBS and 375 µg/kg TstV. After 24 hours was performed collect and weighing the organs. N = 5, *** $p \leq 0.05$ compared with the PBS group. The unmarked bars with $p > 0.05$. Statistical analysis using the Tukey test.

3.1.1 Total and differential count of peritoneal cells

A significant increase in cell migration into the peritoneal cavity was not observed (Fig. 3) but a reduction of cells in the peritoneum of the animals that received doses of 250 and 375 $\mu\text{g/kg}$ of *T. stigmurus* venom (TstV).

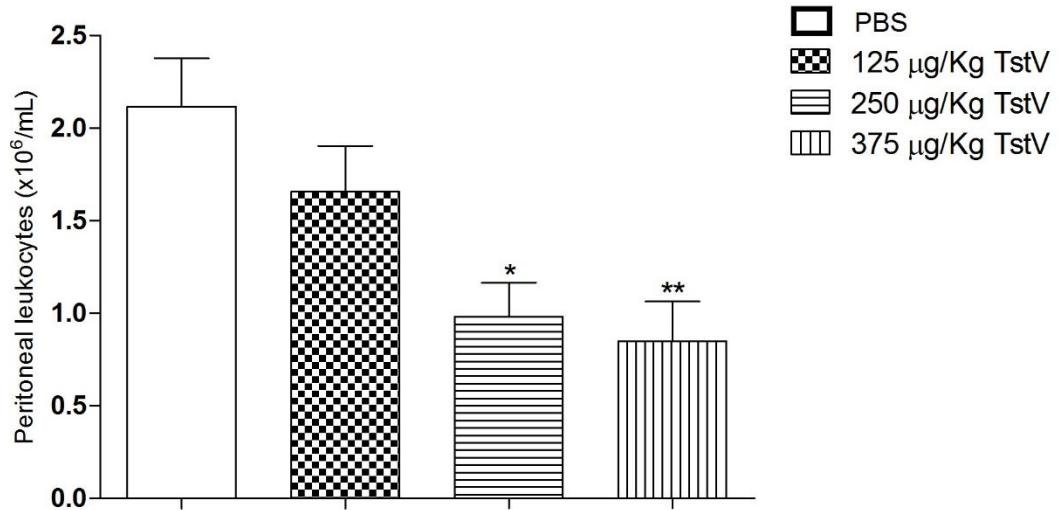


Fig. 3. Leukocytes of peritoneal cavity after 6 hours of administration of PBS and TstV in BALB/c mice. It was injected i.p. PBS and the doses 125, 250 and 375 $\mu\text{g/kg}$ TstV. After 6 hours was performed to collect the peritoneal washing and cell number was determined using a Neubauer chamber. $N = 5$, *** $p \leq 0.05$ compared with the PBS group. The unmarked bars with $p > 0.05$. Statistical analysis using the Tukey test.

Similar results were obtained with the previous experiment in times of 6 and 24 h when is evaluated the presence of leukocytes in the peritoneal cavity of mice. The group that received the dose of 375 $\mu\text{g/kg}$ TstV presented fewer leukocytes compared to the group that received only PBS (Fig. 4).

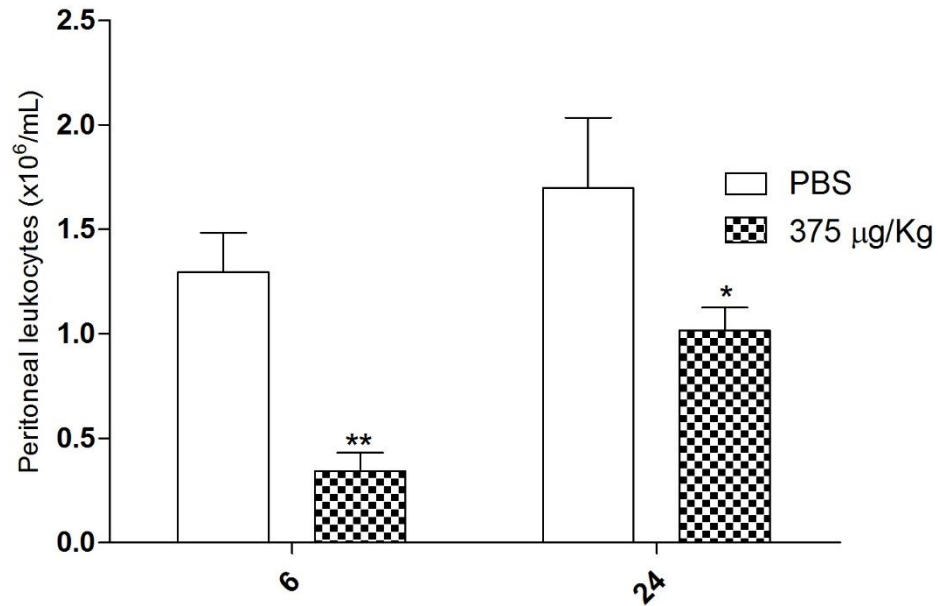


Fig. 4. Leukocytes from the peritoneal cavity after 6 and 24 h of administering PBS and TstV in BALB/c mice. It was injected i.p. PBS and 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TstV. After 6 and 24 hours was performed the collect of the peritoneal washing and the cell number was determined using a Neubauer chamber. N = 5, *** $p \leq 0.05$ compared with the PBS group. Statistical analysis using the Tukey test.

In differential count, in 6 hours, there was a reduction in the number of polymorphonuclear cells when compared to PBS with significant difference and an increase in the population of mononuclear cells (Fig. 5). Already in 24 h, there was not a profile with a significant difference between the cell populations (Fig. 6).

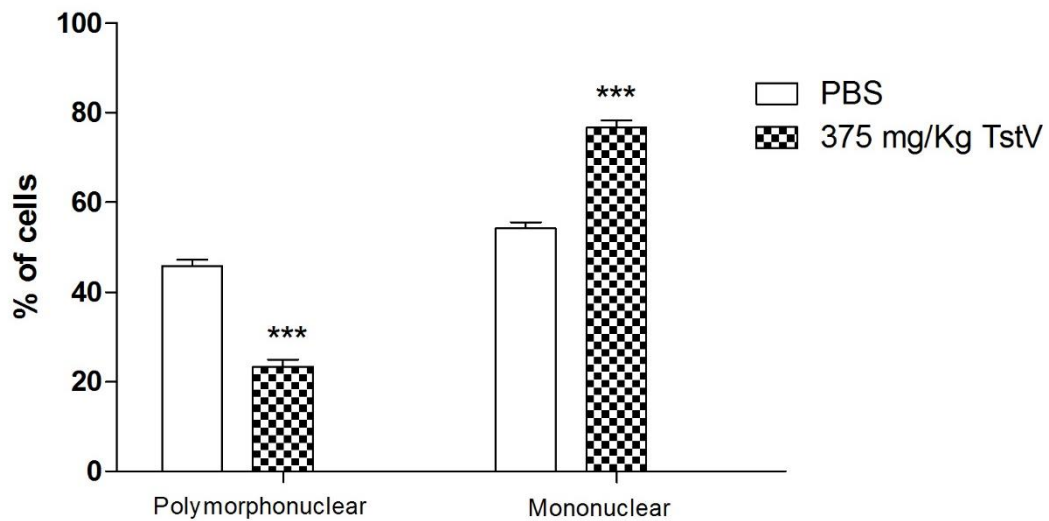


Fig. 5. Differential count of leukocytes in the peritoneal cavity 6 h after administration of PBS and TstV in BALB/c mice expressed as relative values. It was injected i.p. PBS and 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TstV. After 6 hours was performed the collect of the peritoneal washing and was determined the relative value of poly and mononuclear cells. N = 5, *** $p \leq 0.05$ compared to PBS group. Statistical analysis using the Tukey test.

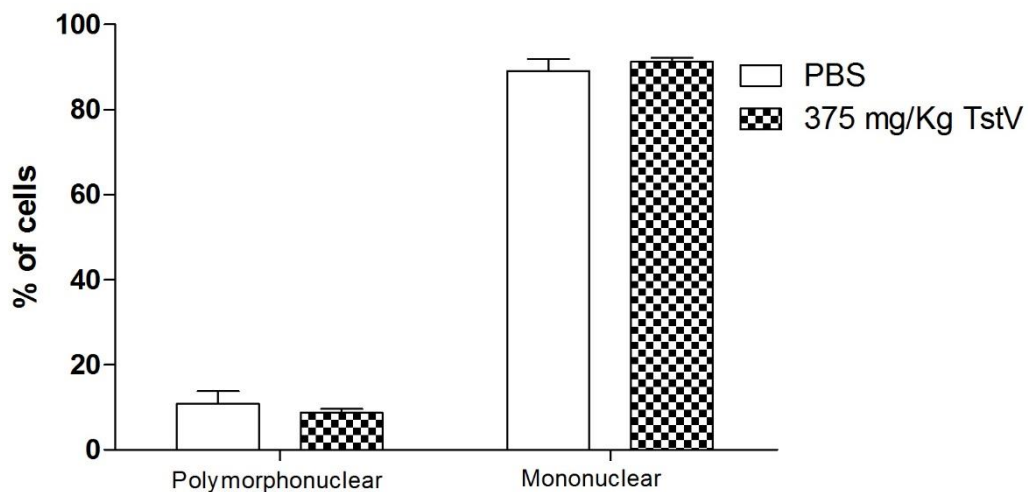


Fig. 6. Differential count of leukocytes of peritoneal cavity 24 h after administration of PBS and TstV in BALB/c mice expressed as relative values. It was injected i.p. PBS and the doses 125, 250 and 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TstV. After 24 hours we collected from the peritoneal washing and was determined the relative value of poly and mononuclear. N = 5, *** $p \leq 0.05$ compared to PBS group. The unmarked bars with $p > 0.05$. Statistical analysis using the Tukey test.

3.1.2 Myeloperoxidase (MPO) activity

Similar behavior was observed for the determination of MPO activity, an enzyme derived from neutrophils which estimates their presence in biological samples (Bradley et al., 1982). The group treated with PBS, shows higher activity of the enzyme MPO

that the groups treated with doses of 125, 250 and 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TstV with statistical significance (Fig. 7).

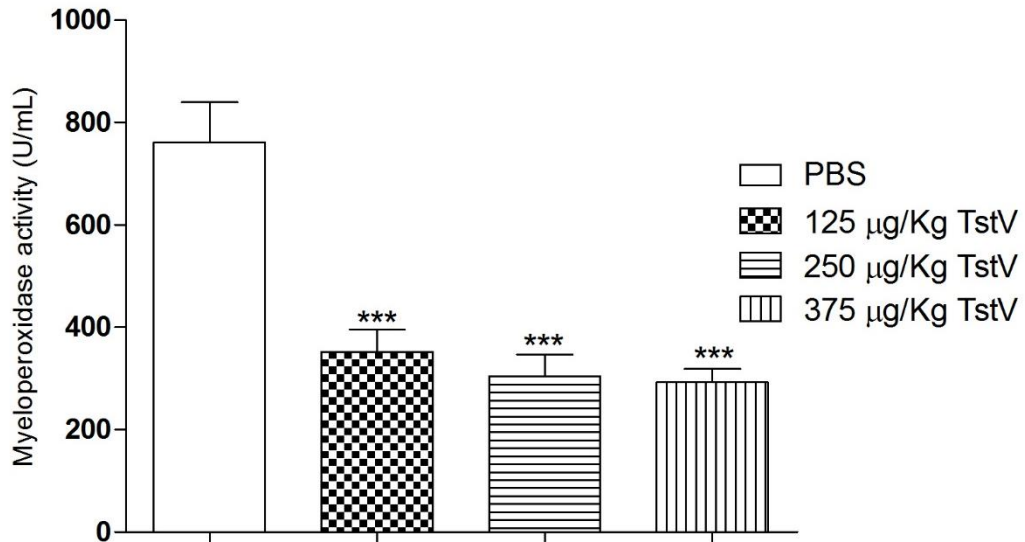


Fig. 7. Myeloperoxidase activity of peritoneal washing after 6 hours of administration of PBS and TstV in BALB / c mice. It was injected i.p. PBS and doses 125, 250 and 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TstV. After 6 hours was performed to collect the peritoneal fluid and extraction of the enzyme and its quantification was performed. N = 5, *** $p \leq 0.05$ compared to PBS group. Statistical analysis using the Tukey test.

When performed the MPO activity, the group that received 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of TstV showed significantly lower activity when compared to the PBS group in 6 h, but with no significant difference between the groups when analyzed at 24 h (Fig. 8).

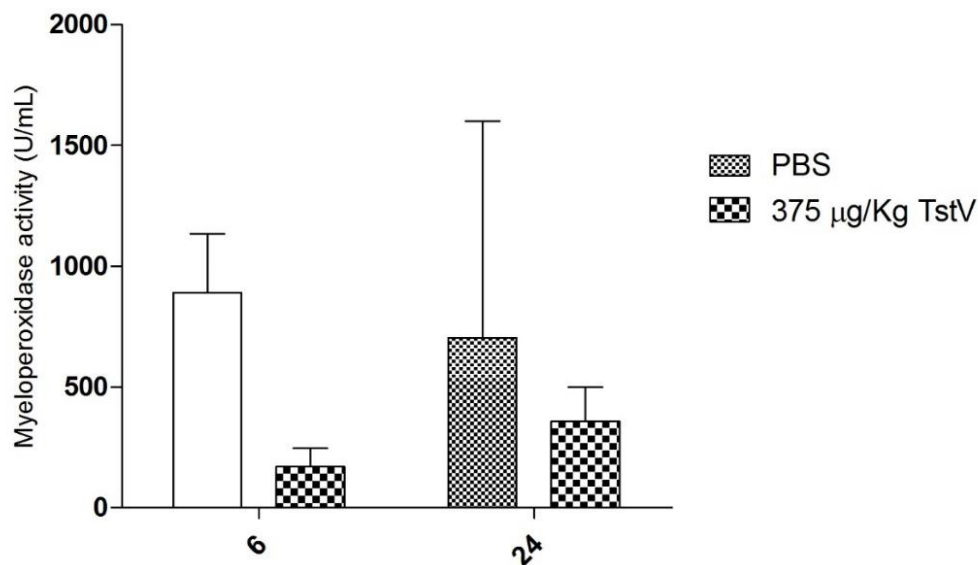


Fig. 8. Myeloperoxidase activity peritoneal lavage after 6 and 24 h of administering PBS and TstV in BALB/c mice. It was injected i.p. PBS and 375 µg/kg TstV. After 6 and 24 hours collecting the peritoneal washing, the extraction of the enzyme and its quantification were performed. N = 5, *** p ≤ 0.05 compared with the PBS group. The unmarked bars with p > 0.05. Statistical analysis using the Tukey test.

3.1.3 Total protein determination

The supernatant of peritoneal washing was collected to determine the total protein concentration by the Bradford method, the protein concentrations were not detected in the samples analyzed in 6 for the doses 125, 250 and 375 µg/Kg, as well as for the dose 375 µg/Kg in 6 and 24 h.

3.1.4 Nitrite determination

The results showed no significant difference between the groups that received PBS and treated with *T. stigmurus* venom for the doses 125, 250 and 375 µg/Kg (Fig. 9). As well as, the nitrite concentration in the supernatant of the peritoneal washing showed no significant differences between treatment groups when assessed at 6 and 24 h in 375 µg/Kg TstV (Fig. 10).

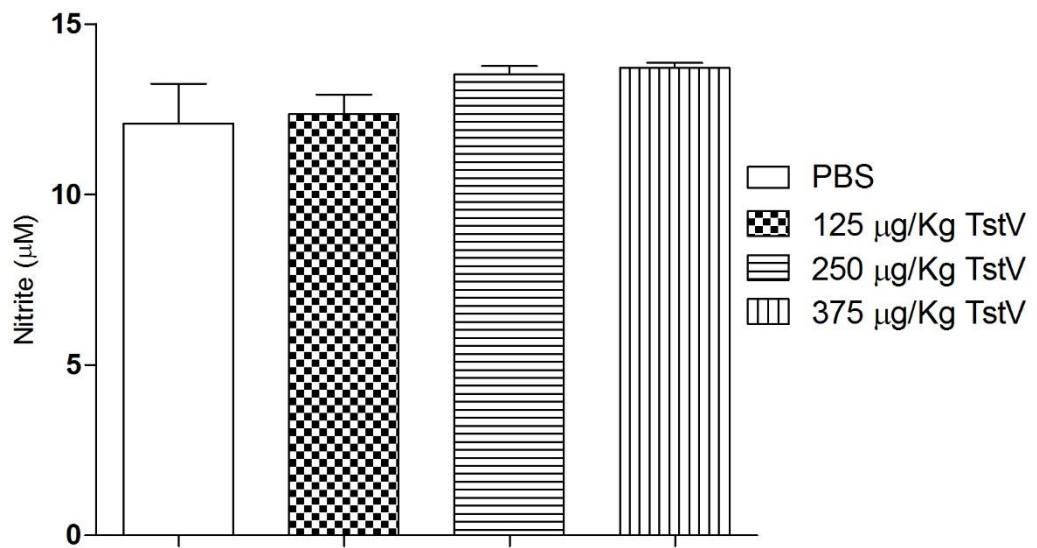


Fig. 9. Nitrite concentration of the peritoneal washing supernatant 6 h after administration of PBS and TstV in BALB/c mice. It was injected i.p. PBS and doses 125, 250 and 375 µg/kg TstV. After 6 hours was performed to collect the peritoneal washing determined the concentration of nitrite by Griess method. N = 5, *** $p \leq 0.05$ compared with the PBS group. The unmarked bars with $p > 0.05$. Statistical analysis using the Tukey test.

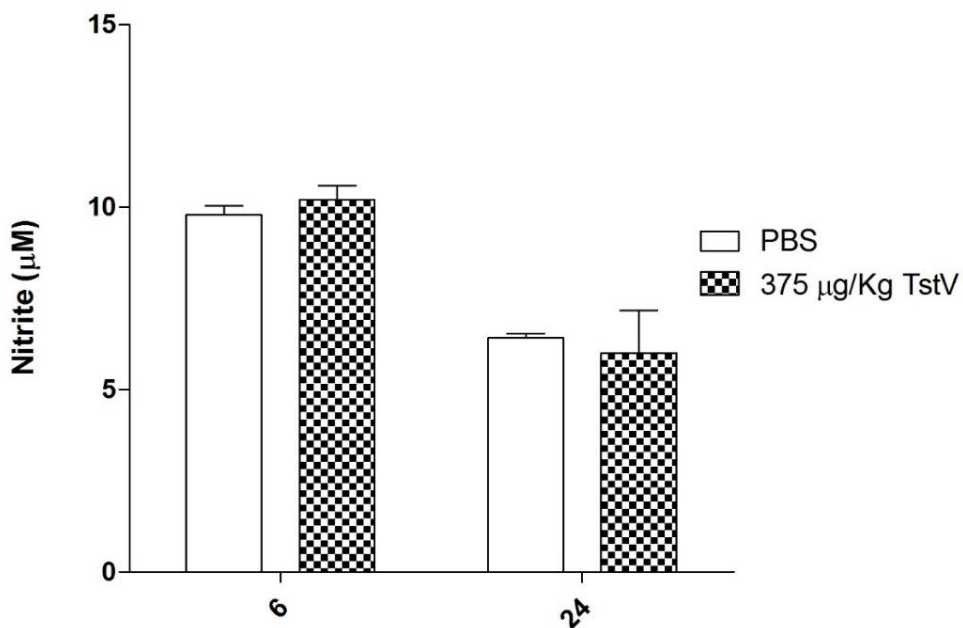


Fig. 10. Nitrite concentration of the peritoneal washing supernatant 6 and 24 h after administration of PBS and TstV in BALB/c mice. It was injected i.p. PBS and 375 µg/kg TstV. After 6 and 24 hours was performed to collect the peritoneal washing determined the concentration of nitrite by Griess method. N = 5, *** $p \leq 0.05$ compared with the PBS group. The unmarked bars with $p > 0.05$. Statistical analysis using the Tukey test.

3.1.5 Cytokine determination

Cytokine concentrations were not detected (TNF- α and IL-10) in supernatant of peritoneal washing of experimental animals for the PBS group as well as TstV the group treated with the times 6 and 24 h for the dose 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Analysis of cytokines in the serum of animals that received PBS and TstV was also performed and it was observed that the venom of *T. stigmurus* was unable to induce TNF- α increases in the time of 6 and 24 hours (Fig. 11). To IL-10 may be noted the induction of an increase in the serum concentration of the same in 6 h, although not being significant (Fig. 12).

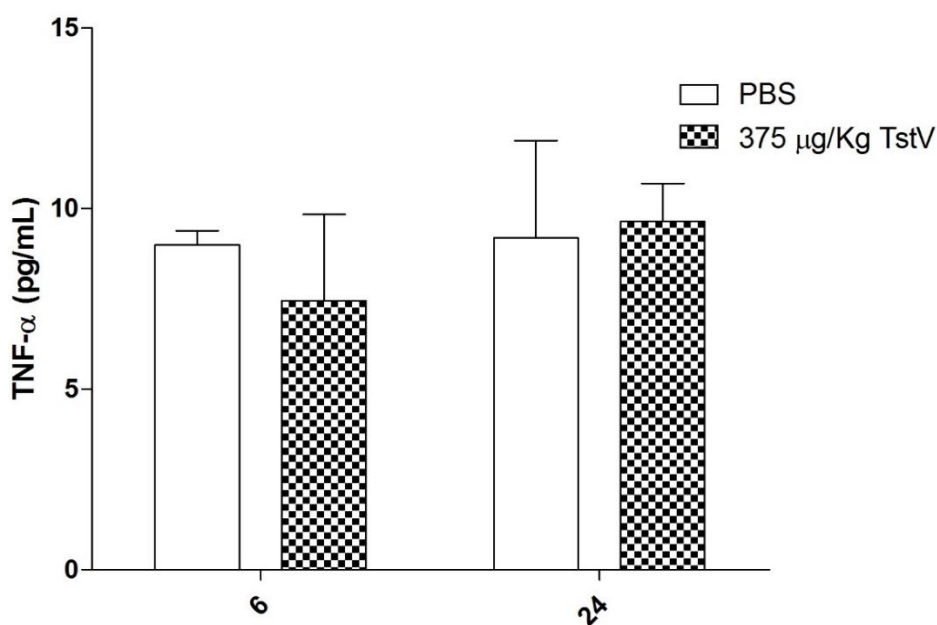


Fig. 11. Concentration of TNF- α after 6 and 24 hours of administration of PBS and TstV in BALB/c mice. It was injected i.p. PBS and 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TstV. After 6 and 24 hours was performed the blood collection and processing to obtain the serum for determination of TNF- α . N = 4. The values unmarked presented $p > 0.05$. Statistical analysis using the Tukey test.

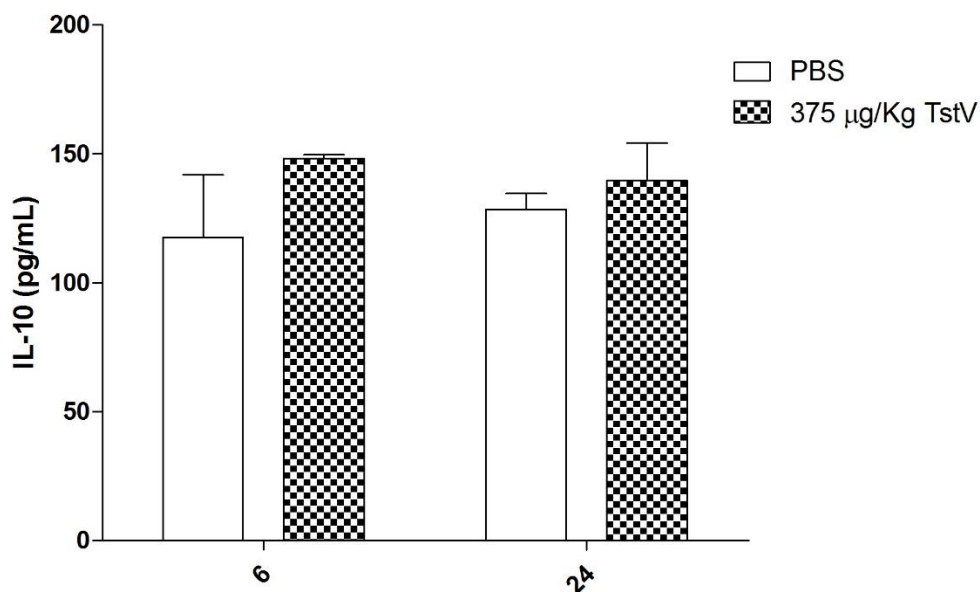


Fig. 12. Concentration of IL-10 after 6 and 24 hours of administration of PBS and TstV in BALB/c mice. It was injected i.p. PBS and 375 µg/kg TstV. After 6 and 24 hours was performed the blood collection and processing to obtain the serum for determination of IL-10. N = 4. The values unmarked presented $p > 0.05$. Statistical analysis using the Tukey test.

4. Discussion

The envenoming with *T. stigmurus* was evaluated *in vivo* by venom injection intraperitoneally. The animals test group showed piloerection, nociceptive behavior (nuisance demonstration after the touch and constant search for a more comfortable position), salivation, dyspnea, hyperactivity followed by hypoactivity and excessive defecation. No animal died or suffered bleeding during the experiments. After six hours of application of PBS and doses of venom (125, 250 and 375 µg/kg), the peritoneal washings were collected for total leukocyte count, extraction and quantification of MPO activity, nitrite dosage, total protein and cytokines. In addition, the animals' blood was collected to obtain the serum and carrying out biochemical measurements to determine a dose to be given to the kinetic envenoming.

Although TstV show evidence that does not induce inflammatory reaction after 6 and 24 h, some biochemical parameters change significantly (Table 2). Glucose levels after 6 h had decreased compared to the group treated with PBS. The hyperglycemia observed after envenoming may be caused by a massive release of catecholamines which was observed in humans (Cupo et al., 1994) and experimental animals (Cooke et al., 1997; Vasconcelos et al, 2004) envenoming by *T. serrulatus*

venom. Moreover, the release of catecholamines and vasoactive substances induces cerebral and pulmonary edema which are important causes of death in envenoming caused by scorpion (Amaral et al., 1993; Teixeira et al., 1997; Vasconcelos et al, 2005; Andrade et al, 2007) results not observed for the TstV in 6 and 24 hr.

AST also showed changed in collected data only in 6 h (with statistical significance) and not in 24 h, compared with baseline in the PBS group (Table 2), and ALT too. Ribeiro (2008), studying the envenoming by *T. serrulatus* in adult dogs observed significant increase in AST up to 6 h after inoculation of the venom, even when there were increased ALT enzyme, also present in hepatocytes. Therefore, to join the both is possible analysis associate them to reversible liver damage, since in 24 h enzymes returned to baseline levels.

Creatinine also shows alterations when compared to baseline values only in the PBS group in 6h, indicating a possible transient renal dysfunction. AST levels are usually found in low concentrations in the blood but when a tissue or an organ such as the liver is damaged, additional quantities of the enzyme are released into the bloodstream. The high quantity of AST present in the serum of the venommed animals may reveal the origin and severity of the injury in a tissue or organ such as the kidney (Corrêa et al., 1997; Pessini et al, 2001), and creatinine levels are changed. This hypothesis can be strengthened with the histopathological analysis of the organs of experimental animals receiving venom *T. stigmurus*, since the analysis of the relative organ weights showed no significant difference when compared to the PBS group 6 (Fig. 1) and 24 h (Fig. 2). Severe histopathological changes in the liver and kidneys of animals that received the *Androctonus australis Hector* venom were observed and characterized by edema associated with hemorrhage, necrosis, and infiltration of inflammatory cells, changes these concomitant with a sharp increase in the enzymatic metabolic activity of AST, urea, uric acid (Lamraoui et al., 2015).

Just as AST, ALT and creatinine, CK-MB and CK value present increased when compared to the baseline group that only received PBS in 6h with statistical significance. Correa et al. (1997) found high levels of CK in rats after receiving *T. serrulatus* venom and Tityustoxina-I alone. Cordeiro et al. (2006) had serum levels of CK-MB increased in dogs 6 h after envenoming by *T. serrulatus* and also found elevated CK-MB in two of the five children admitted to the intensive care unit at the

Hospital das Clinicas (UFMG) of which also showed a significant increase of CK and ECG changes compatible with acute myocardial infarction (Amaral et al., 1991).

The observed results are suggestive of myocardial injury by TstV. Studies show that cardiac changes result from the intense release of catecholamines by action of *T. serrulatus* venom in neuronal ion channels and adrenal gland (Freire-Maia and Ferreira, 1961; Henriques et al, 1968; Possani et al., 1999) and that cause injury to induce increased consumption of oxygen by myocytes. With this, there may occur hypoxia and focal degeneration. Moreover, Fatani et al. (1998) investigated the participation of kinins in the envenoming of rabbits by *Leiurus quinquestriatus* and found a high correlation between plasma concentrations and cardiovascular changes. However, confirmation of cardiac damage will be with the histopathological analysis of animal hearts that received TstV.

Amylase levels in the serum of treated animals with TstV also showed increased significantly in 6 hours compared to baseline of animals that received PBS. The amylase is a high half-life enzyme that has reference values with wide range and can present itself in increased inflammation of the pancreas (Brobst, 1997; Kramer and Hoffmann, 1997). In cases of scorpion envenomation incidents in humans there are reports of pancreatitis (Sankaran et al., 1983; POSSANI et al., 1992; Bucarechi et al., 1995; Fletcher et al., 1996; Cupo et al., 2003; Melo et al., 2004).

Novaes et al. (1982) show significant increases in amylase secretion and change in the composition of pancreatic juice in anesthetized rats after injection of the venom of *T. serrulatus*. The same author reports in 2002, histopathological changes compatible with the diagnosis of pancreatitis. Confirmation of pancreatic injury will be given with the result of the histopathological analysis of the organs of experimental animals.

Besides the evaluation of biochemical parameters, organ harvesting was performed and these same organs were weighed. The analysis of organs was performed in an attempt to detect changes in the relative weight of the same, since the edema is a hallmark of the scorpion, and the most studied is one that occurs in the lungs because it is an important finding in fatalities. The genesis of pulmonary edema is still controversial, and may be considered cardiogenic or inflammatory. The work done by a few Brazilian groups evaluating the inflammatory origin of pulmonary edema

were performed with the venom of *T. serrulatus* (De Matos et al., 2001; Freire-Maia e De Matos, 2001; Freire-Maia et al., 1994; De Matos et al., 1997; Amaral et al., 1994).

It has been shown that the venom of *T. serrulatus* can be found in the experimental lungs envenoming but, since there is a systemic inflammatory response caused by the venom, both human (Magalhães et al., 1999;. D'Suze et al, 2003; Fukuhara et al. 2003; Revelo et al, 1996), as in the mouse (Petricevich and Pena, 2002; Pessini et al, 2003), it is difficult to know if the pulmonary inflammation is directly induced by the venom when it reaches the lungs, or if systemic changes with the production of various inflammatory mediators are responsible.

The results were decisive for the choice of dose for envenoming kinetics study caused by *T. stigmurus* venom in experimental animals. As the venom was not able to induce the migration of cells to the peritoneal cavity, nor difference was observed in nitrite levels among the test groups and was not detected the presence of total protein by the Bradford method, the biochemical parameters that showed significant differences were used to select the dose to be used for the kinetics study. Therefore, the dose 375 µg/kg TstV was chosen to be evaluated at times of 6 and 24 h.

It was verified that intraperitoneal injection venom was not able to induce the migration of inflammatory cells into the peritoneal cavity at doses 125, 250 and 375 µg/kg TstV 6 h at a dose 375 µg/kg TstV 6 and 24 hr. Interestingly, other works carried out with scorpion venom show that *T. serrulatus* scorpion venom is able to induce an inflammatory response causing the release of inflammatory mediators in both patients (Abdel-Haleem, 2006; D'Suze et al, 2003 ; Fukuhara et al, 2003) and in animal models (De Matos et al., 1997;. Pessini et al. 2003; Petricevich and Peña, 2002).

The mechanisms by which the toxins that compose the scorpion venom are able to activate the immune system and induce an inflammatory reaction are not clear, although some groups suggest hypotheses, such as the depolarization of the peripheral nerve cells from the venom with the release neuropeptides such as substance P, which bind to the tachykinin receptors (NK1) present on the surface of inflammatory cells such as macrophages and mast cells, causing them to the production and release of inflammatory mediators. Other works report that neurotoxins have a direct action on ion channels present on the surface of immune cells, and such channels may have an important role in the activation of lymphocytes and

macrophages, participating in the release of cytokines, proliferation, elimination of target cells, cell adhesion, chemotaxis and activation of inflammatory transcription factors (Fialho et al, 2011;. de Matos et al., 2001; Matos et al., 1999; Perez et al., 2009).

Despite the scorpion venom of *T. stigmurus* presents electrophoretic profile similar to the venom of *T. serrulatus*, and serum produced against the venom of this scorpion be able to recognize antigenic regions in TstV (Nishikawa et al., 1994;. Becerril et al, 1996), besides presenting neurotoxins that interact with ion channels of sodium and potassium with high similarity with toxins from *T. serrulatus* and these toxins play a role in the immune response as previously mentioned, the venoms differ among themselves, one of them is the greatest expression of potassium channel toxins in the venom of *T. stigmurus* (Almeida et al., 2012) while there is an increased expression of the sodium channel blocking toxins in *T. serrulatus* (Alvarenga et al., 2012).

Even the scorpion venom being considered as pro-inflammatory agents (Adi-Bessalem et al, 2008; Pessini et al., 2008), Haong et al. (2014) reported the analgesic and anti-inflammatory *Heterometrus laoticus* venom and its fractions in animal models, and in the tested fractions were identified two blocking toxins potassium channel. Thus, the venom inability to induce cell the migration to the peritoneum can be explained by the presence of some toxin with anti-inflammatory action as detected in the aforementioned work, but tests are necessary to confirm this hypothesis. Studies with *T. fasciolatus* venom also showed similar results to our data which no significant difference between the group that received venom and purified water as the total number of leukocytes in the blood (Pinto, 2009). The *T. fasciolatus*, and *T. stigmurus* are medical importance scorpions, but associated to cases of envenoming of less gravity when compared with the accidents that occur with *T. serrulatus* (Brazil, 2009).

Studies have shown that nitrite values are increased at 2 and 6 h after envenomation with an LD₅₀ of scorpion *T. serrulatus* venom, in addition to a significant increase of cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL -10 and interferon gamma) (Petricevich and Peña, 2002;). Nitrite is a marker of nitric oxide expired. NO is produced from the three known isoforms of the enzyme nitric oxide synthetase action (nodes 1 and 3 - constitutive and NOS 2 - inducible) and constitutionally expressed in various cells such as nerve fibers (NOS 1a), endothelial cells (NOS 1b and NOS 3) and neutrophils (1c

NOS) which produces NO under basal levels to control systemic and pulmonary vascular tone, as well as in impulse transmission in central and peripheral neurons. Already the inducible form of the enzyme (NOS 2) produces, many times, quantities of NO greater than the constitutive form and its expression has been identified in macrophages, lymphocytes, neutrophils, eosinophils, hepatocytes, endothelial cells, mast cells, histiocytes and fibroblasts. The expression of NOS 2 is stimulated by interferon gamma, bacterial endotoxin, TNF α , IL-1 and other interleukins, and inhibited by IL-10, glucocorticoids and aminoguanidine (Christopher and Yoshida, 2002).

Severe envenoming induced by injection of venomous animals was associated with higher serum levels of several cytokines and NO (Adi-Bessalem et al, 2012; Petricevich, 2000; Petricevich and Peña, 2002; Petricevich and Lebrun, 2005; Raouraoua-Boukari et al., 2012). However our results don't show significant difference between the groups treated with PBS and TstV, therefore the detected nitrite concentration may be related to production baseline for the maintenance of some processes in the body (Christopher and Yoshida, 2002).

Analysis of cytokines in the serum of animals that received PBS and TstV was also performed and it was observed that the venom of *T. stigmurus* was unable to induce TNF- α increases in the time of 6 and 24 hours. TNF- α is a cytokine released during the acute inflammatory response both patients envenomed by *T. serrulatus* (Fukuhara et al., 2003) and mice which received the peritoneal cavity venom of *T. serrulatus* in 4 h (Pessine et al., 2003). Contrary to what was observed in our study, TNF- α concentration did not appear to be increased in 6 and 24 h. However, similar results to ours was observed in a study by Fialho et al. (2011), who injected 200 μ g/Kg of venom of *T. serrulatus* in BALB/c mice and observed increase in TNF- α concentration in serum only in 30 min and after 6 h TNF- α concentration was about 20 pg/mL.

To IL-10 may be noted the induction of an increase in the serum concentration of the same in 6 h, although not being significant. The IL-10 release has been observed in plasma venomed patients (moderate and severe cases) (Fukuhara et al. 2003; MAGALHÃES et al, 1999) as in moderate and severe envenomings models in experimental animals (Petricevich and Peña, 2002) showed a IL-10 concentration similar to what was observed in our study in 6 h. Other Scorpions such as *Centruroides noxius* and *Androctonus australis hector*, also belonging to Buthidae family induced an

increase of IL-10 released (Petricevich, 2006; ADI-BESSALEM et al, 2008), which is released mediator as part of regulatory mechanism that limits the damage when the immune response is established (Moore et al., 2001).

After the bite, there are signs and symptoms of envenoming, which are varied and range from local pain to severe systemic changes. In general, the clinical picture depends on the severity of the accident. In the site of the bite, the signs and symptoms most commonly observed in cases of envenoming with *T. stigmurus* are pain, numbness, paresthesia, edema, and major systemic symptoms are vomiting, sweating, headache and drowsiness (Guarnieri et al., 1996; Lira-da-Silva et al., 2000).

In general, cases of envenoming by *T. stigmurus* are slight. Data from Toxicological Assistance Center of Pernambuco showed that between 2006 and 2010 victims who suffered bites *T. stigmurus* were children and independent of the time elapsed for prognosis in most cases had mild symptoms, but there are reports of mild cases that resulted in death by cardiogenic shock or pulmonary edema or severe neurological symptoms (Albuquerque et al., 2013). Already in accidents in the Rio Grande do Norte state between 2007 and 2011 96.48% were clinically classified as mild; local manifestations were observed in 93.96% of patients and the mortality rate was 0.058% (Barbosa, 2014).

Differences in the composition of the venom between animals of the same species are common. Environmental factors related to predation, as plenty of food or climate changes can be responsible for variations in the constitution of the venom of these animals (Albuquerque et al., 2013; Guarnieri et al., 1996). Furthermore, the amount of venom injected into the bite site, age, and susceptibility of the individual to venom are factors that may explain the different signs and symptoms that determine the degree of severity observed in cases of envenoming (Brasil, 2001; Cupo et al., 2003; Lira-da-Silva et al., 2000).

4. Conclusion

As for the inflammatory potential of this venom, the results revealed that the was not able to induce the migration of cells into the peritoneum of mice at 6 and 24 h, and was not observed modification of nitrite levels in peritoneal washing, as well total

proteins and TNF- α and IL-10. However, significant biochemical abnormalities were observed as the increase in CK, CK-MB, AST, ALT, creatinine, amylase and uric acid, indicative of organ damage, such as heart, liver, kidney and pancreas. TNF- α and IL-10 had not increased in serum.

Overall, the present results and those reported by other investigators indicate that the venom of different species of medical importance, although induce similar responses may act through distinct mechanisms, thus justifying the investigation of the responses induced by each of them. This would lead to a better understanding of human response against powerful animal toxins and also give information in a more rational pharmacological approach to relieving the signs and symptoms associated with scorpionism.

References

ABDEL-HALEEM, A. H.; MEKI, A. R.; NAOMAN, H. A.; MOHAMED, Z. T. Serum levels of IL-6 and its soluble receptor, TNF- α and chemokine RANTES in scorpion envenomed children: Their relation to scorpion envenomation outcome. *Toxicon*, v. 47, p. 437-444, 2006.

ADI-BESSALEM, S.; MENDIL, A.; HAMMOUDI-TRIKI, D.; LARABA-DJEBARI, F. Lung immunoreactivity and airway inflammation: their assessment after scorpion envenomation. **Inflammation**, vol. 35, p. 501-8, 2012.

ADI-BESSALEMA, S.; HAMMOUDI-TRIKIA, D.; LARABA-DJEBARI, F. Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. **Experimental and Toxicologic Pathology**, vol., 60, p. 373–380, 2008.

ALBUQUERQUE, C.M.R.; NETO, P. L. S.; AMORIM, M. L. P.; PIRES, E. C. V. Pediatric epidemiological aspects of scorpionism and report on fatal cases from *Tityus stigmurus* stings (Scorpiones: Buthidae) in State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 46, p. 484-489, 2013.

ALBANO, M. N. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 612-617, 2013.

ALMEIDA, D. D.; TORRES, T. M.; SCORTECCI, K. C.; KOBASHI, L. S.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S. R. B. M.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; JUNQUEIRA-de-AZEVEDO, I. L. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Profiling the resting venom

gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. **BMC Genomics**, v. 13, p. 1471-2164, 2012.

ALMEIDA, D. D.; TORRES, T. M.; BARBOSA, E. G.; LIMA, J. P. M. S.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Molecular approaches for structural characterization of a new potassium channel blocker from *Tityus stigmurus* venom: cDNA cloning, homology modeling, dynamic simulations and docking. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 430, p. 113–118, 2013.

AMARAL, C.F.S.A.; LOPES, J.A.; MAGALHAES, R.A.; et al. Electrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial damage after *Tityus serrulatus* scorpion poisoning. **The American Journal of Cardiology**, v.67, p.655-657, 1991.

AMARAL, C.F.S., BARBOSA, A.J.A., LEITE, V.H.R., TAFURI, W.L., REZENDE, N.A. Scorpion sting-induced pulmonary oedema: evidence of increased alveolo-capillary membrane permeability. **Toxicon**, vol. 32, p. 999–1003, 1994.

AMARAL, C.F.S., RESENDE, N.A., FREIRE-MAIA, L. Acute pulmonary oedema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. **Am. J. Cardiol.** v. 71, p. 242–245, 1993.

ANDRADE, M.V., LISBOA, F.A., PORTUGAL, A.L., ARANTES, R.M.E., CUNHA-MELO, J.R. Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines. *Comp. Biochem. Physiol.* **A Mol. Integr. Physiol.** V. 146, p. 581–587, 2007.

BARBOSA I. R. Scorpionism aspects in the Rio Grande do Norte state. **Rev.Saúde.Com**, vol. 10, p. 43-53, 2013.

BATISTA, C.V.F. ; ROMÁN-GONZÁLEZ, S.A. ; SALAS-CASTILLO, S.P. ; ZAMUDIO, F.Z. ; GÓMEZ-LAGUNAS, F. ; POSSANI, L.D. Proteomic analysis the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. **Comparative Biochemistry and Physiology**. vol., 146, p.147-157, 2007.

BECERRIL, B.; CORONA, M.; MEJIA, M. C.; MARTIN, B. M.; LUCAS, S.; BOLIVAR, F.; POSSANI, L. D. Toxic peptides and genes encoding toxin c of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. **Biochem. J**, v. 313, p. 753-760, 1996.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, vol. 72, p. 248–254, 1976.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Controle de Escorpiões. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Escorpionismo. In: Comed/Asplan/Fns (Ed.). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. Escorpionismo, p. 39-47.

BROBST, D.F. Pancreatic Function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5ed. San Diego:Academic Press, p.353-366, 1997.

BÜSSE R, MÜLSCH A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett**, vol. 275, p. 87–90, 1990.

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

BÜCHERL, W. Brazilian scorpions and spiders. I. Biology and of scorpions and effects of their venoms. II. The poisonous and aggressive spiders of the genus *Phoneutria perty*. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 1, p. 181-190, 1968.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cir. Brasileira**. São Paulo, v. 17, n. 6, 2002.

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.

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

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

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Sarvier, **FAPESP**, v. 1, p. 182-197, 2003.

CUPO, P., JURCA, M., AZEVEDO-MARQUES, M.M., OLIVEIRA, J.S.M., HERING, S.E. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 36, p. 67–76, 1994.

CUSINATO, D.A.C.; SOUZA, A. M.; VASCONCELOS, F.; GUIMARÃES, L.F.L.; LEITE, F.P.; GREGÓRIO, Z.M.O.; GIGLIO, J.R. ; ARANTES, E.C. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, vol. 56, 2010.

DE MATOS, I. M.; ROCHA, A. O.; LEITE, R.; FREIRE-MAIA, L. Lung oedema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**. v. 118, p.143-8, 1997.

DE-MATOS, I. M.; TALVANI, A.; ROCHA, O. O.; 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. 863-7, 2001.

D'SUZE, G.; MONCADA, S.; GONZÁLEZ, C.; SEVCIK, C.; AGUILAR, V.; ALAGÓN, A. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. **Toxicon**. v. 41, p. 367-75, 2003.

EICKSTEDT, V. R. D. Escorpionismo por *Tityus stigmurus* no Nordeste do Brasil (Scorpiones; Buthidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 47/48, p. 133-137, 1983.

FATANI, A.J.; FURMAN, B.L.; ZEITLIN, I.J. The involvement of plasma kinins in the cardiovascular effects of *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom in anaesthetized rabbits. **Toxicon**, v.36, n.3, p.523-536, 1998.

FIALHO, E. M.; MACIEL, M. C.; SILVA, A. C.; REIS, A. S.; ASSUNÇÃO, A. K.; FORTES, T. S; SILVA, L. A., GUERRA, R. N; KWASNIEWSKI, F. H.; NASCIMENTO, F. R. Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**. v. 58, p. 480-5, 2011.

FINNEY, D.J. Probits analysis. 3rd ed. Cambridge University Press, 1971.

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

FREIRE-MAIA, L. e FERREIRA, M. C. Estudo do mecanismo da hiperglicemia e da hipertensão arterial produzidas pelo veneno de escorpião no cão. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, p. 11-22, 1961.

FREIRE-MAIA, L.; PINTO, G. I. e FRANCO, I. Mechanism of the cardiovascular effects produced by purified scorpion toxin in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 188, n.1 , Jan, p. 207-13, 1993.

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

GUARNIERI, M.C. ; LIMA, P.K. ; PIMENTEL, D.C.C. ; MAIA, K.C. ; ANDRADE, L.R. ; VALENÇA, R.C. ; VASCONCELOS, C.M.L. ; PORTO, M.L. ; OLIVEIRA, A.E. Clinical

aspects and treatment of scorpion stings in the region of Recife Brazil. **Toxicon**, vol. 34, p.331-331, 1996.

HENRIQUES, M. C., GAZZINELLI, G., DINIZ, C. R. AND GOMEZ, M. V. Effect of the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* on adrenal gland catecholamines. **Toxicon**, 5, p. 175-179, 1968.

HOANG, A. N.; HOANG D.M. VO, NGUYEN P. VO, KSENIYA S. KUDRYASHOVA, OKSANA V. NEKRASOVA, ALEXEY V. FEOFANOV, MIKHAIL P. KIRPICHNIKOV, TATYANA V. ANDREEVA, MARINA V. SEREBRYAKOVA, VICTOR I. TSETLIN, YURI N. UTKIN. Vietnamese *Heterometrus laoticus* scorpion venom: Evidence for analgesic and anti-inflammatory activity and isolation of new polypeptide toxin acting on Kv1.3 potassium channel, **Toxicon**, vol. 77, p. 40–48, 2014.

KRAMER, J.W.; HOFFMANN, W.E. Clinical Enzimology. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5ed. San Diego:Academic Press, p. 303-325, 1997.

LAMRAOUI, A.; ADI-BESSALEM, S.; LARABA-DJEBARI, F. Immunopathologic effects of scorpion venom on hepato-renal tissues: Involvement of lipid derived inflammatory mediators. **Exp Mol Pathol**. vol., 99(2), p. 286-96, 2015.

LIBBY P, HANSSON GK. Biology of disease: involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. **Lab Invest.**, vol. 64, p. 5–15, 1991.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; AMORIM A. M.; BRAZIL T. K. Poisonous sting by *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) in the state of Bahia, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, p. 239–245, 2000.

LOURENÇO, W. R. *Humicolous microcharmids* scorpions: a new genus and species from Madagascar. *C. R. Biol.* 327(1), 77-83, 2004.

MACHADO, R. J. A.; LEÔNIDAS G.M.J.; MONTEIRO, N. K. V.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; PORTARO, F.C.V.; BARBOSA, E. G.; BRAGA, V. A.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Homology modeling, vasorelaxant and bradykinin-potentiating activities of a novel hypotensin found in the scorpion venom from *Tityus stigmurus*. **Toxicon**, vol. 101, p. 11-18, 2015.

MAGALHÃES, M. M.; PEREIRA, M. E.; AMARAL, C. F.; REZENDE, N. A.; CAMPOLINA, D.; BUCARETCHI, F.; GAZZINELLI, R. T.; CUNHA-MELO, J. R. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**. v. 37, p.1155-64, 1999.

MELO, E. T.; ESTRELA, A. B.; SANTOS, E. C. G.;MACHADO, P. R. N. L.; FARIAS, K. J. S.; TORRES, T. M.; CARVALHO, E. D.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; BARBOSA, E. G.; LIMA, J. P. M. S.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*: Stigmurin. **Toxicon**, vol., 6, p. 3–10, 2015.

MELO, M. M.; SILVA JÚNIOR, P. G. P.; VERCOSA JÚNIOR, D. Escorpionismo. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 90-97, 2004.

MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Res**, vol. 43, p. 109–142, 1991.

MOORE, K. W; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, vol, 19, p. 683-765, 2001.

NASCIMENTO JUNIOR, E.B.; COSTA, K.A.; BERTOLLO, C.M.; et al. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v.45, n.7, p.585-593, 2005.

NISHIKAWA A. K.; CARICATI, C. P.; LIMA, M. L.; DOS SANTOS M. C.; KIPNIS, T. L.; EICKSTEDT, V. R.; KNYSAK, I.; DA SILVA, M. H.; HIGASHI, H. G.; DA SILVA, W. D. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of brazilian scorpions. **Toxicon**, vol 32, p. 989-998, 1994.

NOVAES, G.; CATANZARO, O. L.; BERALDO, W. T.; FREIRE-MAIA, L. Effect of purified scorpion toxin (tityustoxin) on the pancreatic secretion of the rat. **Toxicon**, v.20, n.5, p.847-853, 1982.

NOVAES, G.; QUEIROZ, A.C.; QUEIROZ, A.P.; et al. Estudo histopatológico do pâncreas de ratos intoxicados pelo veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.1, n.1, p.1-6, 2002.

PAPP, F.; BATISTA, C. V. F.; VARGA, Z.; HERCEG, M.; ROMÁN-GONZÁLEZ, S. A.; GASPAR, R.; POSSANI, L. D.; PANYI, G. Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. **Toxicon**, v. 54, p. 379-389, 2009.

PERES, A. C.; NONAKA, P.N.; DE CARVALHO, P. T.; TOYAMA, M. H.; SILVA, C. A.; VIEIRA, R.P.; DOLHNIKOFF, M.; ZAMUNER, S. R.; DE OLIVEIRA, L. V. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. **Toxicon**. v. 53, p. 779-85, 2009.

PESSINI, A.C.; KANASHIRO, A.; MALVAR, D.C.; et al. Inflammatory mediators involved in the nociceptive and oedematogenic responses induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom injected into rat paws. **Toxicon** , v.52, p.729-736, 2008.

PETRICEVICH, V.L., LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators Inflamm.**, vol. 24, p. 39–49, 2005.

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, p. 1495–1504, 2001.

PESSINI, A. C.; DE SOUZA, A. M.; FACCIOLI, L. H.; GREGÓRIO, Z. M. O., ARANTES, E. C. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 765-774, 2003.

PETRICEVICH, V. L.; PEÑA C. F. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Mediators Inflamm.** v. 11, p. 173–180, 2002.

PETRICEVICH, V. L. Scorpion venom and the inflammatory response. Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation. **Article ID 903295**, p. 1-16, 2010.

PINTO, M. C. L. *Tityus fasciolatus* e *Tityus serrulatus*: caracterização eletrocardiográfica e laboratorial do envenenamento em ratos. 2009. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RAOURAOUA-BOUKARI R, SAMI-MERAH S, HAMMOUDI-TRIKI D, MARTIN-EAUCCLAIRE MF, LARABA-DJEBARI F. Immunomodulation of the inflammatory response induced by *Androctonus australis* hector neurotoxins: biomarker interactions. **Neuroimmunomodulation**, vol. 19(2), p. 103-110, 2012.

RIBEIRO, E. L. Avaliação clínica e laboratorial de cães submetidos ao envenenamento escorpiônico experimental por *Tityus serrulatus* Lutz e Melo, 1922. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

STAMLER J. S., SINGEL D. J, LOSCALZO J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, vol. 258, p.1898-902, 1992.

SANKARAN, H.; DEVENEY, C.W.; BARTHOLOMEW, C.; et al. Action of the venom of the scorpion *Tityus trinitatis* on pancreatic insulin secretion. **Biochemical Pharmacology**, v.32, n.6, p.1001-1004, 1983.

TEIXEIRA, C.F.P., GALANTE, F., MANZOLI, S., STEIL, A.A., JANCAR, S. Inflammatory reaction induced by *Tityus serrulatus* crude venom (TSV) in the lung of rats. **J. Venom. Anim. Toxins**. v. 3, p. 111–111, 1997.

VASCONCELOS, F., LANCHOTE, 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. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. Endocrinol.** v.141, p. 85–92, 2005.

VASCONCELOS, F., SAMPAIO, S.V., GARÓFALO, M.A.R., GUIMARÃES, L.F.L., GIGLIO, J. R., ARANTES, E.C. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **J. Ethnopharmacol.** v. 95, p. 385–392, 2004.

VENANCIO, E. J.; PORTARO, F. C. V.; KUNIYOSHI, A. K.; CARVALHO, D. C.; PIDDE-QUEIROZ, G.; TAMBOURGI, D. V. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of Tityus genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. **Toxicon**, vol. 69, p. 180–190, 2013.

ANEXOS