

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**NATHALIA CORAL GALVANI**

**AVALIAÇÃO GENÔMICA E DOPAMINÉRGICA DO TRATAMENTO  
COM SORO ANTIESCORPIÔNICO EM ANIMAIS INOCULADOS COM  
VENENO DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922**

**CRICIÚMA, SC**

**2019**

**NATHALIA CORAL GALVANI**

**AVALIAÇÃO GENÔMICA E DOPAMINÉRGICA DO TRATAMENTO  
COM SORO ANTIESCORPIÔNICO EM ANIMAIS INOCULADOS COM  
VENENO DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Vanessa Moraes de Andrade.

**CRICIÚMA, SC**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

G182a Galvani, Nathalia Coral.

Avaliação genômica e dopaminérgica do tratamento com soro antiescorpiônico em animais inoculados com veneno do escorpião *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 / Nathalia Coral Galvani. - 2019.

69 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.

Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

Coorientação: Vanessa Moraes de Andrade.

1. Soroterapia. 2. Soro antiescorpiônico - Toxicologia. 3. Testes de mutagenicidade. 4. Escorpião - Veneno. 5. Dano do DNA. 6. Dopamina. I. Título.

CDD 23. ed. 615.37



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

---

#### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 325

Com início às 10h (dez horas) do dia dezoito do mês de junho de 2019 (dois mil e dezoito), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Nathalia Coral Galvani** sob a orientação do **Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado Ávila**, intitulada "AVALIAÇÃO GENÔMICA E DOPAMINÉRGICA DO TRATAMENTO COM SORO ANTIESCORPIÔNICO EM ANIMAIS INOCULADOS COM VENENO DE ESCORPIÃO *Tityus serrulatus Lutz e Mello, 1992*". A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Profa. Dra. Clara Guerra Duarte (Fundação Ezequiel Dias - FUNED) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 11 (onze horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador Adjunto do Programa, Criciúma, 19 (dezoito) de junho de 2019 (dois mil e dezoito).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck  
Coordenador Adjunto PPGCS  
Prof. Dr. Emilio Luiz Streck  
Coordenador Adjunto do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi  
Assistente Administrativo

## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo a resolução 07/2015 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia experimental em conjunto com o laboratório de Biomedicina Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

***“Esse trabalho é dedicado aos meus pais Bernardete e Alaor, por tanto abdicarem de seus sonhos para realizar os meus e por sempre acreditarem em mim. A minha família e aos que considero parte dela, por toda força, amor e compreensão durante todo este período. E aos amigos que me deram sustentação para que tudo fosse possível”.***

## AGRADECIMENTOS

Depois de passado esses dois anos e finalizado uma nova etapa, agradecer é realmente complexo. É de fato difícil ponderar a importância e significado que cada um teve nessa trajetória e o quanto crescemos na construção de uma dissertação. Muitas pessoas tiveram significados diferentes e todos de mesma importância.

Sendo assim, agradeço primeiramente a Deus, minha fonte de força e equilíbrio, a quem sempre recorri.

Aos meus pais, sem sombra de dúvida as pessoas que me deram maior sustentação em todos os sentidos, durante essa trajetória. A minha mãe, minha primeira e eterna professora, a quem devo toda a persistência que tive e que me faz buscar alcançar uma coisa de cada vez com determinação. Ao meu pai e amigo, aquele que sempre compreendeu meus objetivos, sem nunca duvidar que eu os alcançaria. Dedico a eles, por terem me dado a maior educação possível, e a base fundamental para que eu soubesse como alcançar tudo aquilo que almejo, pelo amor e fortaleza, que me fizeram firme durante todo este período, nos momentos mais difíceis. Agradeço a eles, pois sem eles não teria chego até aqui. Agradeço a eles por me vencerem que seria possível.

Agradeço ao meu namorado Samuel, por todo apoio, paciência, incentivo, por compartilhar dos mesmos ideais e me escutar com cautela, transmitindo tranquilidade sempre que preciso foi.

Agradeço imensamente ao meu orientador Ricardo Andrez Machado de Ávila, por me orientar de forma incomparável. Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos, puxões de orelha e paciência, por me incentivar a fazer o melhor, buscando respostas e equilíbrio por mais difícil que fosse. Aprendi muito com ele e levarei os ensinamentos para toda a vida. Agradeço a minha coorientadora Vanessa Moraes de Andrade, por todos os ensinamentos e conhecimentos que me foi passado.

Agradeço de todo meu coração a “Ra” (Rahisa) por toda ajuda que me foi dada, todo apoio, motivação, dedicação, imensa paciência sempre que precisei, e pela sua amizade. Agradeço a Emily, Duda, Bruna, Gabriel, Haylla, Jéssica, Iandria, Rafaela e todos os alunos que estiveram presentes, pela grande ajuda com as incontáveis amostras. Aos amigos que fiz durante essa dissertação Bethina, Mirian, Daysi, Giulia, Rahisa e Jonathann, pela companhia de todos os dias e pelos sufocos

que foram passados durante esse período. Agradeço a vocês, pelos ensinamentos e amizade. Sem sombra de dúvidas sem um grande grupo nada é possível, nenhuma pesquisa é feita sem sustentação e dedicação. O grupo “BIOTECH” de toda certeza foi essencial para a conclusão de tal estudo e também a todo o laboratório de Fisiopatologia experimental – FISIOPAT. As meninas do Labim, em especial a Adri, Marina e Thaís por todo apoio, compreensão, companheirismo, paciência e amizade. Agradeço ainda a minha amiga Indiani, que pode me acompanhar durante a trajetória desde a graduação e iniciação científica

A todos que auxiliaram de alguma forma direta ou indiretamente, a todos amigos e familiares que compreenderam minha ausência inúmeras vezes.

Aos que gentilmente nos forneceram o SAEsc e o veneno, somos muito gratos a Fundação Ezequiel Dias (FUNED), de Belo Horizonte – Brasil e ao professor Dr. Carlos Chávez-Olórtegui da Universidade Federal de Minas Gerais, de Belo Horizonte – Brasil.

Agradeço ainda, aos queridos mestres, doutores e professores, e todos aqueles que passaram seu conhecimento, e fizeram parte desta conquista.

“É inútil falar de curas ou pensar em remédio até termos considerado as causas [...] as curas podem ser imperfeitas e não servir para nada enquanto as causas não tiverem sido pesquisadas”.

Robert Burton, *The Anatomy of Melancholy*, 1893.

## RESUMO

A espécie *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922, vem se destacando no Brasil pelos graves acidentes ocasionados e sua vasta sintomatologia desenvolvida pela variedade de moléculas que compõe o veneno. Entre os principais moléculas, destacam-se as  $\alpha$  e  $\beta$ -toxinas, que possuem ação nos canais iônicos, como os canais permeáveis para  $\text{Na}^+$ , ao  $\text{K}^+$ , ao  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$ . Ao interagir com os diferentes canais, as toxinas do veneno provocam liberação de neurotransmissores em níveis elevados, como a dopamina que é liberada principalmente nas regiões cerebrais, ocasionando a despolarização de membranas. O único tratamento recomendado pela Organização Mundial de Saúde é a administração de soros antiescorpiônicos – SAEsc. Em 2017, nosso grupo mostrou pela primeira vez que o veneno do escorpião *T. serrulatus*, leva a danos proteicos e na molécula de DNA, onde estes podem progredir a disfunções, e complicações no sistema celular. Sabendo dos efeitos ocasionados pelo veneno desta espécie, este trabalho visou avaliar a atuação de um dos SAEsc mais utilizados no Brasil na modulação genômica e verificar ainda sua ação neutralizante a nível dopaminérgico. Para alcançar tais objetivos, foram utilizados 96 camundongos *Swiss* adultos (18-22g com 28-35 dias), divididos em 3 grupos com 30 animais cada: Grupo que recebeu somente veneno, grupo que recebeu somente SAEsc e grupo que recebeu veneno + SAEsc. Cada grupo foi redividido em 5 subgrupos contendo 6 animais que foram submetidos à eutanásia em diferentes tempos (1h, 2h, 6h, 12h e 24h). Além destes, um grupo controle com 6 animais recebeu administração de tampão fosfato-salino (PBS) e foi submetido à eutanásia em seguida (tempo de 0h). Nos diferentes grupos administrou-se por animal via subcutânea 100 $\mu\text{l}$  correspondente a  $1/2\text{DL}_{50}$  de veneno de *T. serrulatus*, e/ou 10 $\mu\text{l}$  de SAEsc. A eutanásia foi realizada após os tempos de exposição, onde foram retiradas as estruturas córtex, estriado, hipocampo, fígado, pulmão e rim para análise de cromatografia líquida de alta performance (CLAE), pelo método de dosagem de monoaminas e ensaio cometa para avaliar danos no DNA. Retirou-se o fêmur para extração da medula óssea, de forma a realizar a análise de mutagenicidade pelo ensaio de Micronúcleo (MN). Os resultados demonstram que o veneno de *T. serrulatus* apresenta maior liberação de dopamina nas primeiras horas. Entretanto, a atuação do SAEsc parece ser eficaz na neutralização em nível dopaminérgico em até 24h após o acidente. Por fim, nossos achados demonstram que o SAEsc avaliado, é capaz de neutralizar os

níveis dopaminérgicos após intenso aumento devido ao envenenamento no período de até 24h. Além disso, foi observado neutralização do veneno de *T. serrulatus* em nível molecular até 12h de ação após o envenenamento. Por outro lado, a partir de 24h após o envenenamento, no qual o reparo celular não se mantém eficiente, pode ocorrer danos mutagênicos tanto em animais tratados quanto não tratados. Sendo assim, os presentes resultados sugerem que o veneno permitiu agir sobre a modulação genômica do modelo experimental utilizado. Sobretudo, mais estudos devem ser realizados em relação as doses e quantidade de aplicações do SAEsc, além de procurar compreender melhor os mecanismos de ação dos soros.

**Palavras-chave:** *Tityus serrulatus*; Soro antiescorpiônico; dano do DNA; Micronúcleo; Dopamina; Neurotransmissor.

## ABSTRACT

The species *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922, has been standing out in Brazil for the serious accidents caused and its vast symptomatology developed by the variety of molecules that compose the venom. Among the main molecule, the  $\alpha$  and  $\beta$ -toxins are highlighted, which have action on the ion channels, such as permeable channels for  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cl}^-$ . When interacting with the different channels, venom toxins cause neurotransmitter release at high levels, such as dopamine, which is released mainly in the brain regions, causing depolarization of membranes. The only treatment recommended by the WHO is the administration of anti-corticosteroid sera - SAEsc. In 2017, our group showed for first time the venom of the *T. serrulatus* leading to protein damage and DNA molecules, where they can progress to dysfunctions, and complications in the cellular system. Knowing the effects caused by the venom of this species, this work aimed to evaluate the performance of one of the most used SAEsc in Brazil in genomic modulation and to verify its neutralizing action at the dopaminergic level. To achieve these objectives, 96 adult Swiss mice (18-22g with 28-35 days) were used, divided into three groups with 30 animals each: Group that received only venom, group that received only SAEsc and group that received venom + SAEsc. Each group was redivided into five subgroups containing six animals that were euthanized at different times 1h, 2h, 6h, 12h, and 24h. In addition, a control group with six animals received administration of phosphate-buffered saline (PBS) and was euthanized (0h time). In the different groups it was administered per animal subcutaneously 100  $\mu\text{L}$  corresponding to  $1/2\text{DL}_{50}$  of venom of *T. serrulatus*, and / or 10  $\mu\text{L}$  of SAEsc. Euthanasia was performed after exposure times and the structures cortex, striatum, hippocampus, liver, lung and kidney were removed for quantification the monoamines by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis and comet assay. The femur was removed for bone traction in order to carry out the mutagenicity analysis using the Micronucleus (MN) enhancer. The results show that *T. serrulatus* venom presents greater dopamine release in the first hours. However, the action of SAEsc seems to be effective in dopaminergic neutralization within 24 hours after the accident. Finally, our findings demonstrate that the SAEsc is assessed as being able to maintain a dopaminergic equilibrium after increased levels due to envenomation up to 24 hours. In addition to neutralizing the poison of *T. serrulatus* at a molecular level up to 12 hours after the poisoning. Except from 24 hours after the

accident, in which cell repair does not remain efficient, evolving to mutagenic damages in both treated and untreated individuals. Demonstrating that venom allowed to act on the genomic modulation of the individual. Above all, more studies should be carried out in relation to the doses and amount of SAEsc applications, besides seeking to understand even better the mechanisms of action of sera.

**Key words:** *Tityus serrulatus*; Antiscorpionic serum; DNA damage; Micronúcleo; Dopamine; Neurotransmitter.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Morfologia de <i>Tityus serrulatus</i> Lutz & Mello, 1922.....	18
<b>Figura 2:</b> Distribuição do escorpionismo no mundo. Em destaque as linhas nos trópicos.....	21
<b>Figura 3:</b> Fluxograma do desenho experimental, definindo a distribuição de grupos. ....	31
Fonte: Da autora, 2018. ....	31
<b>Figura 4:</b> Etapas experimentais do Ensaio Cometa, até a leitura em microscópio óptico.....	33
<b>Figura 5:</b> Classes de Danos obtidas pelo Teste Cometa, com coloração de <i>syber gold</i> . ....	34
<b>Figura 6:</b> Eritrócito policromático micronucleado em medula óssea de camundongos. ENC: Eritrócito Normocromático; EPC: Eritrócito Policromático; MN: micronúcleo...	35
<b>Figura 7:</b> <b>A</b> níveis de dopamina (DA) por proteína (ng/μg) detectado em células do córtex cerebral de camundongos; <b>B</b> níveis de dopamina por proteína (ng/μg) detectado em células do hipocampo de camundongos; <b>C</b> níveis de dopamina por proteína (ng/μg) detectado em células do estriado de camundongos. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão. ....	37
<b>Figura 8:</b> Representação dos níveis de dopamina por proteína (ng/μg) detectado em células hepáticas de camundongos. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão. ....	38
<b>Figura 9:</b> Representação dos níveis de dopamina por proteína (ng/μg) detectado em células renais de camundongos. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão. ....	38
<b>Figura 10:</b> Representação dos níveis de dopamina por proteína (ng/μg) detectado em células pulmonares de camundongos. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão. ....	39
<b>Figura 11:</b> <b>D</b> Representação da frequência (FD); <b>E</b> índice de danos (ID) na molécula de DNA de células do córtex de camundongos. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão. ....	40

<b>Figura 12: F</b> Representação da frequência (FD); <b>G</b> índice de danos (ID) na molécula de DNA de células do estriado de camundongos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....	41
<b>Figura 13: H</b> Representação da frequência (FD); <b>I</b> índice de danos (ID) na molécula de DNA de células do hipocampo de camundongos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....	42
<b>Figura 14: J</b> Representação da frequência (FD); <b>K</b> índice de danos (ID) na molécula de DNA de células hepáticas de camundongos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....	43
<b>Figura 15: L</b> Representação da frequência (FD); <b>M</b> índice de danos (ID) na molécula de DNA de células pulmonares de camundongos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....	44
<b>Figura 16: N</b> Representação da frequência (FD); <b>O</b> índice de danos (ID) na molécula de DNA de células renais de camundongos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação quanto à gravidade e dose recomendada de soro antiescorpiônico .....	26
<b>Tabela 2:</b> Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos (ENC) observados em amostras de medula óssea de camundongos Swiss fêmeas tratados com soro antiescorpiônico – SAEsc.....	46

## SUMÁRIO

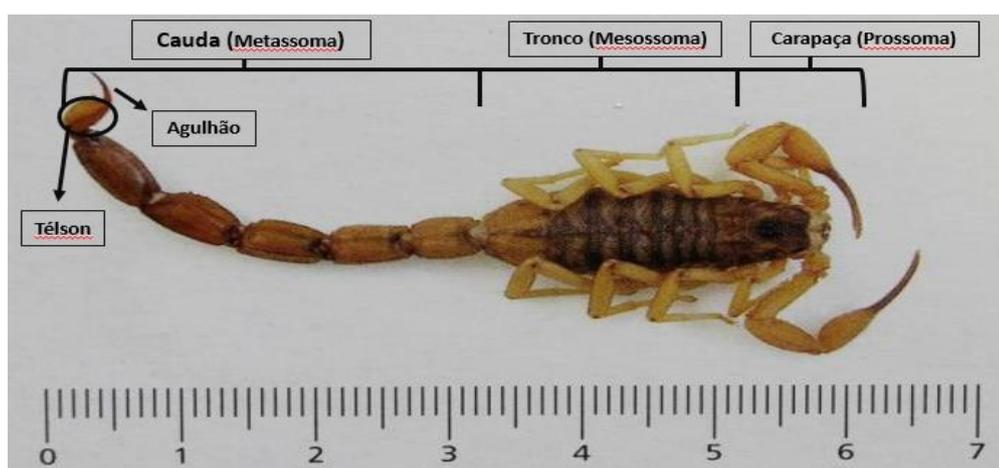
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 ESCORPIÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1.1 Espécie <i>Tityus serrulatus</i> Lutz & Mello, 1922 .....	19
1.1.2 Escorpionismo .....	20
1.1.3 Veneno .....	21
1.1.4 Sintomatologia .....	23
1.1.5 Soroterapia .....	24
1.1.6 Genotoxicidade e mutagenicidade .....	27
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2 VENENO</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3 DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA DETECÇÃO POR HPLC</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)</b> .....	<b>32</b>
<b>3.6 ENSAIO COMETA</b> .....	<b>32</b>
<b>3.7 TESTE DE MICRONÚCLEOS (MN)</b> .....	<b>34</b>
<b>3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICA</b> .....	<b>35</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2 ENSAIO COMETA</b> .....	<b>39</b>
<b>4.3 TESTE DE MICRONÚCLEOS (MN)</b> .....	<b>45</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>66</b>
<b>ANEXO A – CERTIFICADO DO CEUA</b> .....	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ESCORPIÃO

Os aracnídeos apresentam uma hábil capacidade de adaptação e por isso habitam a terra há milhares de anos. Os escorpiões, são um dos representantes encontrados no ambiente terrestre há mais de 400 milhões de anos, apresentando poucas alterações em sua morfologia, o que permitiu que se adaptassem nos mais diversos habitats terrestres, abrangendo florestas tropicais, equatoriais temperadas, savanas, cavernas e montanhas (Lourenço, 2001).

Este aracnídeo apresenta em sua estrutura morfológica (Figura 1) o prosoma, que abrange a região da carapaça, a qual contém um par de queléceras e um par de quelas (pinças) na sua terminação (ou pedipalpos). Seu abdômen é definido como opistossoma, que se divide em tronco e cauda mesossoma e metassoma, respectivamente. Ao final da cauda encontra-se o télson (segmento no qual ocorre a produção de veneno), e por fim encontra-se o agulhão, estrutura utilizada para inocular o veneno (Brazil, 2010). Seu conjunto corpóreo é composto por cerdas que atuam como órgãos sensoriais, responsáveis por detectar as vibrações, entre outras modificações em seu habitat (Marcussi et al., 2011).



**Figura 1:** Morfologia de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922.  
Fonte: Rochol, 2017, com adaptações do autor, 2018.

Estes animais, possuem uma estrutura especializada para inserir veneno em outro indivíduo quando em situações de ameaça. Devido a esse processo de injeção do veneno, através de uma estrutura inoculadora, são considerados animais peço-

nhentos. Isso acontece por meio de glândulas que se comunicam com ferrões ou agulhões, que irão permitir a passagem ativa do veneno (Lima, 2014).

Os escorpiões pertencem a classe Arachnida e ordem Scorpiones, no qual abrange cerca de 1.500 espécies. São encontradas no Brasil *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus* e *T. obscurus* (Reckziegel e Pinto, 2014) espécies estas que estão classificadas dentro de 16 a 19 famílias, dentre elas a família Buthida, que abrange na faixa de 550 espécies, destacando-se a espécie *Tityus serrulatus*, que se caracteriza pelo seu tronco escuro, apêndices e cauda amarelada, além de sua falsa cauda serrilhada. Esses indivíduos possuem hábitos noturnos, comumente encontrados em ambientes secos e de altas temperaturas, podendo ser encontrados sob pedras, entulhos, aglomerados de sujeira (lixo, serapilheira, troncos, resquícios de tijolos e madeira) normalmente emergindo após o pôr do sol (Rafizadeh et al., 2013; Nejati et al., 2014).

Os escorpiões não possuem hábitos migratórios e costumam apresentar um território restrito, cerca de alguns metros quadrados. Devido a ação antrópica, urbanização e o processo de modificação natural do ambiente, estes indivíduos podem vir a se dispersar, podendo assim colonizar novos ambientes, o que pode alterar consequentemente o padrão epidemiológico existente. Sobretudo, com a influência de tal processo antrópico que vem crescendo exacerbadamente, leva-se a um maior agravamento, este que tem se tornado negligenciado pela saúde pública (Brasil, 2018).

### **1.1.1 Espécie *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922**

Dentre as espécies de maior preocupação médica, decorrente da quantidade de casos registrados destaca-se o escorpião *T. serrulatus*, descrito por Lutz & Mello, no Brasil, em 1922. Desde então, é um dos principais responsáveis pela maior parte dos acidentes escorpiônicos no país. *T. serrulatus* apresentando ampla distribuição geográfica, sendo predominante nos estados de Minas Gerais, Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Goiás. Esta ampla distribuição justifica-se pela sua fácil adaptação ao meio urbano, além de sua reprodução partenogenética que se dá pelo desenvolvimento de novos indivíduos por meio de óvulos não fertilizados (Lourenço, 2008; Marcussi et al., 2011; Seiter e Stockmann, 2017).

Fatores como sua fácil adaptação em diferentes locais, suportando a extremos de temperatura ou alternância de climas, dificilmente são interferentes no bem-estar destes aracnídeos. Fatores como esses e sua forma de reprodução, levam à uma progressão no agravo de acidentes escorpiónicos (Marcussi et al., 2011).

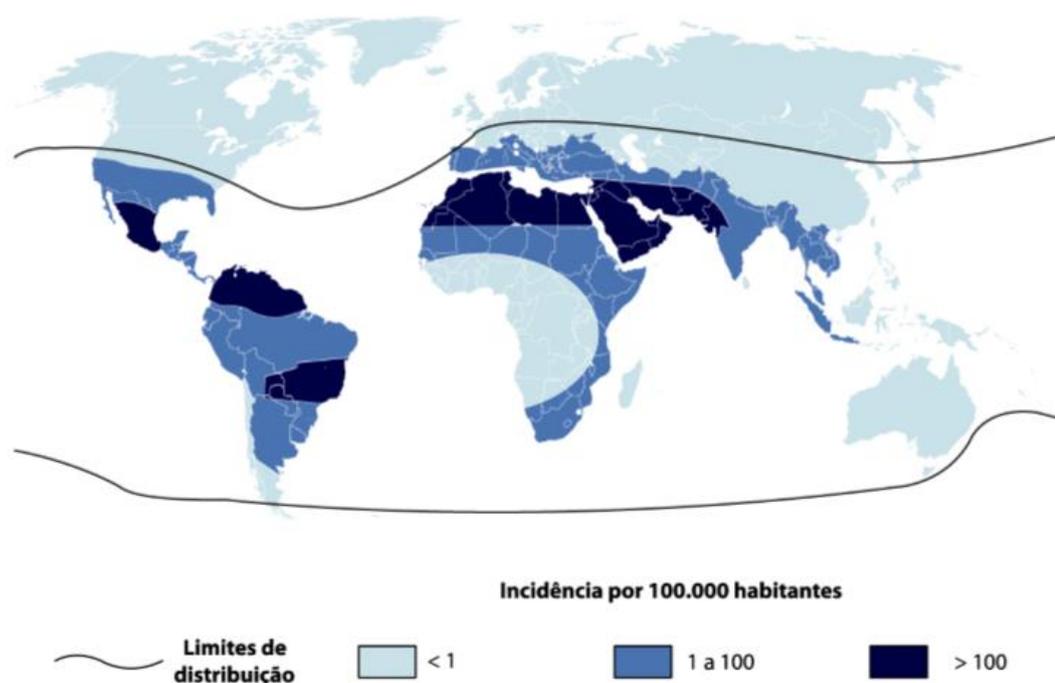
### **1.1.2 Escorpionismo**

O escorpionismo se caracteriza por um quadro clínico ocasionado após um episódio de acidente escorpiónico. Isso se deve à inoculação do veneno que é composto por uma infinidade de toxinas, que passam ativamente por meio do aguilhão (Ciruffo et al, 2012).

De acordo com os dados do Ministério da saúde (2018b), foram notificados no Brasil durante o ano de 2017 e início de 2018, cerca de 125.156 casos de acidentes por escorpionismo em todo território Brasileiro destacando-se as regiões nordeste e sudeste. Sendo que 1.257 casos evoluíram ao óbito entre os anos de 2000 a 2017, acometendo em sua maioria crianças em idosos (Brasil, 2018c).

Devido a fácil habitação, aspectos reprodutivos que facilitam sua proliferação e o fato de grande parte de casos não serem notificados, alguns dados epidemiológicos tem demonstrado que casos de escorpionismo no Brasil crescem continuamente, sendo que no ano de 2000 os registros eram de 12.552 casos, já em 2014 esses valores chegaram à 87.093, chegando em 2015 com 86.406, 2016 com 91.647 e por fim, aumentando ainda mais em 2017 como já descrito anteriormente (Brasil, 2018a).

O número de notificações nem sempre é fidedigno, devido à grande parte destes acidentes com aracnídeos acometerem populações que muitas vezes se encontram afastadas do atendimento público de saúde, pertencendo a locais de baixo nível econômico (Chippaux e Goyffon, 2008). Tal dificuldade do gerenciamento de serviços de saúde, leva a casos de acidentes não registrados em algumas regiões do Brasil e no mundo. Assim como algumas áreas da África e Ásia, onde existem populações consideradas de risco (Figura 2) (Chippaux e Goyffon, 2008).



**Figura 2:** Distribuição do escorpionismo no mundo. Em destaque as linhas nos trópicos.  
 Fonte: Chippaux e Goyffon, 2008; Lara, 2012.

No geral, grande parte dos registros de acidentes com aracnídeos no Brasil, cresceu devido à preocupação médica e científica em notificar boa parte desses casos. Sendo assim, em agosto de 2010, o agravo foi então incluído na Lista de Notificação Compulsória (LNC) do Brasil, publicada na Portaria Nº 2.472 de 31 de agosto de 2010 (ratificada na Portaria Nº 204, de 17 de fevereiro de 2016).

### 1.1.3 Veneno

Dentre as inúmeras características e hábitos que o define, o escorpião *T. serrulatus* é uma das espécies de maior relevância do sentido epidemiológico e médico, principalmente se tratando no Brasil. Isso se deve à composição do seu veneno e suas propriedades, que veem a desenvolver uma vasta sintomatologia (Brasil, 2018a).

A composição do veneno pode variar de acordo com os hábitos e habitats em que o animal está inserido, assim como a dieta que pode influenciar intimamente nas propriedades dessas toxinas e proteínas envolvidas. Tais aspectos podem ser modificados de acordo com as presas específicas que este aracnídeo vem se ali-

mentando, no qual normalmente restringe-se a baratas, grilos, entre outros insetos (Pucca et al., 2014).

Dentre os constituintes desse veneno encontram-se mais de 100.000 moléculas, incluindo inúmeros compostos, desde sais inorgânicos, nucleotídeos, polissacarídeos, proteínas, fosfolipases, peptídeos, e enzimas como metaloproteinasas e hialuronidasas (Reckziegel et al., 2014; Nencioni et al., 2018). O quadro clínico do acidente pode-se agravar devido à ação das neurotoxinas presentes no veneno e de todos estes compostos que a compõem (Pucca et al., 2015).

Inúmeras são as toxinas presentes na composição do veneno de *T. serrulatus*. Entretanto, nem todas possuem estudos que relatam sua estrutura e ação, sendo elas as toxinas TsI, TsII, TsIII, TsIV e TsV (Vaconcelos et al., 2005; Amaro et al., 2011). Estas toxinas possuem ação sobre a interação de canais iônicos, como os canais permeáveis ao Na<sup>+</sup>, ao K<sup>+</sup>, ao Ca<sup>2+</sup> e canais para Cl<sup>-</sup>, que são os principais responsáveis pela resposta sintomatológica do envenenamento (Ferreira Junior e Barravieira, 2002; Pucca et al., 2015). Ao interagir com estes canais, elas podem desempenhar diferentes funções, dependendo dos locais de interação e ligação destas. Tais canais podem vir a sofrer diferentes atividades eletrofisiológicas, desde uma lenta inativação a uma rápida ativação, podendo conseqüentemente ocasionar um atraso na transmissão de impulsos nervosos (Cologna et al., 2011; Pucca et al., 2015; Santos -da-Silva et al., 2017).

Quando ligadas a determinados sítios de ação de variados canais iônicos, interferem na contração, secreção, proliferação e/ou apoptose celular. Conseqüentemente, podem ser interferentes nos sinais elétricos, como os impulsos nervosos. Um exemplo é o canal para Ca<sup>2+</sup>, quando ativam canais permeáveis ao Cl, pode ocorrer ativação e influência das atividades de outros canais (Marcussi et al., 2011; Mendes, 2012). Os canais para Na<sup>+</sup>, possuem transmembranas, de forma que são seletivos a qualquer forma de permeação biológica. Sendo assim, importantes na geração e propagação de ação potencial de neurônios e células excitáveis, uma vez que ativados propagam tal ação ou quando bloqueados a impede. Entretanto, quando em excesso levam a liberações incontroláveis ou até mesmo perda de respostas neuronais (Cologna et al., 2009). Os canais de K<sup>+</sup> desempenham também uma ampla variedade de processos fisiológicos como contrações musculares, liberação de neurotransmissores e proliferação celular (Pongs, 2007).

Os efeitos sistêmicos do envenenamento são predominantemente mediados pela liberação de forma exagerada de neurotransmissores simpáticos e parassimpáticos que contribuem para o comprometimento central e periférico (Collaço et al., 2019). Neste sentido, a dopamina está diretamente relacionada com o veneno de *T. serrulatus* sendo capaz de alterar e/ou promover a inibição de captação de dopamina que é causada pela ação do veneno nos canais para  $\text{Na}^+$  (Dorce, et al., 1994). Tal catecolamina desempenha atividade no sistema nervoso cerebral realizando importante papel no controle do movimento, liberação de hormônios e comportamentos complexos (Dorce et al., 1994). Envolvida também nos estímulos da excreção renal de sódio, controle de liberação de noradrenalina em terminações simpáticas, liberação de acetilcolina e funções cognitivas. Entretanto, quando em excesso, pode levar a despolarização das membranas auxiliando em conjunto ao processo de desenvolvimento da sintomatologia (Estevinho; Fortunato, 2003).

#### **1.1.4 Sintomatologia**

O quadro clínico da vítima por acidente escorpiônico, pode variar de um grau leve, moderado à grave, sendo influenciado diretamente por diversos fatores. Dessa forma, a quantidade de veneno inoculada, número de picadas que ocorreram no momento do acidente, tempo até o processo de atendimento ao tratamento com soroterapia, status imunológico da vítima, idade, peso, assim como a espécie, ou até mesmo o tamanho do escorpião responsável pela inoculação determinam os sintomas do paciente (Cupo et al., 2003).

O período de ação do veneno pode permanecer até cerca de 12 h após o acidente, sendo mais efetiva sua ação, com manifestação de dores, nas suas duas primeiras horas, podendo permanecer os sintomas e alcançar um nível de maior agravo (Galvani et al., 2017). As manifestações podem manter-se apenas em um quadro local, apresentando dor imediata, sudorese, inchaço e vermelhidão no local. Permanecendo tais sintomas, pode existir uma evolução do quadro, levando a um quadro sistêmico, que se caracteriza pelo aumento de secreções, tremores, febre, espasmos musculares, hipertensão seguida de hipotensão arterial, aumento de mobilidade do trato gastrointestinal, arritmias cardíacas e respiratórias (Cupo et al., 2003; Mendes, 2012; Brasil, 2018c).

De acordo com Bahloul et al. (2013) e Maciel (2014), grande parte dos agravos que evoluem a um quadro sistêmico ou até mesmo óbito, são relacionados à

insuficiência cardíaca, edema pulmonar, entre outras complicações, como resultados da liberação maciça de catecolaminas. Em decorrência da interação dessas neurotoxinas com canais iônicos, pode-se ocorrer um descontrole dos níveis de eletrólitos do plasma, iniciando a diminuição dos níveis de sódio, potássio e cálcio, decorrente da perda excessiva de fluidos corporais, ocasionados por salivação e lacrimação devido ao envenenamento (Ismail; Abd-Elsalam, 1988, Andrade et al., 2004; Vasconcelos et al., 2004; Arantes et al., 2010). Toda essa ampla sintomatologia deve-se ainda à ação destas neurotoxinas sobre o sistema imunológico, que acaba levando a um desequilíbrio total do organismo do indivíduo, por conta de sua ampla distribuição nos órgãos, como rins, fígado, sangue, pulmão, coração e sistema nervoso. Tal processo tende a desencadear uma cascata de complicações e inflamação, recrutamento celular, entre outros desfechos ao longo da ação (Corzo; Espino-Solis, 2017; Galvani et al., 2017). Revelo et al. (1996), demonstraram pela primeira vez em termos proteicos, que quando administrado o veneno de *T. serrulatus* em camundongos, após um período máximo de 2h de inoculação, o veneno não se encontra mais presente no organismo do indivíduo. De acordo com os pesquisadores após tal processo de envenenamento permanecem no organismo apenas sequelas ocasionadas pela ação das toxinas.

### **1.1.5 Soroterapia**

Foi em 1909, pelo pesquisador Todd, que ocorreu a produção pela primeira vez do antiveneno escorpiônico. Desde então, a produção e o desenvolvimento de soros têm tido maior espaço, com protocolos de imunização, processamento de purificação de imunoglobulina, desenvolvimento de anticorpos, além de medidas que possam controlar e proteger o indivíduo em que se aplica, tornando assim o uso de soro antiescorpiônico (SAEsc), cada vez mais seguro para utilização em humanos e animais.

Por meio de inúmeros estudos realizados por Todd (1909), através da imunização em cavalos, constituiu-se a primeira produção de um soro antiescorpiônico com o veneno da espécie *Buthus quinquestriatus*, onde dele se extraiu o veneno por maceração do telson, que era centrifugado e utilizado apenas o sobrenadante para posteriores aplicações em cavalos. Dessa forma, esses animais, pelo seu grande

porte, produzem uma quantidade de anticorpos necessária diferente de qualquer outro animal em nível de anticorpos produzidos (Todd, 1909).

O tratamento estabelecido passou a ser realizado com a administração de antivenenos, sendo um dos procedimentos mais bem-sucedidos. Desta forma, a soterapia se faz uma prática recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Brasil, 2010a).

No Brasil três soros comerciais são utilizados em grande escala para o tratamento contra acidentes de animais peçonhentos. Estes soros são produzidos pelo Instituto Vital Brazil no Rio de Janeiro, Instituto Butantan em São Paulo e Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em Belo Horizonte, os quais encontram-se distribuídos pelas redes públicas de saúde (SUS) e onde devem ser disponibilizados gratuitamente no caso de acidentes por animais peçonhentos (Silva, 2012).

Os soros comerciais utilizados para o tratamento contra o escorpionismo são chamados de SAEsc, que são soros hiperimunes heterólogos, utilizados como antivenenos específicos para o envenenamento escorpiônico (Soros, 2012). Estes, possuem em sua composição imunoglobulinas específicas, produzidas através da imunização em equinos com venenos de escorpiões do gênero *Tityus* em questão (Brasil, 2018c).

O tratamento com soros caracteriza-se por um processo de imunização passiva, que se dá a partir do uso de imunoglobulinas igG, que podem ser obtidas através de uma digestão proteolítica. No primeiro momento, é feita a purificação do plasma, de forma que ocorra a diminuição de proteínas inespecíficas que ficam no soro. Após, realiza-se um fracionamento do anticorpo por meio de uma digestão enzimática, que pode ser feita por pepsina ou papaína. No caso da papaína, esta disponibiliza por meio do processo de digestão e através da clivagem de igG, alguns fragmentos denominados Fab, que localizam os sítios de ligação com o antígeno e a fração cristalizável. Quando obtido pela pepsina, ocorre a separação da fração e da região F(ab)<sub>2</sub>, para que assim tenha dois sítios de agregação para o antígeno (Queiroz, 2005; Silva, 2012; Boyer et al., 2013).

De forma a intensificar a resposta ao antígeno utilizam-se adjuvantes, como é o exemplo do adjuvante completo de Freund, que possibilita um depósito para o imunógeno o que intensifica a resposta imune. Sendo assim, no processo de coleta do sangue do equino, retira-se o soro que possui em sua composição imunoglobulinas capazes de se conectar ao antígeno. Quanto maior a quantidade de IgG especi-

ficas, o mais eficaz o suficiente para o processo de neutralização do envenenamento será o soro (Silva, 2012).

É necessário a eficiência desse tratamento e conseqüentemente rapidez e eficácia quanto ao atendimento específico. O uso de antivenenos requer cautela, alta qualidade e especificidade, respeitando para a sua administração os graus do acidente e situação da vítima. O processo de administração desses SAEsc, pode ter duração passiva ou de poucas semanas, variando de acordo com a dose administrada e conforme a gravidade do acidente (Tabela 1). A dose deve ser a mesma ra adultos e criança, de acordo com o peso, visto que é necessária uma total neutralização do veneno disponível no organismo (Brasil, 2010b).

**Tabela 1:** Classificação quanto à gravidade e dose recomendada de soro antiescorpionico

Manifestações e Tratamentos	Classificação (Avaliação Clínica Inicial)		
	Leve (*)	Moderado	Grave
Dor, sensação de ardor e formigamento no local	Presentes	Presentes	Presentes
Dor local intensa associada a uma ou mais manifestações como: vômitos, suor intenso, salivação intensa, agitação, arritmia cardíaca e respiração rápida e curta.	Ausentes	Presente	Presentes
Presença de uma ou mais manifestações como: vômitos frequentes, suor intenso, salivação, contratura dos músculos, inconsciência, insuficiência cardíaca, acúmulo de líquido no pulmão que leva à falta de ar e reação alérgica.	Ausentes	Ausentes	Presente
Soroterapia (quantidade de ampolas)	-	2 a 3	4 a 6**
Via de administração	Intravenosa		

\* Tempo de observação de crianças picadas: 6 a 12 horas.

\*\* Na maioria dos casos graves 4 ampolas são suficientes para o tratamento, visto que neutralizam o veneno circulante e mantêm concentrações elevadas de antiveneno circulante por pelo menos 24 horas após a administração da soroterapia.

Fonte: Soros (2012), com adaptações do autor (2018).

Tendo conhecimento da cascata de sintomas e vias relacionadas que envolvem a ação do veneno direta ou indiretamente, são produzidos os soros como forma de reduzir os sintomas, no entanto, ainda não se sabe até que ponto os SAEsc são

realmente eficazes e se não restam danos ou sequelas futuras ao organismo do indivíduo.

De acordo com a bula disponibilizada pela Anvisa (2012), são resultantes da ação do veneno de *T. serrulatus* sobre o sistema nervoso autônomo geralmente em crianças, hipo ou hipertemia, sudorese, náuseas seguidas de vômitos, tremores, prostração ou agitação, dor abdominal, arritmia ou insuficiência cardíaca, hiper e hipotensão, sialorréia, edema agudo pulmonar e choque.

Recentemente, o grupo de pesquisa de Biotecnologia do laboratório de Fisiopatologia experimental realizou um estudo em que foi possível verificar os danos efetuados ao organismo da vítima. Verificou-se pela primeira vez que o veneno de *T. serrulatus*, além de sua grande sintomatologia, provoca danos à molécula de DNA do indivíduo acidentado, isso ocorrendo já nas suas primeiras horas e mantendo-se até 12 horas, período máximo avaliado até o momento. Por meio deste estudo, os efeitos genotóxicos proporcionados pela composição do veneno foram descritos, mostrando que estes danos surgem através de inúmeras quebras no DNA. Quebras essas que podem vir a acumular danos, que quando não reparados evoluem a futuras mutações e ao desenvolvimento de inúmeras doenças neurodegenerativas. Podendo, influenciar diretamente no sistema celular, levando desde apoptoses até um descontrole de proliferação (Galvani et al., 2017).

### **1.1.6 Genotoxicidade e mutagenicidade**

As células do organismo permitem geneticamente levar consigo um histórico de acontecimentos passados, trazendo em sua carga genética danos ocasionados por diversas situações a qual fomos expostos em determinado momento da vida do indivíduo. Tal instabilidade genética, pode evoluir para diversas doenças, distúrbios neurodegenerativos ou até mesmo ao câncer, devido ao acúmulo de danos que levam a mutações e conseqüentemente a um desequilíbrio celular tanto proliferativo quanto apoptótico (Ribeiro, 2010; Hoshina et al., 2013; Galvani et al., 2017).

A ação dessas toxinas presentes no veneno de *T. serrulatus*, agem sobre determinadas vias e interagem com canais, levando à produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) entre outros mediadores imunitários, ocasionando danos à lipídios, proteínas e DNA (Radak et al., 2016; Galvani et al., 2017). A aplicação de testes afim de avaliar a genotoxicidade, incluindo o ensaio cometa e micro-

núcleo, são essenciais e bastante aplicados no caso de ensaios pré-clínicos, para o desenvolvimento de medicamentos ou mesmo controle de substâncias. Além de serem ferramentas úteis na avaliação em nível molecular, permitindo ao pesquisador mensurar de forma ainda mais concreta os índices e frequência de danos na molécula de DNA, quando induzidos por agentes genotóxicos (Collins et al., 2014). O ensaio cometa é uma técnica muito utilizada como intuito de detectar efeitos genotóxicos e/ou antigenotóxicos de determinadas substâncias, podendo avaliar quebras de fita simples e dupla, sítio álcali-lábeis e ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína (Singh, 1988; Fairbairn et al., 1995). Por outro lado, o ensaio do micronúcleo avalia presença de porções da cromatina intracitoplasmática, possibilidade de indução de quebras ou de perdas de cromossomos inteiros, caracterizando um efeito mutagênico, ou seja, maior possibilidade de desenvolver inúmeras doenças ou complicações em nosso material genético (Collins et al., 2014).

Observando os múltiplos efeitos gerados pelo veneno, gera-se questionamentos em relação à questão molecular, ressaltando-se a possibilidade de que além da vasta sintomatologia, o veneno, suas toxinas e os mediadores que são liberados durante o envenenamento, podem levar a danos em nível celular, afetando o conteúdo genético da vítima, além de que, não se sabe ao certo se os SAEsc neutralizam neste nível e se realmente o indivíduo não terá sequelas futuras e irreversíveis.

Dessa forma, considerando que não existem trabalhos que retratam a efetiva ação e possível neutralização dos SAEsc a nível molecular e dopaminérgico, tendo em vista o excesso de neurotransmissores e liberados, além dos seus efeitos no organismo quando em excesso. O presente trabalho vem com intuito de elucidar e avaliar se um dos SAEsc mais utilizados no Brasil, além de reverter a sintomatologia e o quadro clínico local ou sistêmico, apresentam ainda capacidade de reverter tal geração de danos ocasionadas durante o processo de envenenamento. Levando em conta que é imensamente necessário o reparo de danos moleculares em nosso organismo, como forma de prevenir complicações e doenças futuras, neurodegenerativas e até o mesmo o câncer.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atuação de um soro antiescorpiônico produzido no Brasil quanto a genotoxicidade, mutagenicidade e detecção dopaminérgica durante o envenenamento do escorpião *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 em diferentes órgãos de camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a capacidade do SAEsc em neutralizar os efeitos genotóxicos e mutagênicos provocados pelo veneno do escorpião *Tityus serrulatus*.
- Dosar os níveis de dopamina (DA) nas amostras a partir de 2h, através da análise de cromatografia líquida de alta performance (CLAE), pelo método de dosagem de monoaminas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Foram utilizados 96 camundongos *Swiss* machos ou fêmeas adultas (18-22g com 28-35 dias), visto que o gênero dos animais não influencia as análises, os animais foram provenientes do Centro de Experimentação da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Estes animais foram alojados em caixas de polietileno, com comida e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo de 12 horas claro-escuro (a luz é ligada às 7 h da manhã), com temperatura controlada de  $22\pm 1$  °C.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA), conforme o protocolo número 076/2015-1 e 021/2018-1, seguirá a Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008 do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo que será conduzido de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### 3.2 VENENO

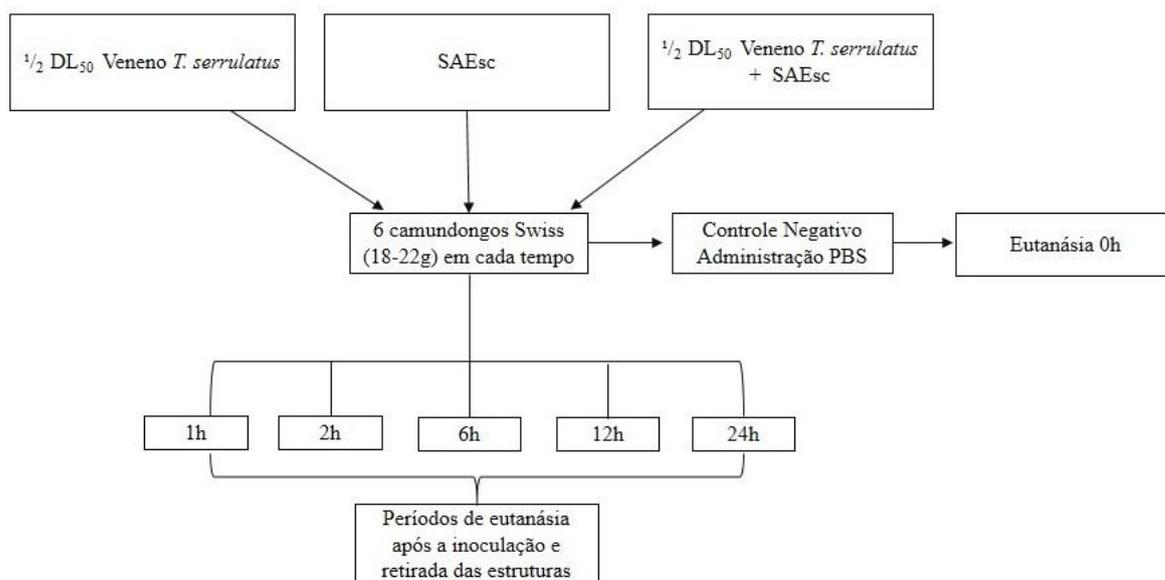
O veneno de escorpião da espécie *T. serrulatus* foi gentilmente cedido pela Dra. Consuelo Latorre da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), de Belo Horizonte – Brasil e o soro antiescorpiônicos –SAECs da FUNED foi gentilmente cedido pelo Dr. Carlos Chávez-Olórtegui da Universidade Federal de Minas Gerais, de Belo Horizonte – Brasil. O veneno é constituído por um *pool* de venenos coletados de escorpiões já adultos da espécie *T. serrulatus*, da região sudeste do Brasil, que foram devidamente liofilizadas e mantidas em temperatura de -20 °C.

#### 3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Para os demais ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, foram utilizadas os 96 camundongos *Swiss* adultos, distribuídos em 3 grandes grupos que foram divididos de acordo com o tratamento: um grupo recebeu somente o veneno, um grupo recebeu somente o tratamento com SAEsc e o terceiro grupo recebeu veneno + SAEsc. Cada grande grupo foi dividido em 5 subgrupos com 6 animais

cada. Os subgrupos correspondem aos tempos de eutanásia após a inoculação do tratamento. Os tempos foram de 1h, 2h, 6h, 12h e 24h. Um último grupo correspondeu ao controle negativo, composto por 6 camundongos que receberam PBS, e foram eutanasiados no tempo de 0h como pode ser visto na (figura 3). Dessa forma, foi realizada a administração por via subcutânea de 100 µl de veneno de *T. serrulatus* correspondente a 0,5 DL<sub>50</sub> seguido de 10 µl do SAEsc via intravenosa. A escolha dessas concentrações foram baseados no trabalho de Revelo (1996). Enquanto a 0,5 DL<sub>50</sub> foi estabelecida no trabalho de Galvani, et al. (2017).

Quanto as estruturas avaliada após a eutanásia feita por deslocamento cervical, foram elas córtex, estriado, hipocampo, pulmão, rim, fígado estes que foram utilizados para detecção de monoaminas por HPLC e ensaio cometa. Foi coletado também o fêmur de cada animal para a retirada da medula óssea, de forma a analisar mutagenicidade pelo teste de micronúcleo (MN).



**Figura 3:** Fluxograma do desenho experimental, definindo a distribuição de grupos.  
Fonte: Da autora, 2018.

### 3.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA DETECÇÃO POR HPLC

As amostras coletadas foram homogeneizadas pelo método Benedetto et al. (2014), com adaptações. Foram usados 400 µL de ácido perclórico 0,2 M. Após 20 cursos, o homogeneizado foi centrifugado (12.000 × g, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante resultante foi deixado no gelo por pelo menos 5 minutos até as análises. Utilizamos para detecção de monoaminas as amostras a partir de 2h.

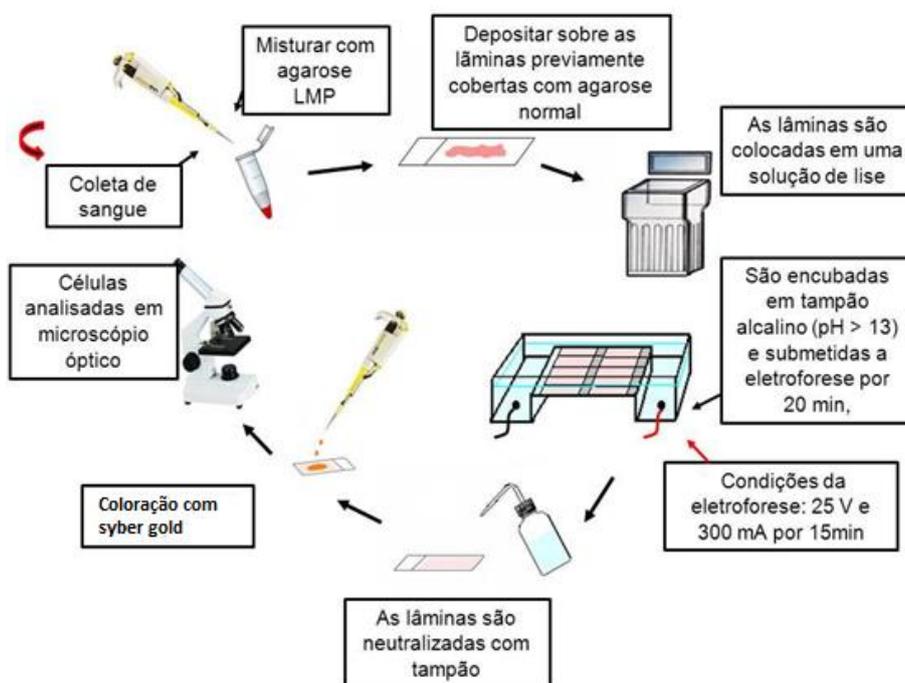
### 3.5 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

O método cromatográfico é proposto por Benedetto et al. (2014) com adaptações. A separação cromatográfica foi realizada com Coluna de fase reversa Ascentis® C18 (250 mm x 2,1 mm x 5 µm; Supelco®, USA), e sistema cromatográfico composto por uma bomba de distribuição da fase móvel LC-20AT acoplada a um autosampler SIL-20AHT, e um detector de fluorescência RF-20A; Shimadzu (Kyoto, Japan), o software para aquisição de dados em cromatografia foi LCSolution. As amostras tiveram volume de injeção de 20 µL, com temperatura de análise de 35 °C. A fluxo de bombeamento da fase móvel foi de 0,3 mL/min. A detecção por fluorescência, monitorados nos comprimentos de onda de excitação em 279 nm e de emissão 320 nm. O perfil da fase móvel foi isocrático: tampão acetato (pH 3,5, ácido acético 12 mM:0,26 mM EDTA, (50:50, v/v)) e metanol (86:14, v/v). Os picos foram identificados e quantificados por comparação do seu tempo de retenção na solução da amostra com a da solução padrão do analito (DA, 5-HT, NE), por meio de curva de calibração ( $r^2 \geq 0,99$ ).

### 3.6 ENSAIO COMETA

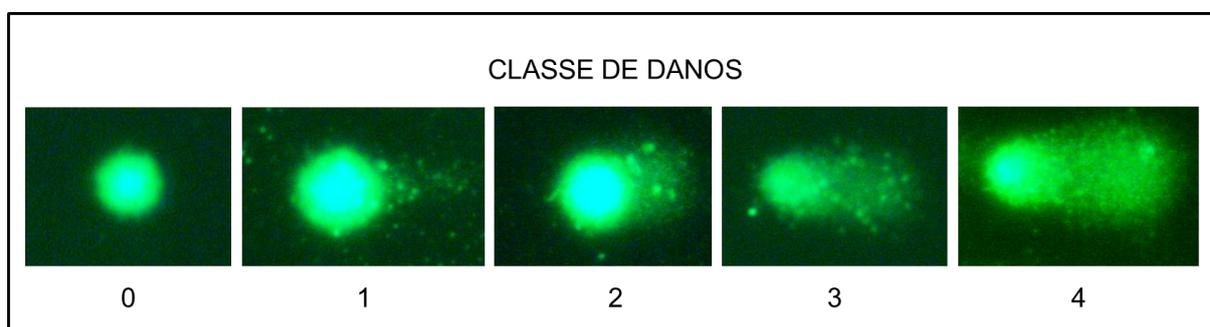
O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). As amostras de córtex, hipocampo, estriado, fígado, rim e pulmão, foram dissecadas e imersas em tampão fosfato (PBS) refrigerado. Em seguida foram individualmente homogeneizadas com o auxílio de uma seringa, através do movimento de “vai e vem”, a fim de obter uma suspensão celular.

As células obtidas da dissociação de tecidos (alíquotas de 25  $\mu\text{L}$ ) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0,75%, w/v, 95  $\mu\text{L}$  ou 75  $\mu\text{L}$ , respectivamente) e a mistura adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente cinco minutos a 4 °C para solidificação. Logo após as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4 °C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 2 semanas. Após este período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1m M EDTA, pH>13) por 30 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 25v e 300mA por 20 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com 20  $\mu\text{l}$  de solução *syber gold* (Invitrogen, EUA) para posterior análise em microscópio de fluorescência com aumento de 400x. (Figura 4).



**Figura 4:** Etapas experimentais do Ensaio Cometa, até a leitura em microscópio óptico. Fonte: Damiani, 2010, com adaptações do autor 2018.

Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada poço da lâmina, representando duplicatas). Tais células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação 0 para ausência de cauda, até 4 para o comprimento máximo de cauda (Collins et al., 1997). Desta forma, teve-se um Índice de Danos (ID) para cada animal variando de zero ( $100 \times 0 = 0$ ; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 ( $100 \times 4 = 400$ ; 100 células observadas com dano máximo). Calculou-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda. As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideram que o escore visual de cometas é um método de avaliação bem validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al., 1997). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas serão codificadas para análise às cegas (Figura 5).

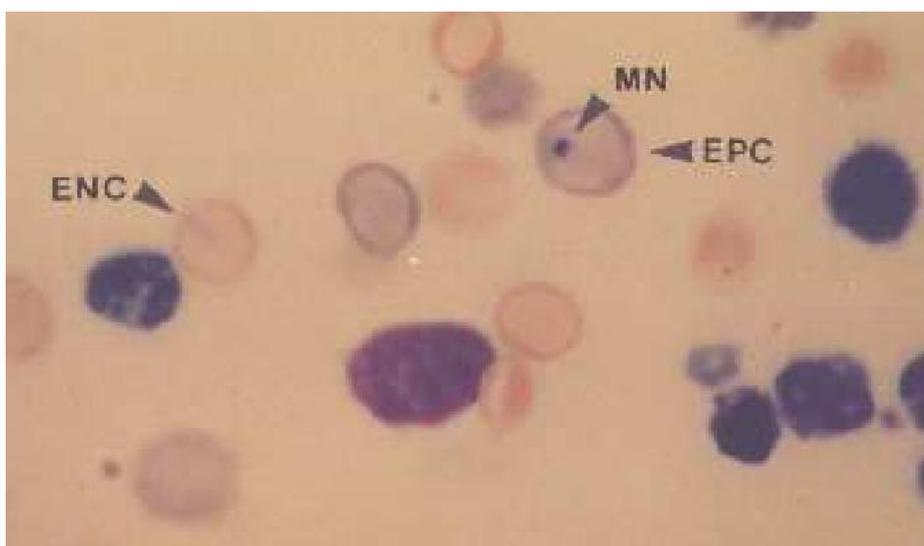


**Figura 5:** Classes de Danos obtidas pelo Teste Cometa, com coloração de *syber gold*.  
Fonte: da autora, 2019.

### 3.7 TESTE DE MICRONÚCLEOS (MN)

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Mavournin et al., 1990; Krishna e Hayashi, 2000). Após a eutanásia dos animais, a medula óssea foi extraída a partir dos dois fêmures e um esfregaço foi preparado diretamente na lâmina com uma gota de soro bovino fetal. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, secas e codificadas para análises às cegas. Como uma medida de toxicidade na medula óssea, a relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) foi analisada em 200 eritrócitos/animal. A incidência de micronúcleos (MN) foi observa-

da em 2000 EPCs e ENC's para cada animal (ou seja, 1000 a partir de cada uma das duas lâminas preparadas em duplicata), usando microscópio óptico de luz branca com ampliação de 1000x. O número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) individual foi utilizado como unidade experimental (Figura 6).



**Figura 6:** Eritrócito policromático micronucleado em medula óssea de camundongos. ENC: Eritrócito Normocromático; EPC: Eritrócito Policromático; MN: micronúcleo.  
Fonte: Angeloni, 2010.

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. A normalidade das variáveis foi avaliada utilizando o teste de Bartlett's.

Para comparar a ação dos soros em diferentes tempos e entre si, foi utilizada análise de variância ANOVA de duas vias, seguido pelo *post hoc* de Bonferroni.

Para as análises dos resultados do teste de micronúcleo, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn's.

As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

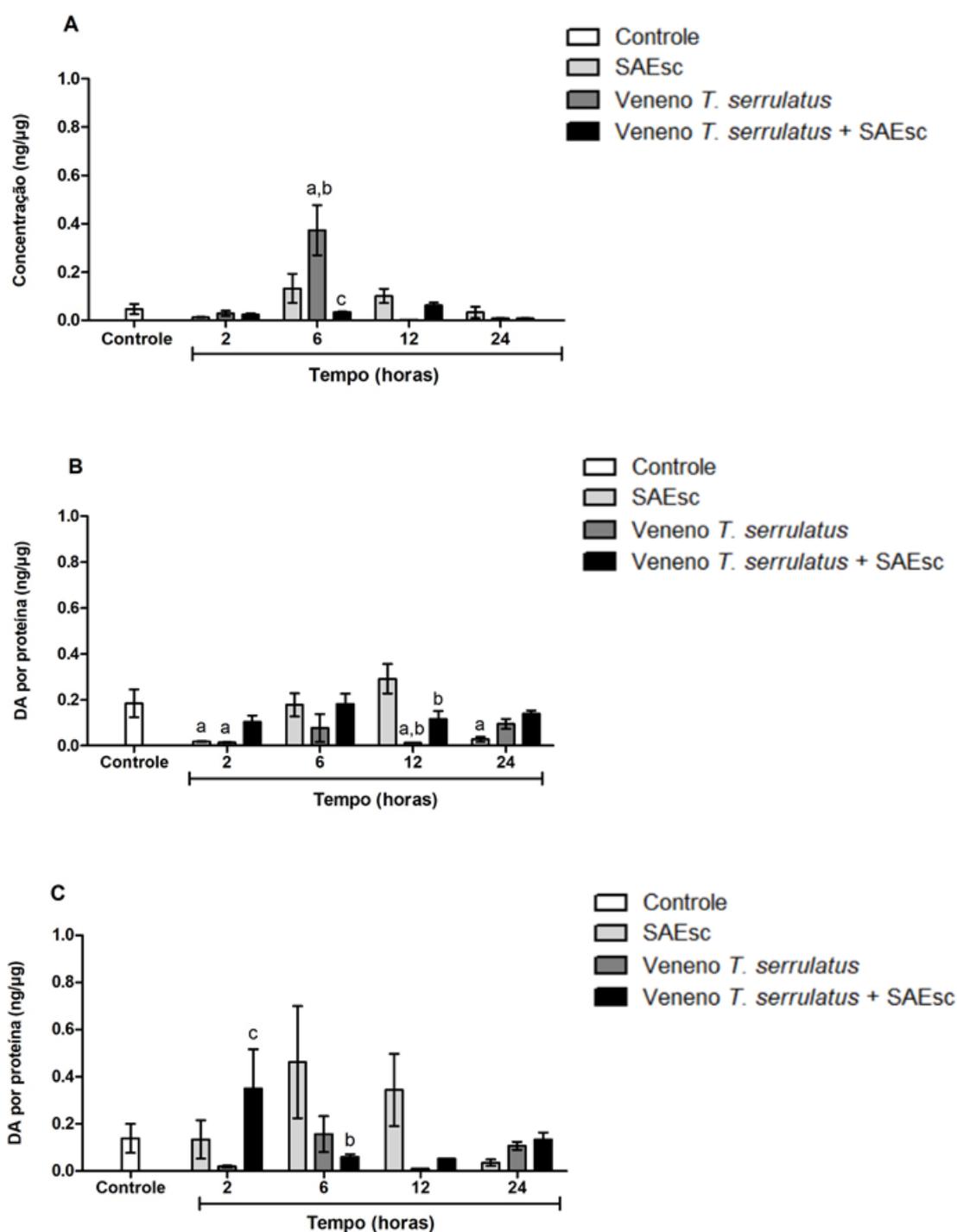
## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

As figuras 7A, B e C demonstram os níveis de dopamina (DA) que foram detectados e quantificados pelo método cromatográfico nas estruturas cerebrais de camundongos submetidos ao envenenamento pelo veneno de *T. serrulatus* e tratados com o SAEsc. Dessa forma, pode-se observar na figura 7A, representa os níveis de DA por proteína (ng/ $\mu$ g) detectados em células do córtex. Foram detectados baixos níveis de DA em todos períodos analisados e em todos os tratamentos, exceto no tempo de 6h. O grupo em que administrou-se somente veneno *T. serrulatus*, apresentou níveis elevados diferindo do controle e do grupo SAEsc. No entanto, o grupo que foi tratado pelo SAEsc reverteu este quadro e obteve diferença significativa em relação ao grupo que sofreu apenas envenenado.

Observou-se nos tempos de 2h e 12h, baixos níveis de DA nas células do hipocampo (figura 7, B) para os grupos que receberam veneno ou somente SAEsc.. Quanto aos animais que foram submetidos somente ao tratamento com soro SAEsc, grupo veneno + SAEsc estes quadros se reverteu.

Em relação as células do estriado (figura 7, C), os níveis de DA demonstram-se baixos quando comparados ao controle, diferindo apenas o grupo tratado dos animais envenenados em 2h, e do grupo SAEsc em 6h.



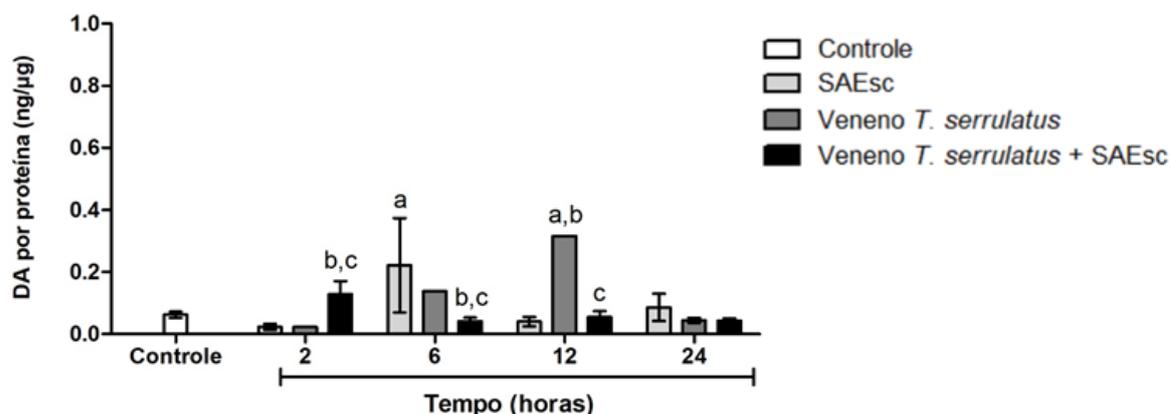
**Figura 7:** **A** níveis de dopamina (DA) por proteína (ng/μg) detectado em células do córtex cerebral de camundongos; **B** níveis de dopamina por proteína (ng/μg) detectado em células do hipocampo de camundongos; **C** níveis de dopamina por proteína (ng/μg) detectado em células do estriado de camundongos. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

**a** diferença significativa em relação ao controle, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni);

**b** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente ao SAEsc, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni);

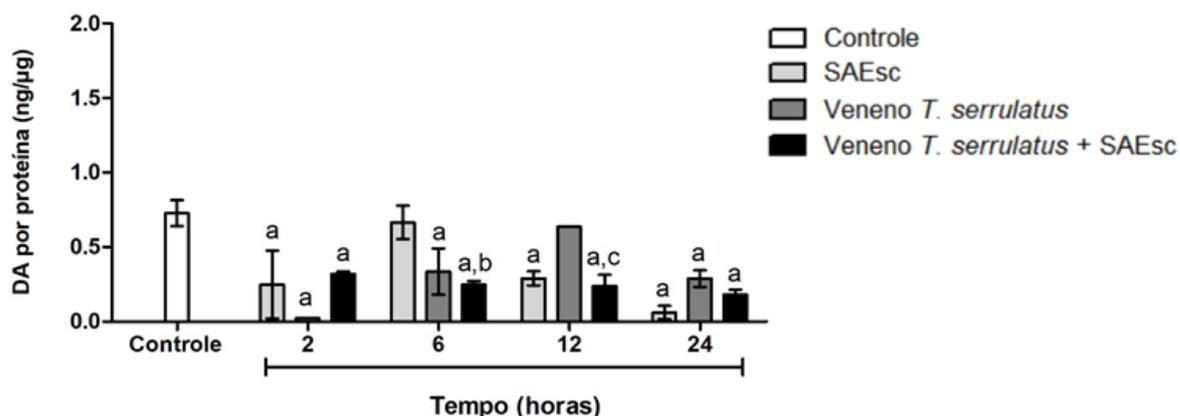
**c** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente a veneno *T. serrulatus*, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni).

Nas células hepáticas (figura 8), foram detectados níveis altos de DA no grupo SAEsc em 6h e no grupo de animais envenenados em 12h após administração, se diferenciando do controle. No entanto, no grupo tratado (veneno + SAEsc) esse quadro foi revertido.



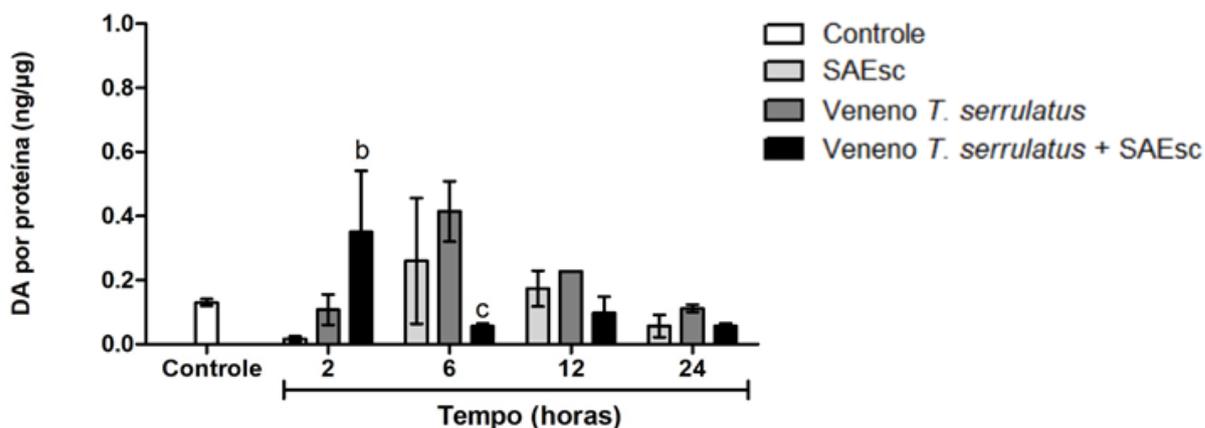
**Figura 8:** Representação dos níveis de dopamina por proteína (ng/μg) detectado em células hepáticas de camundongos. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.  
**a** diferença significativa em relação ao controle, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni);  
**b** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente ao SAEsc, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni);  
**c** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente a veneno *T. serrulatus*, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni).

Os níveis de DA em células renais (figura 9) foram baixos, distinguindo do controle em todos tempos e grupos avaliados, exceto no grupo que recebeu somente SAEsc em 6h e no grupo que recebeu veneno em 12h.



**Figura 9:** Representação dos níveis de dopamina por proteína (ng/μg) detectado em células renais de camundongos. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.  
**a** diferença significativa em relação ao controle, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni);  
**b** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente ao SAEsc, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni);  
**c** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente a veneno *T. serrulatus*, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni).

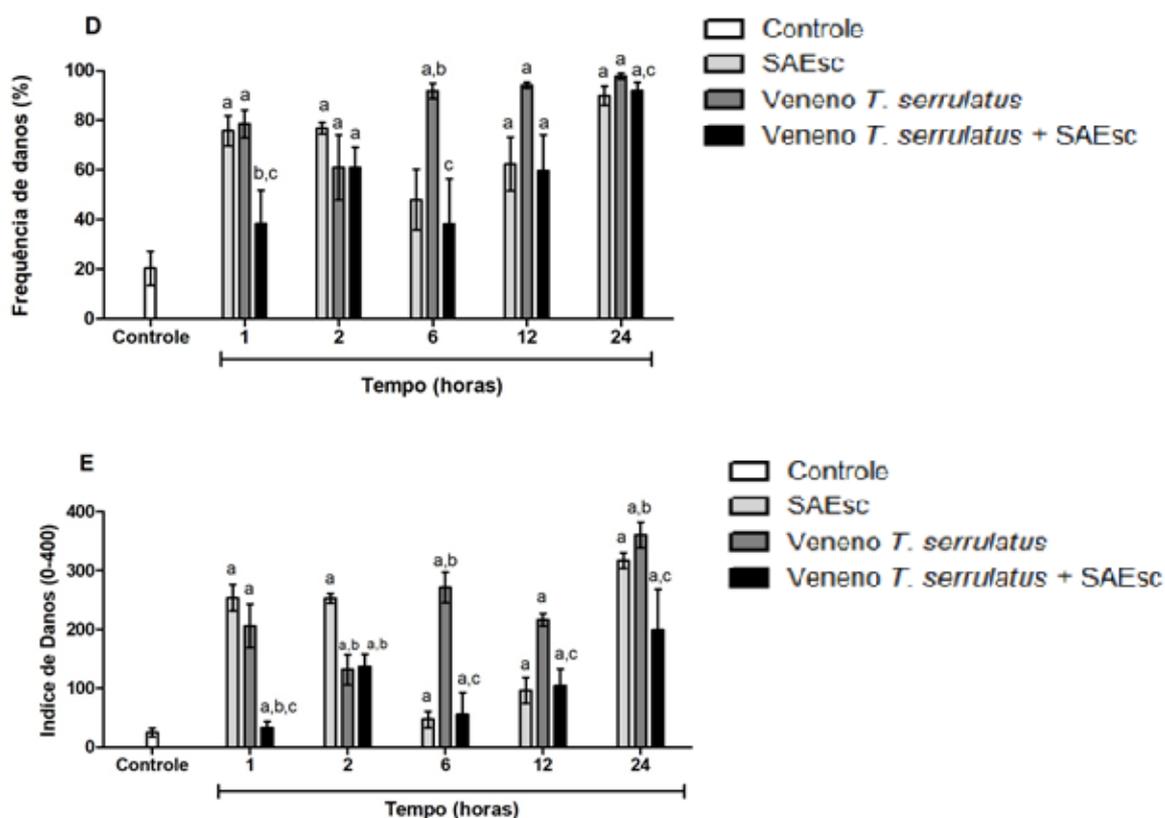
Níveis de DA em células pulmonares (figura 10) demonstraram-se normais, exceto em 2h no grupo veneno com tratamento de SAEsc, em que teve um aumento no nível . de DA, mas sendo revertido em 6h.



**Figura 10:** Representação dos níveis de dopamina por proteína (ng/μg) detectado em células pulmonares de camundongos. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão. **b** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente ao SAEsc, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni); **c** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente a veneno *T. serrulatus*, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni).

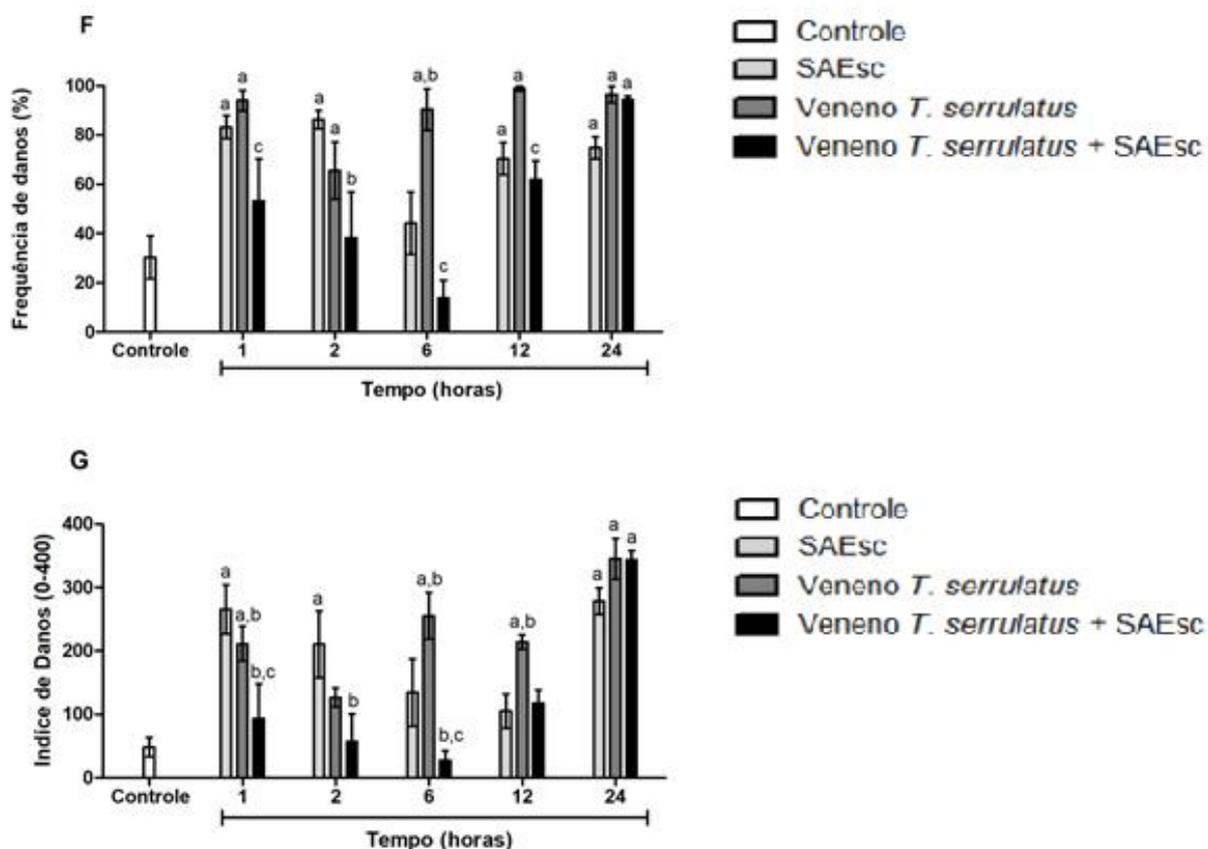
## 4.2 ENSAIO COMETA

De acordo a figura 11, ao analisar o DNA das células do córtex, viu-se um aumento significativo na frequência e no índice de dano praticamente em todos os tempos e grupos quando comparado ao controle, inclusive no grupo em que foi administrado somente SAEsc. A única exceção foram na frequência de dano, nos tempos de 1h e 6h no grupo tratamento veneno + SAEsc (figura 11, D). O grupo tratado ainda apresentou capacidade de neutralização quando comparado ao grupo veneno no parâmetro de ID (figura 11, E), em todos os períodos exceto em 2h, onde se diferiu assim como o grupo veneno do grupo SAEsc.



**Figura 11:** **D** Representação da frequência (FD); **E** índice de danos (ID) na molécula de DNA de células do córtex de camundongos. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. **a** diferença significativa em relação ao controle, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni); **b** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente ao SAEsc, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni); **c** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente a veneno *T. serrulatus*, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni).

Danos na molécula de DNA foram também apresentados nas células do estriado (figura 12) de camundongos submetidos ao envenenamento, se diferenciando do controle em todos períodos e parâmetros avaliados, exceto em 2h no parâmetro de ID (figura 12, G). O grupo tratado com SAEsc após o envenenamento, parece ter neutralizado a ação até 12h de ação do veneno. Os animais submetidos apenas ao SAEsc foram também diferentes do controle em FD (figura 12, G), exceto em 6h e em ID (figura 12, F) não se diferenciou em 6h e 12h de ação.

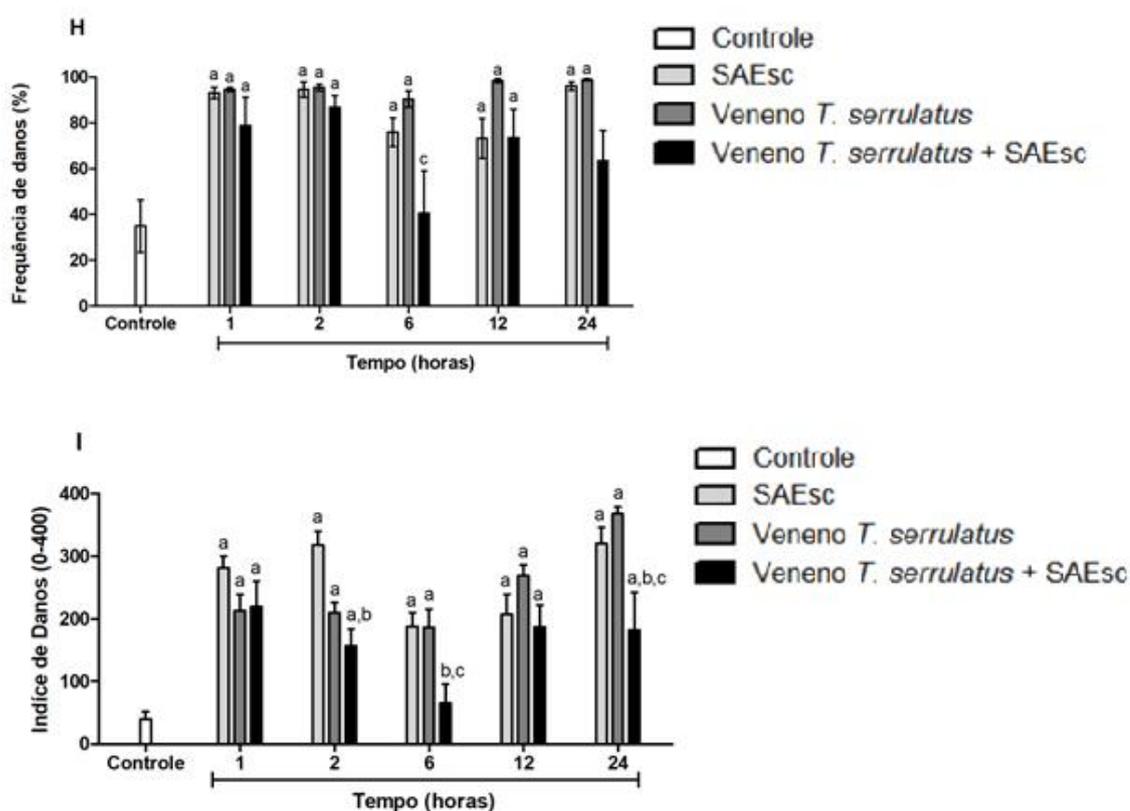


**Figura 12: F** Representação da frequência (FD); **G** índice de danos (ID) na molécula de DNA de células do estriado de camundongos. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

**a** diferença significativa em relação ao controle, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni);  
**b** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente ao SAEsc, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni);  
**c** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente a veneno *T. serrulatus*, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni).

Nas moléculas de DNA em células do hipocampo também ocorreu um aumento significativo na frequência e índice de dano em relação ao controle quando comparado com o grupo de animais envenenados e os submetidos somente ao SAEsc (figura 13). Quanto ao grupo de animais tratados com SAEsc, estes reverteram o aumento da FD em 6h, no entanto não chegaram no nível do controle estes diferiram do controle em FD em todos os tempos exceto 6h e 24h (figura 13, H).

No parâmetro de ID (figura 13, I), o grupo tratado com SAEsc foi diferente do controle em 1h, 2h, 12h e 24h. Obtivemos ainda diferenças em relação ao grupo submetido somente ao SAEsc em 2h, 6h e 24h e do grupo veneno em 6h e 24h.

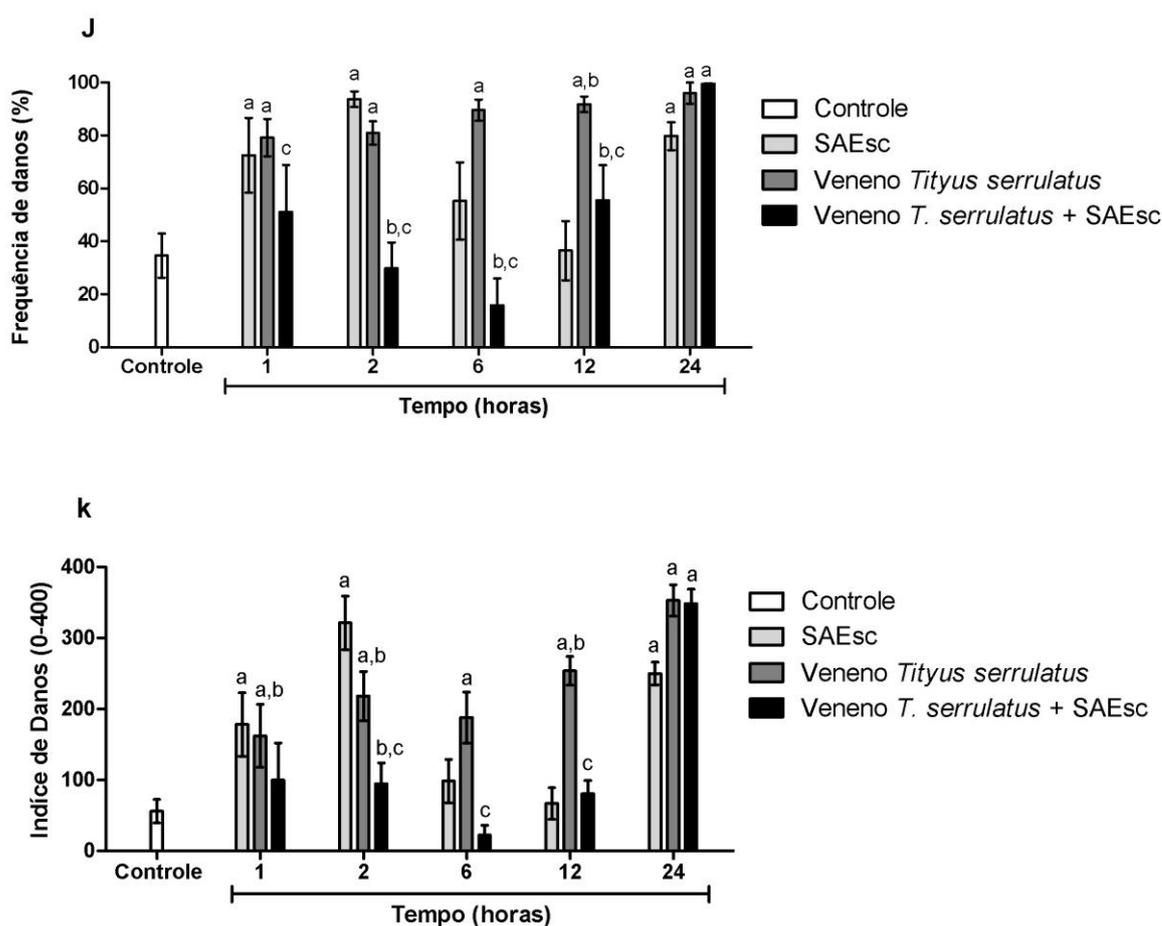


**Figura 13:** H Representação da frequência (FD); I índice de danos (ID) na molécula de DNA de células do hipocampo de camundongos. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. **a** diferença significativa em relação ao controle, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni); **b** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente ao SAEsc, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni); **c** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente a veneno *T. serrulatus*, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni).

Ao avaliar as células hepáticas (figura 14) de camundongos foi possível verificar um aumento significativo no índice e frequência de dano quando comparasse o grupo SAEsc com o grupo controle nos tempos de 1h, 2h e 24h.. Já o grupo veneno teve um aumento significativo quando comparado ao grupo controle controle em todos os períodos e parâmetros analisados..

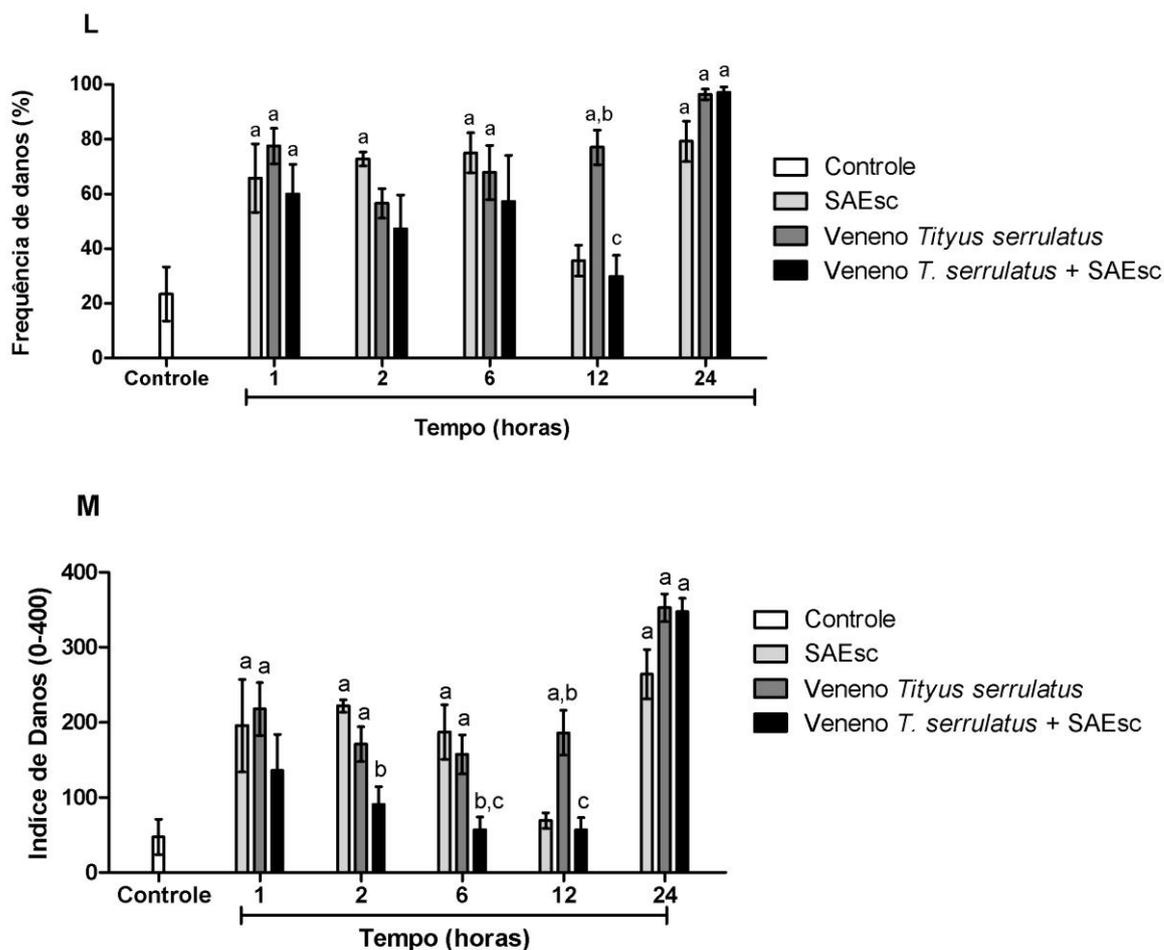
Ao comparar os efeitos do tratamento com SAEsc, nos animais envenenados foi verificado que este reverteu o aumento no índice e na frequência de danos em todos os tempos, a única exceção foi no tempo de 24h, que apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Este mesmo grupo demonstrou diferença significativa também com o grupo somente SAEsc em 2h, 6h e 12h em FD (figura 14, J) em ID (figura 14, K) somente em 2h. Apresentando ainda,

diferenças estatísticas em relação ao grupo envenenado nos tempos de 1h, 2h, 6h e 12h em FD (figura 14, J), enquanto em ID (figura 14, K).



**Figura 14: J** Representação da frequência (FD); **K** índice de danos (ID) na molécula de DNA de células hepáticas de camundongos. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. **a** diferença significativa em relação ao controle, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni); **b** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente ao SAEsc, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni); **c** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente a veneno *T. serrulatus*, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni).

Quando avaliou-se as células pulmonares (figura 15) de camundongos, os resultados demonstram que o grupo de animais envenenados teve um aumento no ID e FD, diferindo-se do controle em 1h, 6h, 12h e 24h quanto a FD (figura 15, L), e em todos os tempos quanto ao ID (figura 15, M). O grupo SAEsc também teve um aumento de ID e FD em relação ao controle no em todos os períodos, exceto em 12h nos parâmetros avaliados. Por sua vez, o grupo de animais envenenados que foram tratados com SAEsc diferiram do grupo controle apenas nos tempos de 1h e 24h em FD (figura 15, L) e somente em 24h no ID (figura 15, M).

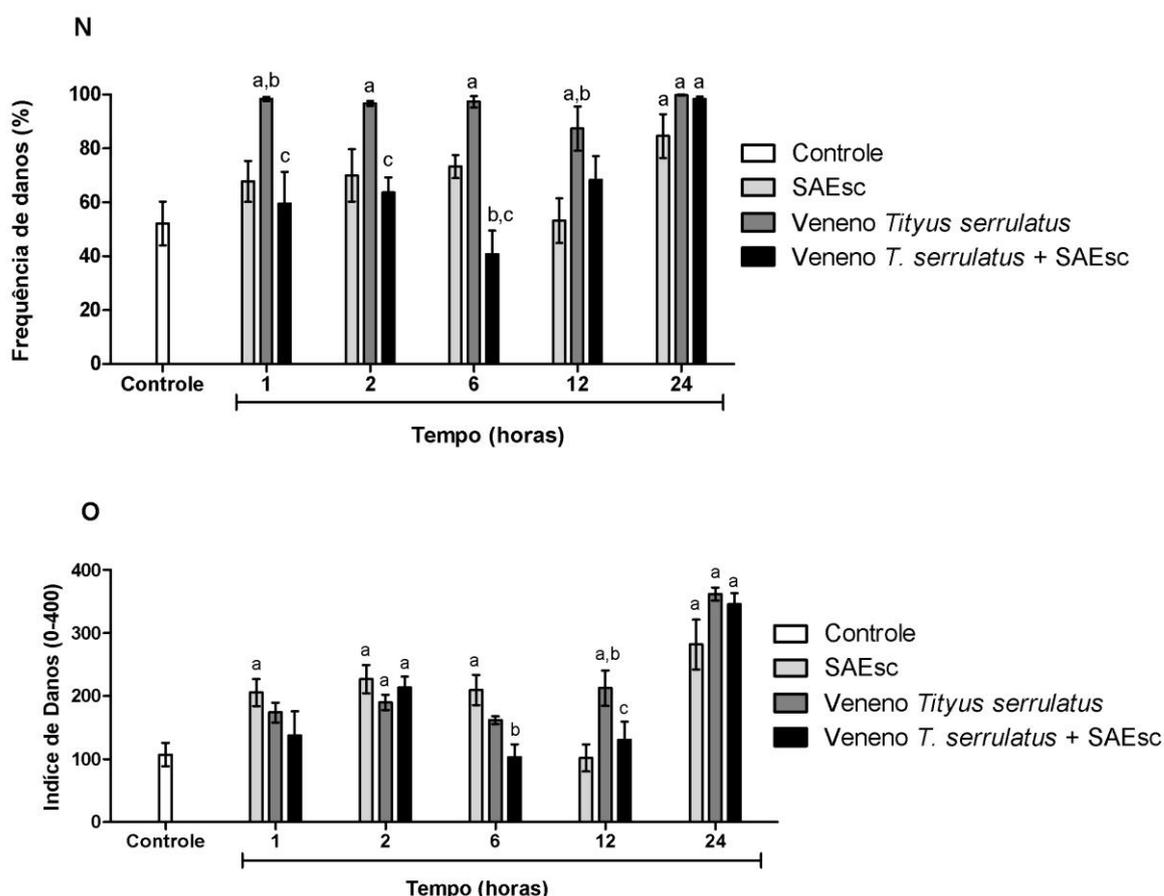


**Figura 15:** **L** Representação da frequência (FD); **M** índice de danos (ID) na molécula de DNA de células pulmonares de camundongos. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. **a** diferença significativa em relação ao controle, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni); **b** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente ao SAEsc, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni); **c** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente a veneno *T. serrulatus*, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni).

Ao avaliar as células renais (figura 16), nossos resultados apresentaram que o grupo veneno teve um aumento significativo quando comparado do grupo controle em todos os períodos avaliados em FD (figura 16, N), além de diferir com o SAEsc em 1h e 12h. Em ID (figura 16, O) se diferiu do grupo controle em 2h, 12h e 24h, diferindo ainda do SAEsc em 12h. Já o grupo SAEsc quando comparado com controle teve um aumento significativo somente em 24h em FD (figura 16, N) e em todos os períodos exceto 12h em ID (figura 16, O).

Quanto ao grupo tratamento (veneno + SAEsc) este reverteu o quadro de frequência danos em todos os tempos, exceto em 24h que apresentou diferença significativa em relação ao controle. (figura 16, N), sendo diferente ainda do grupo

veneno em 1h, 2h e 6h e do grupo SAEsc em 6h. No parâmetro de ID (figura 16, O), o tratamento neutralizou os danos em até 12h. Apresentou diferença significativa nestes períodos quando comparado ao grupo controle.



**Figura 16:** **N** Representação da frequência (FD); **O** índice de danos (ID) na molécula de DNA de células renais de camundongos. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. **a** diferença significativa em relação ao controle, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni); **b** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente ao SAEsc, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni); **c** diferença significativa em relação ao grupo submetido somente a veneno *T. serrulatus*, ( $p < 0,05$ , ANOVA 2 vias, pós teste de Bonferroni).

#### 4.3 TESTE DE MICRONÚCLEOS (MN)

A avaliação de mutagenicidade ocorreu por meio da aplicação do teste de micronúcleo na médula óssea de camundongos, no qual teve o intuito de avaliar se o tratamento com a soroterapia por SAEsc é capaz de reverter os efeitos mutagênicos induzidos pelo envenenamento escorpionico.

A tabela 2, apresenta os resultados encontrados no teste de micronúcleos, demonstrando que após 24 horas, tanto o veneno, como o SAEsc e veneno+SAEsc não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), em relação a proporção de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) indicando que neste período não há toxicidade e nem mutagênicidade. Sobretudo, tanto o grupo envenenado sem tratamento, quanto o que recebeu tratamento com SAEsc, estes apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em 24h, quando comparado a animais saudáveis. Nesse sentido, houveram danos mutagênicos provocados pelo envenenamento por *T. serrulatus*, mesmo sobre ação terapêutica com SAEsc.

**Tabela 2:** Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos (ENC) observados em amostras de medula óssea de camundongos Swiss fêmeas tratados com soro antiescorpionico – SAEsc.

Tratamento	EPCMn	EPC/ENC
SAEsc 24h	0,40 ± 0,55	0,56 ± 0,05
Veneno <i>T.serrulatus</i> 24h	5,60 ± 2,70*	0,55 ± 0,02
Veneno <i>T.serrulatus</i> + SAEsc 24h	4,67 ± 1,63*	0,59 ± 0,04

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão, sendo \*Diferença significativa em relação ao SAEsc 24h, ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Walis).

## 5 DISCUSSÃO

Dentro do campo da toxiconologia, embora sejam numerosos os estudos em prol do conhecimento e detalhamento dos mecanismos do veneno do escorpião *T. serrulatus*. Pouco se conhece sobre suas respostas de ação em conjunto com os soros antiescorpiônicos – SAEsc, tão pouco sua ação em nível molecular e interação dopaminérgica. Uma vez que este é o primeiro trabalho que visou avaliar tal interação com o SAEsc, atualmente considerado o único método preconizado pela OMS para neutralização do envenenamento e sintomatologia por ele desenvolvida (Brasil, 2010b). Não podendo ignorar o fato das diversas terapias também existentes, que podem ser utilizadas em conjunto de acordo com o quadro do acidente, como: suporte inotrópico, vasodilatadores, aplicação de tratamentos intensivos com insulina, L-carnitina e a imunoterapia sendo o único tratamento que age diretamente nas complicações, tornando-se preconizada pelos órgãos de saúde e atualmente a mais recomendada (Karnad, 2009; El-Asheer, et al., 2019).

São inúmeros os mecanismos em que atua o veneno de *T. serrulatus*, podemos considerar que alguns estudos comprovam a diferente interação de suas toxinas com canais iônicos. Devido a infinidade de neurotoxinas, proteínas e enzimas, que podem desenvolver respostas distintas de acordo com o local no qual venham a se ligar dentre os canais. A exemplo os canais para sódio ( $\text{Na}^+$ ), são importantes constituintes do mecanismo de neurotransmissão, estando envolvidos na geração de potenciais de ação de neurônios (Mendes, 2012). Isso leva a inúmeras alterações, que podem vir a ser desenvolvidas devido ao desequilíbrio das atividades excitatórias e inibitórias no cérebro, caracterizadas pela liberação de neurotransmissores cerebrais como glutamato, glicina, GABA e DA (Nencioni et al., 2009, Ossanai et al., 2012; Santos-da-Silva et al., 2017). As interações podem se diferenciar, conforme a dose e condições adversas do veneno, levando a modulações distintas, e maior ou menor liberação de neurotransmissores (Bicalho et al., 2002; Vasconcelo, 2006).

Uma vez que ocorra grande liberação de neurotransmissores, eles irão se propagar por toda a fenda sináptica, possibilitando interagir com autorreceptores da membrana pré-sináptica, interagindo com receptores pós-sinápticos, que podem gerar potenciais inibitórios ou até mesmo excitatórios (Mendes, 2012). O mecanismo descrito corrobora, com os nossos resultados, em que dentre as estruturas avaliadas algumas não obtiveram grande liberação de DA quando envenenados ou com ne-

nhum tipo de tratamento, como mostram os gráficos (7B;9) onde células hipocam-pais e renais, não tiveram maior detecção de DA quando comparados ao controle. Em um estudo realizado por (Lourenço et al., 2002), foi possível verificar que o ve-neno do *T. bahiensis* de mesmo gênero da espécie avaliada nesse estudo, pode le-var a convulsões acentuadas, ressaltando que o envenenamento por *T. serrulatus* em alguns casos também desenvolve quadros convulsionantes. Ao escolher o hipo-campo como umas das estruturas analisadas, levantou-se o seu envolvimento no processo epileptogênico e sua alta conexão com outras áreas cerebrais (Surges et al., 2008; Ossanai, 2009). Os efeitos de convulsão após o envenenamento podem ser apontados pela perda neuronal, principalmente nas regiões cerebrais como hi-pocampo e toda região límbica que abrange córtex e estriado, entre outras áreas do cérebro (Sutula et al., 1994; Ossanai, 2009). Alguns estudos apontam ainda, que a liberação excessiva de neurotransmissores é capaz de modificar a descarga elétrica neuronal, desenvolvendo sinais epiléticos que caracterizam as convulsões (Carvalho et al., 1998; Nencioni et al., 2009; Ossanai et al., 2013; Santos-de-Silva et al., 2017).

Ao avaliar o hipocampo nas primeira horas de ação do veneno, períodos em que o veneno atua de forma mais intensa (Galvani, et al., 2017), demonstram níveis de DA menores que o controle, o mesmo ocorre em 12h, onde sabemos que ainda existem resquícios de veneno, podendo estar agindo no sistema nervoso autônomo. Entretanto em células corticais, estriatais, hepáticas e pulmonares principalmente em 6h e 12h, demonstraram um aumento na concentração de DA detectada em grupos envenenados. O que pode ser explicado por alguns estudos, onde sugerem que tal diversidade de canais iônicos ligados a voltagem, possam estar envolvidos na ativi-dade de estouro da célula de DA (Shepard & Stump, 1999; Morikawa et al., 2003; Deister et al., 2009; Putzier et al., 2009; Ji, et al., 2012).

Segundo a literatura as  $\alpha$  e  $\beta$ -toxinas presentes na composição do veneno de *T. serrulatus*, possuem alta capacidade em liberar glutamato e dopamina em re-giões do hipocampo e fatias corticais (Cecchini et al., 2006). De forma que possuem ação sobre os nervos periféricos, despolarizando suas membranas e induzindo rea-ções espontâneas, levando a liberação dessas catecolaminas e neurotransmissores (Vasconcelos et al., 2005b; Lara, 2012). Outros estudos, ainda apontam que a Ts1, uma das  $\beta$ -toxinas presentes no veneno de *T. serrulatus*, apresenta capacidade de indução a liberação de dopamina exocitótica, em fatias corticais pré-frontais do cére-

bro de ratos, devido à junção de cálcio dos estoques intracelulares (Fernandes et al., 2004; Mendes, 2012). Conforme abordado acima, o desenrolar de tais mecanismos explicam nossos resultados, onde foi possível observar que assim como nas estruturas cerebrais avaliadas, onde obtivemos altos níveis de DA no córtex em 6h de administração do veneno, e ainda altos níveis no estriado em 2h no grupo tratado com SAEsc, também nas outras estruturas avaliadas como nas células hepáticas em até 12h, o mesmo ocorreu nas células renais e pulmonares.

Levando em conta, as diversas interações desenvolvidas pela composição do veneno e como a atuação das toxinas desencadeiam uma infinidade de sintomas e mecanismos, assim como a liberação e ou inibição de neurotransmissores pode influenciar no quadro da vítima. Nesse contexto, surge uma linha de investigação quanto aos danos moleculares gerados pelo veneno de *T. serrulatus*, no qual ainda não haviam estudos relacionados. Pela primeira vez Galvani et al (2017), constataram em um primeiro estudo que o veneno de *T. serrulatus* além de apresentar uma ação neurotóxica desenvolvida pela interação das  $\alpha$  e  $\beta$ -toxinas, possui também efeito genotóxico sobre o material genético de vítimas envenenadas. Acometendo todas as estruturas, estas que também foram avaliadas no presente estudo, no qual detectou-se já nas primeiras horas após o acidente, mantendo-se até 12h (Galvani et al., 2017).

Esses resultados corroboram aos nossos achados, onde quando administrado somente veneno de *T. serrulatus*, foi capaz de manter a molécula de DNA danificada até 24h após o acidente, período máximo em que avaliamos no decorrer desse estudo, não permitindo ao organismo o reparo dessas moléculas em todas as estruturas nesse estudo avaliadas. Estudos apontam que o veneno de *T. serrulatus* desenvolve a estimulação simpática transitória parassimpática e prolongada. Sendo que a mortalidade causada pelo envenenamento, se deve pela superestimulação simpática e não pela parassimpática (Gwee, et al., 2002; Cante et al., 2009). Dessa forma, o quanto antes for realizada a entrada com tratamento de soros antiescorpiônicos, maior a possibilidade de neutralização dos efeitos simpáticos e metabólicos, tornando-se ainda mais intensos no aprimoramento da recuperação (Bawaskar et al., 2010).

Sobretudo, nosso próximo passo foi avaliar quais seriam os riscos em nível molecular, sendo eles genotóxicos ou mutagênicos quando submetidos camundongos a intervenção por soroterapia, no qual administrou-se o SAEsc. Com intuito de

determinar a capacidade de neutralização, sobre o reparo da molécula de DNA, levando em consideração a reversão ou irreversão de danos após a neutralização do veneno, em organismos envenenados.

É importante ressaltar que os SAEsc atuam de forma a neutralizar o veneno circulante, induzindo a diminuição da sintomatologia (Brasil, 2018b). No presente estudo aplicamos SAEsc logo após administração do veneno de *T. serrulatus*, assim como (Revello et al., 1996), em seu trabalho avaliou a neutralização do envenenamento pelo escorpião de mesma espécie por meio de antiveneno hiperimune, onde foi possível demonstrar que os antivenenos quando administrados imediatamente após o acidente, apresentaram capacidade de neutralização até 8h, além de uma relevante diminuição das concentrações do veneno em grande parte dos órgãos afetados. Indo de encontro aos nossos achados, onde os resultados apresentados mostram-nos que os animais tratados com SAEsc após o acidente escorpiônico, no período entre 6h e 12h, apresentaram menores índices de danos nas moléculas de DNA de células cerebrais, hepáticas, pulmonares e renais de camundongos, sugerindo a possibilidade de reparo quando comparados aos demais grupos.

As demais estruturas avaliadas apresentaram elevados danos da molécula de DNA quando submetidos ao envenenamento sem tratamento, corroborando com (Galvani, et al, 2017) e ainda com (Revelo et al., 1996), onde ao avaliar antivenenos contra o veneno do escorpião *T. serrulatus* em períodos de até 8h, obtiveram altas concentrações de veneno nos diferentes órgãos estudados, sendo eles, rim, pulmão e fígado.

A intensidade de danos e altas concentrações de veneno em células renais se devem por este ser um órgão de excreção (Ismail e Abd-Elsalam, 1988). Outros estudos realizados na espécie *T. discrepans* apontaram que rins de ratos envenenados desenvolveram distensão tubular e necrose das células, além de congestão glomerular, trombose e hemorragia intertubular (Rodríguez, 2005).

Enquanto que no fígado, o veneno pode atingir tal órgão de forma muito rápida, sendo este metabolizado em mesma velocidade (Revelo et al., 1996). Como visto em um próximo estudo, foi possível verificar concentrações intensas de veneno no fígado, onde ao avaliar a prole de mães envenenadas o fígado desses animais apresentaram aumento de peso significativo, demonstrando altas concentrações de veneno (Barão, 2006). Revelo et al., (1996) em seu estudo ainda relata que o veneno se distribui por todo o organismo do indivíduo de forma muito rápida e intensa,

níveis máximos de veneno foram encontrados 30 minutos após a injeção no pulmão e baço e 15 minutos no rim e fígado.

Quanto as complicações pulmonares, indo de acordo com os nossos achados Silva, et al, (2017), em seu trabalho realizou uma análise semelhante ao nosso estudo. Onde ao envenenar camundongos, estes obtiveram a maior parte dos efeitos sistêmicos apresentados em 1h após injeção, desaparecendo entre 3 a 4h após administração, entretanto todos apresentaram dificuldades respiratórias até 6h. O edema pulmonar é característico do envenenamento escorpiônico, normalmente a principal causa dos óbitos relacionados a espécie, também desenvolvida pela liberação maciça de catecolaminas (Gueron e Ilia, 1996; 2009; Santos-da- Silva et al., 2017). Esses indícios caminham novamente a concordar com os nossos resultados aqui apresentados, tanto na avaliação do ensaio cometa quanto na análise de detecção de DA.

Quanto aos resultados apresentados pelo ensaio cometa nas células cerebrais, demonstraram danos que persistiram por até 24h de avaliação nos grupos em que administrou-se veneno e mesmo nos que foram tratados com SAEsc. Segundo Scatton, (1994) e Nencioni et al., (2009), isso pode ter ocorrido devido a hipótese excitotóxica, no qual indica que a liberação excessiva de glutamato pode ativar os seus receptores, iniciando uma cadeia de eventos intracelulares que podem levar a danos neuronais sustentados (Scatton, 1994). Todavia, a ação do veneno no sistema nervoso central sempre foi questionada, alguns descrevem a possibilidade de que os efeitos centrais sejam o resultado e não propriamente um processo do envenenamento (Freire-Maia e Campos, et al., 1989; Nencioni et al., 2009). De forma que o veneno seria incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Freire-Maia e Campos, 1989), assim como Revelo et al., (1996) em seu estudo, em que não foram detectadas concentrações de veneno no sistema nervoso central. Por outro lado, Ismail et al. (1992), acredita na participação direta do sistema nervoso central no processo de envenenamento, mesmo que em casos de tratamentos com soros ou adjuvantes, indivíduos muito jovens, não possuem a total formação da barreira hematoencefálica (Ismail, et al, 1992; Nencioni et al., 2018). Assim como demonstram nossos achados em que obtivemos danos que se mantiveram, em células cerebrais. Mesmo quando houve diminuição do índice de danos na molécula de DNA em até 12h, ocorrendo um aumento significativo após tal período.

Tal fato pode ser sustentado, pelos efeitos que são desencadeados após a eliminação do veneno no organismo. Assim como, o desenvolvimento de edema pulmonar, insuficiência renal, arritmias, danos hepáticos estes que devem-se principalmente a liberação de mediadores do sistema nervoso autônomo (Queiroz et al., 2015; Nencioni et al., 2018). Existem ainda evidências mostrando a participação do sistema nervoso central e do sistema inflamatório no processo (Dorce et al., 1994; Zoccal et al., 2016).

Os efeitos induzidos pelo veneno, ressaltando principalmente a Ts1 uma das toxinas presentes, podem desenvolver complicações, e alterações nas concentrações de proteína e leucocitose até 7 dias após o acidente. Segundo alguns autores, um dos indícios de tais complicações se devem aos níveis séricos de citocinas que encontram-se aumentados como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (Pessini et al., 2003), indicando que o veneno de *T. serrulatus* pode induzir o recrutamento de células no sistema imune para outros órgãos, sendo capaz de induzir uma resposta inflamatória aguda imediata (Fialho et al., 2011; Lara, 2012). Sugere-se que nesse contexto, o aumento do índice de danos que ocorreu após 12h destacando-se células pulmonares, renais e hepáticas figura (15K; 16M e 17O), em ambos os grupos sejam tratados ou não por SAEsc, pode ser devido a cascata inflamatória aguda e mediadores que passam a ser ativados, devido aos mecanismos de ação do veneno de *T. serrulatus*.

Entretanto o tratamento com soroterapia pode ser de fato eficaz quando administrada imediatamente após o acidente, sendo necessário acompanhamento médico após uma correta classificação de níveis de envenenamento, tendo em vista que a dose de antiveneno, pode variar de acordo com a gravidade do acidente, status imunológico da vítima, entre outros fatores. É necessário um acompanhamento de até 48h após, com a intervenção de medicamentos adjuvantes ao tratamento para total neutralização (Ismail et al., 1994; Ghalim, et al., 2000; Bawaskar et al., 2010). Pesquisadores realizaram um acompanhamento clínico com pacientes envenenados pelo escorpião *Mesobuthus tamulus*, no qual utilizaram além do soro antiescorpiônico a aplicação de Prazosina, como medicamento adjuvante no processo de neutralização do veneno. Relataram ainda, que é possível uma melhor neutralização do veneno circulante, além de acelerar o controle da sintomatologia em geral. Diferente dos grupos tratados com somente um tipo de tratamento, obtiveram relatos de casos em que houve deterioração nas condições de envenenamento, apresentando aumento da gravidade do quadro de acidente (Bawaskar et al., 2010).

Alguns autores ainda sugerem, que essas condições se devem ao veneno ter atingido o local de ação alvo de forma muito rápida, não obtendo respostas ao antídoto devido as catecolaminas circulantes elevadas induzidas pelo veneno, impedindo a ação do mesmo (Cupo et al., 2002; Bawaskar et al., 2010). Sendo essencial o monitoramento de pacientes após tratamento com soroterapia, especialmente crianças e idosos, não descartando a possibilidade de complicações no sistema nervoso central e problemas respiratórios (Sofer; Gueron, 1988). Outros estudos ainda trazem relatos de complicações após tratamento, ainda que leves porém existentes, como o desenvolvimento de edema pulmonar, hematêmese, neurotoxicidade e outros sintomas neurológicos, tornando necessário nesses casos o uso de medicamento adjuvantes (Ismail, 1994).

Tendo em vista os estudos citados acima, é possível justificar os danos em animais tratados e ou somente administrados com SAEsc, visto que são necessários tratamentos adjuvantes junto ao processo de soroterapia. Sendo importante ainda ressaltar, a importância da análise de gravidade clínica do paciente, de forma a entrar com intervenções de acordo com o estado da vítima (Bawaskar et al., 2010). A eficácia do tratamento está diretamente relacionada ao período até a administração do SAEsc, a dose de soro administrada, o enquadramento da vítima conforme a gravidade do acidente. Assim como o estudo de Ghalim, et al., (2000), onde quantificaram as concentrações de toxinas circulantes, e estas diferiram de acordo com os sintomas dos indivíduos, sugerindo que um acidentado de grau I apresenta uma concentração de toxinas circulantes bem menor que um de grau II. Tornando-se essencial o acompanhamento do estado clínico, mesmo com a administração de SAEsc, podendo ter a vítima ainda reações adversas que podem variar conforme o status imunológico, idade, peso e gravidade (Brazil, 2018; Carmo et al., 2015).

Quanto ao grupo em que administrou-se somente o SAEsc, como forma de avaliar sua ação sem interferentes, comprovando que o veneno de *T. serrulatus* foi o único e exclusivo agente genotóxico. Obtivemos em todas as estruturas avaliadas, índices de danos acima do controle nas primeiras horas do estudo e também em 24h. O que pode ser justificado, quando levado em conta todo o processo de purificação dos soros, o fato de que os SAEsc são um conjunto de imunoglobulinas heterólogas possuindo atividade dos sítios combinatórios das molécula de imunoglobulina, além de passarem por inúmeros processos de diferenciação e especificidade. Entretanto, é possível a formação de agregados espontâneos de proteínas, que po-

dem ser induzidos, já que a atividade neutralizante dos sítios combinatórios das IgG, quando tratadas pela pepsina se mantem intacta, levando a múltiplas reações alérgicas em casos de indivíduos hipersensíveis, de baixo peso e estatura (Butantan, 2017). Outros sintomas, podem se desenvolver como a anafilaxia devido a degranulação de mastócitos ou ativação do sistema complemento (Butantan, 2017).

Devemos assim considerar as possíveis complicações da soroterapia, além do fato de o ensaio cometa ser um teste extremamente sensível (Speit; Uma, 2012). Pode-se nesse sentido explicar alguns de nossos resultados, onde o grupo SAEsc administrado individualmente e ainda quando em conjunto com o veneno apresentaram níveis elevados de danos na molécula de DNA dos camundongos tratados. Alguns casos de envenenamento torna-se necessário a administração de doses adicionais de soro, de forma a avaliar se dentro de 24h a vítima venha a apresentar sinais de coagulação após o tratamento, por isso a importância do monitoramento na faixa de até 48h após o acidente (Brasil,2010b). Sustentando assim nossos resultados, em que apresentaram neutralização em nível genômico até 12h quando tratados com SAEsc, entretanto em 24h nossos resultados indicam um retorno da toxicidade do veneno. Isso nos leva a compreender a necessidade de uma nova aplicação de doses de SAEsc ou doses ainda maiores.

Se faz importante ressaltar, que o envenenamento escorpiônico, deve se enquadrar em níveis de gravidade do acidente, sendo por vezes necessário o auxílio de medicamentos adjuvantes. Entretanto ao se tratar de um modelo experimental animal, não foi possível mensurar a gravidade e sintomatologia desenvolvida por cada animal individualmente. Tendo em vista, que ainda não existem protocolos e/ou estudos que possam afirmar tal quadro.

Quanto a análise de MN, comprovamos que de fato o veneno leva a danos permanentes mesmo após o tratamento com o SAEsc. Toda via, como visto anteriormente os animais obtiveram danos genotóxicos em suas moléculas de DNA, não sendo reparadas totalmente quando avaliamos até 24h. Conseqüentemente se não reparados ocorrem modulações no ciclo celular, na informação genômica por meio de reações direta ao DNA nuclear, incorporação da molécula ao decorrer da replicação celular, implicações durante a divisão celular, levando a divisões incoerentes da célula, defeitos no pontos de verificação do ciclo celular, maior taxa de morte celular, além de fragmentos cromossômicos presentes na mitose que são incapazes de se mover para o pólo do fuso mitótico, formando assim MN (Veiga, 1995; Fernandes,

2005; He, et al., 2019). Tal instabilidade pode estar envolvida no desenvolvimento de muitas doenças, incluindo distúrbios neurodegenerativos, envelhecimento, até mesmo o câncer (Damiani, 2010; Galvani, 2017).

O teste de MN realizado nesse estudo, não apresentou EPCMn nem diferenças na relação de EPC/ENC no grupo onde administrou-se somente o SAEsc, comprovando que de fato os danos que ocorreram durante este estudos não foram gerados pelo soro e sim realmente pelos efeitos danosos ocasionados pela complexidade do veneno. De maneira semelhante ao trabalho de (Roll, et al., 2018) em que demonstrou nos seus dados quando aplicado o teste MN em camundongos fêmeas jovens, seu controle apresentou níveis de EPCMn e ENC de 0,40 a 1,60, corroborando com os nossos achados.

Ao avaliar o grupo envenenado e tratados com SAEsc, nossos resultados indicam que mesmo sendo possível sua neutralização sintomatológica, o veneno leva a danos irreparáveis, não permitindo a ação dos SAEsc a nível molecular podendo de fato atuar na modulação genômica de indivíduos acidentados.

Assim como visto em outros estudos, algumas espécies de escorpiões do gênero *Tityus*, permitem reduzir níveis de antioxidantes celulares pelo excesso de indução de ROS, além de levar a apoptose (Gomes et al., 2010; Zargan et al., 2011). Outros estudos ainda apontam a relação do veneno de *T. serrulatus* com o envolvimento em vias apoptóticas, tendo até mesmo a necrose como principal via de morte celular, além de induzir a liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (Rigoni, et al., 2016). Sendo parte dos efeitos do envenenamento por *Tityus*, citotoxicidade e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Rigoni, et al., 2016).

Torna-se relevante lembrar que diante a estas terapias contra a complexa atuação do veneno de *T. serrulatus*, estudar a modulação genômica frente ao desempenho dos SAEsc é essencial, sabendo que tais danos gerados, quando não reparados, levam a complicações futuras. A inexistência de trabalhos sejam eles clínicos ou pré-clínicos, e protocolos de forma mais específicas que comprovem a eficácia dos SAEsc, em uma total neutralização do antígeno circulante no organismo de indivíduos envenenados, ou mesmo sua capacidade em minimizar os casos de mortalidade relacionados aos acidentes, torna nosso estudo ainda mais relevante e pioneiro em tal linha de experimentação. De forma, que as doses de antivenenos a nível de neutralização total ainda são incertas, assim como sua cinética a longo prazo.

## 6 CONCLUSÃO

Tomados em conjuntos, nossos achados demonstram que o SAEsc avaliado nesse estudo, possui capacidade em manter um equilíbrio dopaminérgico após níveis aumentados devido ao envenenamento escorpiônico até 24h, permitindo retornar para os níveis basais. Além de possuir capacidade de neutralização sobre o veneno de *Tityus serrulatus* em nível molecular até 12h de ação após o envenenamento em células cerebrais, hepáticas, pulmonares e renais de camundongos.

Entretanto, a partir de 24h após a inoculação em tal modelo experimental, a neutralização e reparo celular em níveis moleculares não se manteve eficiente, de forma que não foram totalmente reparados e evoluíram a danos mutagênicos em indivíduos envenenados e também quando houve intervenção de tratamento com soroterapia. Demonstrando, que o veneno permiti agir sobre a modulação genômica do indivíduo, podendo não serem reparados.

Sobretudo, mais estudos devem ser realizados em relação as doses e quantidade de aplicações do SAEsc no processo de tratamento por acidentes escorpiônicos, além de procurar compreender ainda melhor os mecanismos de ação dos soros.

## REFERÊNCIAS

- Amaro I; Riaño-Umbarila L; Becerril B; Possani LD. Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from *Tityus serrulatus* scorpion. *Immunology Letters*. 2011; 139 (1):73-79.
- Andrade MV; Caraméz MPR.; Abreu EMNN; Dolnikoff M; Omar ED; Velasco IT; Cunha-Melo JR. Lung compliance, plasma electrolytes levels and acid–base balance are affected by scorpion envenomation in anesthetized rats under mechanical ventilation. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. Endocrinol*. 2004; 138 (1): 97–104.
- Angeloni, MJFC. Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico de *Melissa officinalis* [dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2010.
- Arantes EC; Cusinato DAC; Giglio JR; Guimarães LFL; Gregório ZMO; Leite FP; Vasconcelos F. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*. 2010; 56 (8): 1477-1486.
- Bahloul M; Chaari A; Dammak H; Samet M; Chtara K; Chelly H; Ben HC; Kallel H; Bouaziz M. Pulmonary edema following scorpion envenomation: mechanisms clinical manifestations, diagnosis and treatment. *International Journal of Cardiology*. 2013; 162 (2): 86-91.
- Barão, A.A.S.; Nencioni, A.L.A.; Dorce, V.A.C. Embryotoxic effects of maternal exposure to *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J. Venomous Anim. Tox. Incl. Trop. Dis*. 2008; 14:322 – 337.
- Bawaskar, H. S. Efficacy and safety of scorpion antivenom plus prazosin compared with prazosin alone for venomous scorpion (*Mesobuthus tamulus*) sting: randomised open label clinical trial. *BMJ*. 2011; (1) 342.
- Benedetto, et al. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014; 98: 266–270.
- Bicalho, A.F.X.; Guatimosim, C.; Prado, M.A.M.; Gomez, M.V.; Romano-Silva, M.A. Investigation of the modulation of glutamate release by sodium channels using neurotoxins. *Neuroscience*. Oxford; 2002; (113):115-123.
- Boyer, L; Degan J; Ruha AM; Mallie J; Mangin E; Alagón A. Safety of intravenous equine F(ab')<sub>2</sub>: Insights following clinical trials involving 1534 recipients of scorpion antivenom. *Toxicon*. 2013; 76 (15); 386-393.
- Brasil. Portaria N.º 2.472, de 31 de Agosto de 2010. Dispõe sobre as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelecer fluxo,

critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. DOU de 1º/09/2010; 50b.

Brasil. Ministério da saúde. Disponível em:< - <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos>>. Acesso em 20 de Maio de 2019.

Brasil. Ministério da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos – Escorpião. 2017. Disponível em:< <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-escorpiao>> Acesso em 27 de Maio, de 2018a.

Brasil. Ministério da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos: Tratamento. Disponível em:< <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/13690-tratamento>> Acesso em 29 de Maio de 2018b.

Brasil. Ministério da Saúde. Casos de escorpionismo de 2000-2017. 2018. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/13692-situacao-epidemiologica-dados>> Acesso em 30 de Abril. de 2018c.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Formulário terapêutico nacional 2010. 1135– 2. ed. – Brasília: 2010b.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Formulário terapêutico nacional 2010: Rename 2010/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010c.

Brazil TK. Os Escorpiões. In: Porto TJ. Salvador - Brasil. Ed.EDUFBA, 2010.

Brazil. Instituto Vital Brazil. Escorpiões. Disponível em: < <http://www.vitalbrazil.rj.gov.br/escorpioes.html#>> Acesso em 14 de Mai. 2018.

Butantan. Bula soros antiescorpiônicos. Secretaria de estado de saúde. Coordenação de ciências, tecnologia e Insumos estratégicos de saúde. 2017.

Cante S.K.; Deshpande S, B.; Veneno de *Buthus tamulus*: os reflexos vasosensoriais induzidos são mediados por vias eferentes na parassimpática simpática e veagal. Carta de Neurociência. 2009; (464):199 -202.

Carmo, A. O.; Chatzaki, M.; Horta, C.C.R.; Magalhães, B.F.; Oliveira-Mendes, B.B.R.; Chávez-Olórtegui, C.; Kalapothakis, E. Evolution of alternative methodologies of scorpion antivenoms production. Toxicon. 2015; (18):1-12.

Carvalho, F.F.; Nencioni, A.L.A.; Lebrun, I.; Sandoval, M.R.L.; Dorce, V.A.C. Behavioral, electroencephalographic and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. Pharmacol. Biochem. Beha; 1994:(60): 7-14.

Cecchini, A. L.; Vasconcelos, F.; Amara, S.G.; Giglio, J. R.; Arantes, E. C. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its toxin TsTX-V on neurotransmitter uptake in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006; (217) : 196-203.

Chippaux JP; Goyffon M. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta tropica*. 2008; 107; 71-79.

Ciruffo PD; Coutinho LO; Boroni JD. Diniz AET; Diniz WF. Escorpionismo: quadro clínico manejo dos pacientes graves. *Rev. Med Minas Gerais*. 2012; 22 (8): S1-S48.

Collaço, R.C.O.; Hyslop, S.; Dorce, V.A.C.; Antunes, E. Rowan, E.C. Scorpion venom increases acetylcholine release by prolonging the duration of somatic nerve action potentials. *Neuropharmacology*. 2019; (15): 153:41 – 52.

Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen*. 1997; 30 (2): 139-46.

Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Moller, P., Rojas, E., Dhawan, A., Benzie, I., Coskun, E., Moretti, M., Speit, G., Bonassi, S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res*. 2014; 759, 27–39.

Cologna CT; Peigneur S; Rosa JC; Selistre-de-Araujo HS; Varanda WA; Tytgat J; Arantes EC. Purification and characterization of Ts15, the first member of a new a-KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*. 2011; 58 (1): 54–61.

Cologna, C.T.; Marcusi, J.R.; Giglio, A.M. Soares, E.C. *Tityus serrulatus* venom and toxins: an overview. *Protein Pept. Lett*. 2009; 16: 920-932.

Corzo G; Espino-Solis GP. Selected scorpion toxin exposures induce cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicon*. 2017; 127 (1): 56-62.

Cupo P, Hearing S E. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon*. 2002; (40):823-30.

Cupo P; Azevedo-Marques MM & Hering SE. Acidentes por animais peçonhentos: Escorpões e aranhas. *Medicina, Ribeirão Preto*. 2003; 36: 490-497.

Damiani AP. Metais pesados e danos no DNA de células sanguíneas de morcegos insetívoros em áreas de mineração de carvão da Bacia Carbonífera Catarinense [trabalho de conclusão de curso]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense, Curso de Ciências Biológicas; 2010.

Deister, C.A.; Teagarden, M.A.; Wilson, C.J. & Paladini, C.A. An intrinsic neuronal oscillator underlies dopaminergic neuron bursting. *J. Neurosci*. 2009; 29: 15888–15897.

Dorce V.A.; Sandoval M.R. Effects of *Tityus serrulatus* crude venom on GABAergic and dopaminergic rat brain systems. *Toxicon*. 1994; 32 (12): 1641-7.

EL-Asheer, O.M; Hammad E.E.M; Ismail, I; Saad, M.K; Aziz, N.A. A randomized comparative study between intravenous and intramuscular scorpion antivenom regimens in children. *Rev. Toxicon*. 2019; (159): 45-49.

Estevinho, M.F.; Fortunato, J. S. Dopamina e receptores. *Revista Portuguesa de Psicossomática*. 2003; (5):1:21-31.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*. 1995; 339(1):37-59.

Fernandes, T. C. C. Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes. [dissertação de mestrado] Rio Claro: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. 2005.

Fernandes, V.M.; Massensini, A.R.; Prado, M.A.; Silva, M.A.; Moraes S.T.; Gomez, M.V. Effects of alpha-scorpion toxin, tityustoxin on the release of [3H] dopamine of rat brain prefrontal cortical slices. *Neurochem Int*. 2004; 44(2): 91-7.

Ferreira J; Rui S; Barraviera B. Artrópodes: de importância médica. Rio de Janeiro: EPUB, 2002.

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*. 2011; 58:480-485.

Freire-Maia L.; Campos J.A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. *Natural Toxins, Characterization, Pharmacology and Therapeutics*. Oxford: Pergamon Press. 1989; (8) .

Galvani NC; Vilela TC; Domingos AC; Fagundes MI; Bosa LM; Della Vechia IC; Scussel R; Pereira M; Steiner BT; Damiani AP; Olórtegui-Chávez C; Andrade VM; Machado de Ávila RA. Genotoxicity evaluation induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice. *Toxicon*. 2017; 140 (1); 132-138.

Ghalim, N.; El-Hafny, B.; Sebti, F.; Heikei, J.; Lazar, N.; Moustansir, R.; Benslimane, A. Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2000; 62 (2):277-283.

Gomes, A. P. Bhattacharjee, R. Mishra, AK Biswas, SC Dasgupta, B. Giri. Anti-cancer potential of animal poisons and toxins. *Indian J. Exp. Biol*. 2010; (48): 93 – 103.

Gwee, M.C.E; Nirthano S.; Khoo H.; Gopalkrishnakone P.; M Kini.; Cheah L.S. Autonomic effects of some venoms of scorpions and toxins. *Clin Exp Pharmacol Physiol* . 2002; (29): 795 -801.

He, B; Gnawali, N; Hinman, AW; Mattingly, AJ; Osimani, A; Cimini D. Chromosomes missegregated into micronuclei contribute to chromosomal instability by Missegregating at the next division. *Oncotarget*. 2019; (28): 10: 2660-2674.

Hoshina MM; Santos LD; Palma MS; Marin-Morales MA. Cytotoxic, genotoxic/antigenotoxic and mutagenic/antimutagenic effects of the venom of the Ismail M; Abd-Elsalam A. Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration? *Toxicon*. 1988; 26 (3): 233-266.

Ismail. M. The treatment of the scorpion envenoming syndrome: The Saudi experience with serotherapy. *Toxicon*. 1994; (32):9: 1019-1026.

Ji, H.; Tucker, K.R.; Putzier, I.; Huertas, M.A.; Chifre, J.P.; Canavier, C.C.; Shepard, PD. Functional characterization of potassium channels of the ether-go-go gene in mesencephalic dopaminergic neurons - implications for a role in depolarization blockade. *European Journal of Neuroscience*. 2012; 36 (7): 2906-2916.

Karnad, D.R. Treatment of scorpion poisoning: the need for a standard treatment protocol using drugs and antivenom. *J. Assoc. Phys. Índia*. 2009; 57:299 – 300.

Krishna G; Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*. 2000; 455(1-2):155-66.

Lara PG. Efeito do veneno de *Tityus serrulatus* em camundongos selecionados geneticamente para máxima ou mínima resposta inflamatória. [dissertação Mestrado]. Área de concentração: Imunologia – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo; 2012.

Lima PC. Isolamento e caracterização estrutural e funcional de uma nova toxina da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*. [dissertação mestrado]. Área de concentração: Toxicologia – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Lourenço G.A.; Lebrun I.; Dorce V.A.C. Neurotoxic of effects of fraction isolated from *Tityus bahiensis* scorpion venom (Perty, 1984), *Toxicon*. 2002; 40:149-157.

Lourenço G.A.; Lebrun I.; Dorce V.A.C. Efeitos neurotóxicos das frações isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* (Perty, 1834). *Toxicon*. 2002; 40 (2): 149-57.

Lourenço WR. The scorpion families and their geographical distribution. *Venom Anim Toxins. Botucatu*. 2001; 7 (1): 7.

Lourenço WR; Ythier E; Cloudsley-Thompson JL. Observations on the life history of *Chaerilus philippinus* Lourenço & Ythier, 2008 (Scorpiones, Chaerilidae) from the Philippines. *C. R. Biol*. 2008; 331 (11): 896-900.

M. Gueron.; R. Ilia. Non-cardiogenic pulmonary oedema after scorpion envenomation: a true entity? *Toxicon*. 1996; 34:393-395.

Maciel MCG. Veneno de *Tityus serrulatus*: uma ferramenta biotecnologia na modulação do sistema imunológico. [tese de doutorado]. Programa de pós-graduação em Biotecnologia, São Luís; 2014.

Marcussi S, Arantes EC, Soares AM. Escorpiões: biologia, envenenamento mecanismos de ação de suas toxinas. 1. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2011.

Mavournin, KH.; Blakey, DH.; Cimino, MC.; Salamone, MF.; Heddle, JA. The in vivo Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 1990, 232, 29-80.

Mendes BBRO. Estudo da toxina Ts1 nativa e recombinante de *Tityus serrulatus* na produção de soro neutralizante. [dissertação Mestrado]. Programa de pós-Graduação em Genética. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte: Universidade, 2012.

Morikawa, H.; Khodakhah, K. & Williams, J.T. Two intracellular pathways mediate metabotropic glutamate receptor-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in dopamine neurons. *J. Neurosci.* 2003; 23:149–157.

Nejati J; Mozafari E; Saghafipour A; Kiyani M. Scorpion fauna and epidemiological aspects of scorpionismo in southeastern Iran. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014; 4 (1): S217-S221.

Nencioni A.L.A.; Lourenço G.A.; Lebrun I.; Florio J.C.; Dorce V.A.C. The main components of the scorpion *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* after intraperitoneal injection in rats. *Neurosci Lett.* 2009; 463 (3): 234-8.

Nencioni ALA; Neto EB; Freitas LA; Dorce VAC. Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* 2018; 24 (3): 2-11.

Nencioni, A. L.B.; Neto, E.B.; Freitas, L. A.; Dorce, V.A.C. Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* 2018; (24):3.

Nencioni, A.L.A.; Lourenço, G.A.; Lebrun, I.; Florio, J.C.; Dorce, V.A. Central effects of *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* scorpion venoms after intraperitoneal injection in rats. *Neurosci. Lett.*, 2009; (463): 234-238.

Ossanai L.T.T.; Lourenço G.A.; Nencioni A.L.A.; Lebrun I, N.; Yamanouye, Dorce V.A.C. Effects of a toxin isolated from the poison of the scorpion *Tityus bahiensis* hippocampus of rats. *Life Sci.* 2012; 91 (7–8): 230–6.

Ossanai, L. T. T. Efeitos da injeção intra-hipocampal de toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* em ratos. [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Programa de Pós-Graduação em ciências da coordenadoria de controle de doenças da secretaria de estado da saúde de São Paulo, 2009.

Pessini, A. C.; 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*. 2003;(3):5: 765-774.

Pongs, A. Regulation of Excitability by Potassium Channels, Results and Problems in Cell Differentiation. *Springes Science + Business Media*. 2007: 145 – 161.

Pucca MB; Amorim FG; Cerni FA; Bordon KCF; Cardoso IA. Influence of post-starvation extraction time and prey-specific diet in *Tityus serrulatus* scorpion venom composition and hyaluronidase activity. *Toxicon*. 2014; 90 (1): 326-336.

Pucca MB; Cerni FA; Pinheiro Junior EL; Bordon KC; Amorim FG; Cordeiro FA; Longhim HT; Cremonez CM; Oliveira GH; Arantes EC. *Tityus serrulatus* venom - A lethal cocktail. *Toxicon*. 2015; 108 (15): 272-284.

Putzier, I.; Kullmann, P.H.; Horn, J.P. & Levitan, E.S. Dopamine neuron responses depend exponentially on pacemaker interval. *J. Neurophysiol*. 2009b; 101, 926–933.

Queiroz A.M.; Sampaio V.S.; Mendonça I.; Fé N.F.; Sachett J.; Ferreira L.C.L. Gravidade de picadas de escorpiões na Amazônia Ocidental Brasileira: um estudo de caso-controle. *PLoS One*. 2015; 10 (6).

Queiroz, WJ. O processo produtivo do soro antiofídico: da crise a superação. [dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais & Saúde. Goiânia: Universidade Católica de Goiás; 2005.

Radak KZ; Suzuki M; Higuchi L; Balogh I; Boldogh EK. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. *Free Radic. Biol. Med*. 2016; 98:187-196.

Rafizadeh SJ; Rafinejad YR. Epidemiologia do escorpionismo no Irã durante 2009. *J Artrópodes Borne Dis*. 2013; 7: 66 – 70.

Reckziegel GC, Pinto VL. Scorpionism in Brazil in the years 2000 to 2012. *J Venom Anim Toxins*. 2014; 20: 20-46.

Revelo MP, Bambilra LA, Ferreira AP, Diniz CR, Chávez-Olortegui C. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon*. 1996; (10);1119-1125.

Ribeiro IP; Gaivão I. Efeito genotóxico do etanol em neuroblastos de *Drosophila melanogaster*. *Rev. Port Saúde Pública*. 2010; 28 (2): 199-204.

Rigoni VL; Kwasniewski FH; Vieira RP; Linhares IS; da Silva JL; Nogueira-Pedro A ; Zamuner SR. Human bronchial epithelial cells injury and cytokine production induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom: An *in vitro* study. *Rev. Toxicon*. 2016; 120; 22 – 28.

Rochol C. Prefeitura Porto Alegre – Brasil 2017. Disponível em: <[https://gauchazh.clicrbs.com.br/saude/noticia/2017/11/escorpiao-amarelo-entenda-](https://gauchazh.clicrbs.com.br/saude/noticia/2017/11/escorpiao-amarelo-entenda)

[como-proceder-em-caso-de-picada-cj9ss4vmm00bv01ms826q403o.html](http://como-proceder-em-caso-de-picada-cj9ss4vmm00bv01ms826q403o.html) >- Acesso em : Maio de 2018.

Rodríguez de la Vega e Possani. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*. 2005; 46 (8):831 – 844.

Roll, M. M.; Miranda-Vilela, A. L.; Longo, J. P.F.; Agostini-Costa, T. S.; Grisolia, C.K. The pequi pulp pil (Caryocar brasiliense Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. *Genetics and Molecular Biology*. 2018; (41): 4: 858-869.

Santos-da-Silva AP; Candido DM; Nencioni ALA; Kimura LF; Prezotto-Neto JP; Barbaro KC; Chalkidis HM; Dorce VAC. Some pharmacological effects of *Tityus obscurus* venom in rats and mice. *Toxicon*. 2017; 126 (1): 51-58.

Seiter M; Stockmann M. The life history of the parthenogenetic scorpion *Lychas tricarinatus* (Simon, 1884) from Odisha province, India and supplementary notes on *Tityus trivittatus* Kraepelin, 1898 (Scorpiones, Buthidae). *Zoology*. 2017;270 (1): 155-165.

Shepard, P.D. & Stump, D. Nifedipine blocks apamin-induced bursting activity in nigral dopamine-containing neurons. *Brain Res*.1999; 817, 104–109.

Silva A.P.S; Candido D.M; Nencioni A.L; Kimura L.F; Prezotto-Neto J.P; Barbaro K.C; Chalkidis H.M; Dorce V.A.C. Some pharmacological effects of *Tityus obscurus* venom in rats and mice. *Toxicon*. 2017; 126 (1):51-58.

Silva, LFJ. Produção de soro hiperimune no Instituto Vital Brazil: Estudo de caso orientado á sustentabilidade através da avaliação do ciclo de vida. [dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia do centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca. Rio de Janeiro: Centro Federal de Educação Tecnológica; 2012.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175(1):184-91.

Sofer, S.; Gueron, M. Insuficiência respiratória em crianças após envenenamento pelo escorpião *Leiurus quinquestriatus*: aspectos hemodinâmicos e neurológicos *Toxicon*. 1988; (26), 931 – 939.

Soros: antiaracnídico (*Loxosceles* e *Phoneutria*) e antiescorpiônico. São Paulo: Yamaguchi [2012]. Bula de Remédio.

Speit, L.; Uma, R. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Rev.Methods Mol Biol*. 2012; (920): 79-90.

Stockman,P.; Gopalakrishnakone, P.; Possani L.D.; Schwartz E. F.; Veja de la, C. Introdução à biologia e ecologia do escorpião. *Scorpion Venenos, Toxinologia*. 2015; 25 – 59.

Surges R.; Schukze-Bonhage A.; Altenmuller D.M. Hippocampal involvement in secondarily generalised seizures of extrahippocampal origin. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2008;79:924-929.

Sutula T.P.; Cavajos J.E.; Woodard A.R. Long-term structural and functional alterations induced in the hippocampus by kindling: implications for memory dysfunction and development of epilepsy. *Hippocampus*. 1994; (4):254-258.

Tice RR; Agurell E; Anderson D; Burlinson B; Hartmann A; Kobayashi H; Miyamae Y; Rojas E; Ryu JC; Sasaki YF. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000; 35(3):206-21.

Todd C. An Anti-serum for Scorpion Venom. *J Hyg (Lond)*. 1909;9 (1):.69-85.

Vasconcelos F, Lanchote VL, Bendhack LM, Giglio JR, Sampaio SV, Arantes EC. Effects of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2005; 141 (1): 85-92.b

Vasconcelos F; Sampaio SV; Garófalo MAR; Guimarães LFL; Giglio JR; Arantes EC. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract up on *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. *J. Ethnopharmacol*. 2004; 95: 385–392.

Vasconcelos, F. Efeitos de  $\alpha$  e  $\beta$ - neurotoxinas da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* sobre a liberação de catecolaminas, pressão arterial, captação de neurotransmissores e concentração de cálcio em células de músculo liso de aorta de ratos. [Tese de doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade São Paulo Faculdade de ciências farmacêuticas, 2006.

Vasconcelos, F; Lanchote, V. L; Bendhack, L. M; Giglio, JR; Sampaio, S. V; Arantes, E.C. Effects of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rats arterial blood pressure and plasma catecholamines. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol*. 2005a; (141):85-92.

VEIGA, A. B. O uso do teste de *Allium cepa* para detectar a toxicidade do inseticida Nuvacron. Monografia (Conclusão do curso de Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 58 f. 1995.

Zargan, J.; Umar, S.; Sajad, M.; Naime, M.; Ali, S.; Khan, H.A. Veneno de escorpião (*Odontobuthus doriae*) induz apoptose por despolarização de mitocôndrias e reduz a população em fase S em células de cancro da mama humano (MCF-7). *Toxicol Vitro*. 2011; 25 ( 8 ): 1748 – 1756.

Zoccal K.F.; Sorgi C.A; Hori J.I.; Paula Silva F.W.; Arantes E.C; Serezani C.H. Oposição de papéis de LTB<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> na regulação da mortalidade induzida por veneno de escorpião dependente de inflamações. *Nat Commun*. 2016; 7: 10760.

**ANEXO**

## ANEXO A – Certificado do CEUA



## CERTIFICADO

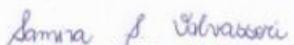
Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **27/03/2018**.

<b>Título do projeto</b>	Avaliação genômica e bioquímica do tratamento com soros antiescorpionicos em animais acidentados com o veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> Lutz & Mello, 1922
<b>Project title</b>	Genomic and biochemical evaluation of the treatment with anti-scorpion sera in animals envenoming with the venom of the scorpion <i>Tityus serrulatus</i> Lutz & Mello, 1922
<b>Número do protocolo</b> Protocol number	021/2018-1 – Versão 02
<b>Pesquisador principal</b> Principal Investigator	Ricardo Andrez Machado de Ávila
<b>Pesquisadores</b> Researchers	Nathalia Coral Galvani, Mirian Ivens Fagundes, Bethina Trevisol Steiner, Rahisa Scussel, Emily Côrneo, Ellen de Pieri, Haylla Santos de Souza.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/08/2018 a 01/08/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico Swiss
Nº de animais	39 masculino e 39 feminino = 78
Idade/Peso	28-35 dias / 18-22g
Gênero	Masculino e Feminino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

  
**Samira da Silva Valvassori**  
 Coordenadora do CEUA

Criciúma, 27 de março de 2018.



**Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado **“Análise imunológica, genotóxica e da ação antiveneno contra o veneno do escorpião *Tityus serrulatus* do extrato alcoólico de *Piper miquelianum* C.DC., *Petiveria alliacea* L. e *Aristolochia triangularis* Cham. & Schltd.”** Protocolo nº 076/2015-1 sob a responsabilidade de **Ricardo Andrez Machado de Ávila** e equipe: Luiza Macarini Bosa, Rahisa Scussel, Ana Paula Ribeiro, Valeska Paulo Fernandes, Nathalia Coral Galvani, Angelino Chitoma Domingos, Mirian Ivens Fagundes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, em reunião de: 15/06/2015.

Vigência do Projeto	01/07/2015 a 30/12/2017
Espécie/linhagem	Mus musculus – Camundongos Swiss
Nº. De animais	180
Peso/Idade	18g a 22g / 28 a 35 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

**Protocol number: 076/2015-1**

**Principal Investigator:** Ricardo Andrez Machado de Ávila

**Researchers:** Luiza Macarini Bosa, Rahisa Scussel, Ana Paula Ribeiro, Valeska Paulo Fernandes, Nathalia Coral Galvani, Angelino Chitoma Domingos, Mirian Ivens Fagundes

**Project title:** Immunoassay, genotoxic and antivenom action against scorpion venom *Tityus serrulatus* the alcoholic extract of *Piper miquelianum* C.DC., *Petiveria alliacea* L. and *Aristolochia triangularis* Cham. & Schltd

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 16 de junho de 2015.

  
**JAIRO JOSÉ ZOCCHE**  
 Coordenador da CEUA