ANA MARIA TRINDADE GRÉGIO

ESTUDO COMPARATIVO DOS VENENOS DE ESCORPIÕES *Tityus bahiensis* E *Tityus serrulatus* E DE SUAS PRINCIPAIS TOXINAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Universidade Estadual de Campinas
Piracicaba
2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ANA MARIA TRINDADE GRÉGIO

ESTUDO COMPARATIVO DOS VENENOS DE ESCORPIÕES *Tityus bahiensis* E *Tityus serrulatus* E DE SUAS PRINCIPAIS TOXINAS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor.

Orientador: **Prof. Dr. Livre Docente Marcos Dias Fontana**

Banca Examinadora: Prof. Dr. Eduardo Dias Andrade

Prof. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Prof. Dr. Antônio Carlos de Oliveira

Prof. Dr. José Carlos Cogo

exemplar foi devidamente corrigido, de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 17/05/00
Assinatura do Orientador

Universidade Estadual de Campinas

Piracicaba
2000

TESE/UNICAMP

NIDADE BC
CHAMADA:
I/UNICAMP
G861e
TOMBO BC 41872
PROC. 278/00
C D X
PREÇO R$ 11,00
DATA 08-08-00
N.º CPD

CM-00143121-6

Ficha Catalográfica

Grégio, Ana Maria Trindade.

G861e Estudo comparativo dos venenos de escorpiões *tityus bahiensis* e *tityus serrulatus* e de suas principais toxinas. / Ana Maria Trindade Grégio.. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.

94p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Marcos Dias Fontana.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Junção neuro muscular. 2. Toxicologia. 3. Farmacologia. 4. Neurotoxicologia. 5. Bioquímica – Experiências. 6. Escorpião – Veneno. 7. Fraçoes. I. Fontana, Marcos Dias. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.

UNICAMP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 15 de Fevereiro de 2000, considerou a candidata ANA MARIA TRINDADE GRÉGIO aprovada.

1. Prof. Dr. MARCOS DIAS FONTANA

2. Profa. Dra. ANGÉLICA DE FÁTIMA DE ASSUNÇÃO BRAGA

3. Prof. Dr. JOSÉ CARLOS COGO

4. Prof. Dr. ANTONIO CARLOS DE OLIEIRA

5. Prof. Dr. EDUARDO DIAS DE ANDRADE

"Há homens que lutam um dia e são bons

Há outros que lutam um ano e são melhores

Há aqueles que lutam muitos anos e são muito melhores

Mas há aqueles que lutam toda a vida

Estes são os "imprescindíveis"

Bertold Brecht

Dedico o meu trabalho aos meus pais, que sempre estiveram do meu lado, abdicando de todos seus sonhos em função dos meus, zelosos e lutadores pela minha felicidade

E uma mulher que carregava o filho nos braços, disse:
"Fala-nos dos filhos". "Vossos filhos não são vossos filhos.
São os filhos e as filhas da ânsia da vida por sí mesma.
Vem através de vós, mas não de vós.
Embora vivam convosco, não vos pertencem.
Podeis outorgar-lhes o vosso amor, mas não são vossos pensamentos, porque eles tem seus próprios pensamentos.
Podeis abrigar seus corpos, mas não suas almas,
Pois suas almas moram na mansão do amanhã, que vós não podeis visitar nem mesmo em sonho.
Podeis esforçar-vos por ser como eles, mas não procurareis fazê-lo como vós, porque a vida não anda para trás e não se demora com os dias passados.
Vós sois os arcos dos quais vossos filhos são arremessados como flechas vivas. O arqueiro mira o alvo na senda do infinito vos estica com toda a sua força para que suas flechas se projetem, rápido e para longe.
Que vosso encurvamento na mão do arqueiro seja a vossa alegria.
Pois assim como ele ama a flecha que voa, ama também o arco que permanece estável"

Kalil Gibran

À Deus

"Senhor, Mestre Divino, Pai de infinito amor recebe em teu coração pelas mãos de Maria, a alegre dádiva de minha gratidão filial, pelos benefícios infinitos,
que teu amor me prodigalizou, na longa caminhada...
Senhor, a tí confio meu futuro,
Concede-me exercer minha profissão com caloroso amor, fortaleza da alma e bondade de coração, firmeza de vontade para que, servindo, sejamos uma irradiação de imenso sol do teu insondável Amor".

Ao Toni, que nestes quatro anos não deixou que eu esmorecesse, mesmo nas situações mais difíceis...

"Foste presença na minha solidão
mas respeitastes a minha maneira única de amar.
A tua presença, tua companhia, o teu sorriso,
as tuas palavras e mesmo a tua ausência, foram expressão do amor profundo.
Quando eu sofri, tu sofreste comigo,
sem dizeres nada.
Fizeste-me entender que o amor é irmão gêmeo
da dor e experimentei a alegria íntima de tua renúncia,
Alegria que jamais havia imaginado experimentar".

Agradecimentos:

Ao professor Marcos Dias Fontana, que orientou-me, apoiou-me e foi fundamental na realização deste trabalho.

Teus sábios conhecimentos ordenados são nossas heranças conquistadas.
Não tenho o sempre, mas a vitória e as asas do tudo
São uma luz branca de energia que construirá nas areias do tempo um portal para o futuro.
"Mestre, meus pensamentos estarão sempre convosco, no agradecimento e na recordação"

Ao professor Stephen Hyslop

'Minha gratidão à você que, sua colaboração e apoio, tornaram-se imprescíndiveis para que se concretizasse este trabalho. Com seu exemplo de humildade deu-me informação e formação, e sobretudo além do ensinamento puro e simples, uma parte de você.

Sinto dificuldades na tarefa de elencar os meus agradecimentos, pois certamente cometerei omissões, muito provavelmente imperdoáveis, uma vez que, tantas pessoas colaboraram das mais variadas formas para a realização deste trabalho, e não só contribuíram para minha formação profissional, mas também pessoal.

À todos os meus familiares que com seu carinho e afeto sempre foram um alicerce na minha vida.

A todos os amigos do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que de formas distintas colaboraram para a realização deste trabalho

À Francine e Marielga pela convivência, amizade, companheirismo e apoio, que tornaram os meus dias mais fáceis e agradáveis, o meu muito obrigado de coração.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, que sempre foram sempre solícitos e compartilharam seus conhecimentos comigo.

Ao Professor Doutor Pedro Rosalen que depositou-me confiança e colaborou para a finalização deste projeto.

Ao Departamento de Farmacologia da FOP - UNICAMP, que permitiu que este projeto pudesse ser concluído.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Odontologia da UNICAMP, pelo convívio, acolhida e ensinamentos que sempre me dispensaram.

À Capes e ao Faep, pelo suporte financeiro, necessários a realização deste projeto.

Aos técnicos do Departamento de Farmacologia (F.C.M.), que sempre dispostos colaboraram com este projeto.

Hoje eu gostaria que vós vibrastes comigo.
Não porque eu vencí, mas porque vencemos mais um desafio em nossas vidas.
E que diante dos próximos, Deus nos permita estarmos juntos, para mais fortes podermos enfrentá-los.

Sumário

Lista de Abreviações

Lista de Ilustrações

Lista de Materiais

Resumo

1-Introdução 01

2-Objetivos 13

3-Materiais e Métodos 15

3.1-Animais 15

3.2-Venenos 15

3.3-Estudos farmacológicos 16

3.3.1-Letalidade 17

3.3.2-Preparação nervo frênIco-diafragma de rato 17

3.3.3-Atividade sobre os "twitches" 18

3.3.4-Estudo dos potenciais bioelétricos 19

Descrição sumária da aparelhagem eletrofisiólogica 20

3.3.5-Potencial de membrana 23

3.3.6-Potencial de placa terminal em miniatura 24

3.3.7-Atividade sobre as contrações auriculares espontâneas 25

3.3.8-Preparação de *biventer-cervicis* de pintainho 25

3.3.9-Pressão arterial em ratos 26

3.4-Estudos bioquímicos 28

3.4.1-Atividades enzimáticas 28

Atividade proteolítica 28

Atividade hialuronidásica 29

3.4.2-Fracionamento 29

4-Resultados 33

5-Discussão 65

6-Conclusão 79

7-Summary 83

8-Referências bibliográficas 85

Lista de Abreviações

ACh: acetilcolina

d-Tc: d-tubocurarina

Me: microeletrodo

Mv: milivolts

T.b.: *Tityus bahiensis*

T.s.: *Tityus serrulatus*

µg: micrograma

mg: miligrama

kg: kilograma

V: volts

Hz: hertz

Lista de Ilustrações

- Figura 1- Esquema do circuito para registro eletrofisiológico dos potenciais bioelétricos.

- Figura 2- Registro miográfico do efeito dos venenos de *Tityus bahiensis* (1,25 μg/ml) e *Tityus serrulatus* (1,25 μg/ml) no diafragma de rato.

- Figura 3- Registro miográfico do efeito do veneno de *Tityus bahiensis* (2,5 μg/ml e 5,0 μg/ml) no diafragma de rato.

- Figura 4- Registro miográfico do efeito do veneno de *Tityus serrulatus* (2,5 μg/ml e 5,0 μg/ml) no diafragma de rato.

- Figura 5- Efeito do antagonismo do veneno de *Tityus bahiensis* (2,5 μg/ml), no diafragma de rato curarizado (d-Tc, 1,46 μM)

- Figura 6- Efeito do antagonismo do veneno de *Tityus serrulatus* (2,5 μg/ml), no diafragma curarizado (d-Tc, 1,46 μM).

- Figura 7- Efeito dos venenos de *Tityus bahiensis* (2,5 μg/ml) e *Tityus serrulatus* (2,5 μg/ml) sobre os "twitches" do diafragma de rato.

- Figura 8- Efeito dos venenos de *Tityus bahiensis* (2,5 μg/ml) e *Tityus serrulatus* (2,5 μg/ml) sobre os "twitches" do diafragma de rato curarizado (d-Tc).

- Figura 9- Efeito dos venenos de *Tityus bahiensis* (2,5 μg/ml) e *Tityus serrulatus* (2,5μg/ml), sobre o potencial de membrana do diafragma de rato.

- Figura 10- Efeito dos venenos de *Tityus bahiensis* (2,5 μg/ml), e *Tityus serrulatus* (2,5 μg/ml), sobre o potencial de membrana do diafragma de rato curarizado (d-Tc).

- Figura 11- Registro do potencial de placa terminal em miniatura em presença do veneno de *Tityus bahiensis* (2,5 μg/ml), do diafragma de rato.

- Figura 12- Registro do potencial de placa terminal em miniatura em presença do veneno de *Tityus serrulatus* (2,5 μg/ml),do diafragma de rato.

- Figura 13- Registro das contrações auriculares, em presença dos venenos de *Tityus bahiensis* (2,5 μg/ml) e *Tityus serrulatus* (2,5 μg/ml), da preparação de aurícula isolada de cobaia.

- Figura 14- Registro das respostas musculares da preparação *biventer cervicis* de pintainho em presença do veneno de *Tityus bahiensis* (1,25 μg/ml, 2,5 μg/ml e 5,0 μg/ml).

- Figura 15- Registro das respostas musculares da preparação *biventer cervicis* de pintainho em presença do veneno de *Tityus serrulatus* (1,25 μg/ml, 2,5 μg/ml e 5,0 μg/ml).

- Figura 16- Registro da pressão arterial de rato em presença do veneno de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*.

- Figura 17- Curva concentração da atividade hialuronidásica dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*.

- Figura 18- Perfil do fracionamento dos venenos de *Tityus serrulatus* e de *Tityus bahiensis*.

- Figura 19- Efeito neuromuscular da fração de *Tityus bahiensis* (pico 13), em preparação de diafragma de rato.

- Figura 20- Efeito neuromuscular da fração de *Tityus bahiensis* (pico 12), em presença da preparação de diafragma de rato.

- Figura 21- Efeito neuromuscular da fração de *Tityus bahiensis* (pico 8) , em presença da preparação de diafragma de rato.

- Figura 22- Efeito neuromuscular da fração de *Tityus serrulatus* (pico 12), em presença da preparação de diafragma de rato.

- Figura 23 - Efeito neuromuscular da fração de *Tityus serrulatus* (pico 10), em presença da preparação de diafragma de rato.

- Figura 24 - Efeito neuromuscular da fração de *Tityus serrulatus* (pico 8), em presença da preparação de diafragma de rato.

- Figura 25 – Efeito neuromuscular das frações purificadas de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*.

Lista de Materiais

Acetilcolina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Ácido acético	Merck do Brasil
Ácido clorídrico	Reagen
Ácido hialurônico	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Acrilamida	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Amônio	Merck do Brasil
β-Alanina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Bicarbonato de sódio	Carlo Erba -Itália
Cloreto de cálcio	Merck do Brasil
Cloreto de magnésio	Merck do Brasil
Cloreto de potássio	Merck do Brasil
Cloreto de sódio	Merck do Brasil
d-Tubocurarina	ABBOT- Laboratórios do Brasil, Ltda, Fabrik – Busch, SG.F
Glicose	Merck do Brasil
Hidrato de cloral	Pentofarma Ltda, Brasil
Persulfato de amônio	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Neostigmina: Prostigmine	Laboratórios Roche – Química Farmacêutica S.A – Brasil
Àcido tricloroacético	Reagen
Tetrametiletilenodiamina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Sephadex: resina	Pharmacia – Suécia

Resumo

O presente trabalho relata uma comparação entre as duas principais espécies de escorpião de importância médica: *T. serrulatus* e *T. bahiensis.* O estudo dos acidentes escorpiônico é muito importante devido sua gravidade e freqüência que ocorrem.

O estudo comparativo dos venenos de escorpião *T. bahiensis* e *T. serrulatus* foi dividido em duas partes. Primeiramente o estudo farmacológico em preparações isoladas (preparação nervo frênico-diafragma de rato, aurícula isolada, *biventer cervicis* de pintainho), além de pressão arterial de rato e dose mediana letal em camundongos. Nestes experimentos utilizou-se o veneno de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* nas mesmas doses para estabelecer uma comparação de seus efeitos. A segunda parte do trabalho: estudos bioquímicos com estes venenos. Foi realizado estudos sobre atividades enzimáticas destes venenos (atividade proteolítica e hialuronidásica) e o fracionamento destes venenos através de cromatografia por gel filtração. Os principais picos destes fracionamentos foram testados em preparação nervo frênico-diafragma de rato, para verificação da atividade neuromuscular destas frações.

Em preparações isoladas nervo frênico-diafragma de rato e preparação de *biventer cervicis* de pintainho os venenos comportaram-se de maneira semelhante, na preparação de aurícula isolada de cobaia e pressão arterial de rato pode-se constatar uma discreta diferença para o veneno de *T.bahiensis,* este promovia uma bradicardia e hipotensão mais acentuadas do que o veneno de *T.*

serrulatus. Além disso, em preparações nervo frênico diafragma de rato onde foi analisado a atividade dos venenos sobre os "twitches " o veneno de *T. bahiensis* demonstrou ser mais ativo nas preparações que haviam sido previamente curarizadas (d-Tc 14,6 μM), pois induziu o aparecimento de contra'~oes espontâneas e aumento no tempo de relaxamento.

Em termos de letalidade o veneno de *T. serrulatus* mostrou-se mais potente que o veneno de *T.bahiensis*, também revelou ser mais potente no antagonismo do bloqueio neuromuscular em preparações curarizadas pela d-Tc (1,46 μM).

A atividade hialuronidásica demonstrou níveis parecidos para ambos venenos, o que leva a crer que os venenos em estudo tenham um bom fator de difusão nas membranas. Quanto à atividade proteolítica, não foi encontrada nos dois venenos.

O perfil do fracionamento foi diferente para ambos venenos, porém suas frações reproduziram os mesmos efeitos: aumento na amplitude das contrações, contrações espontânes, contraturas e bloqueio neuromuscular. Todos estes efeitos também foram visualizados com o veneno total.

Nossos resultados sugerem que, as duas espécies de escorpião possuem uma taxonomia relativa, porém contém toxinas diferentes que exercem efeitos farmacológicos similares sobre preparações neuromusculares.

1-INTRODUÇÃO

Em algumas regiões – Norte da África (Marrocos, Algéria, Tunísia), Egito, Turquia, Israel, Arábia Saudita, o escorpionismo assume importância igual ou superior à do ofidismo por sua freqüência e gravidade. No México, Austrália, alguns países do Velho Continente, os acidentes são também assaz freqüentes, constituindo sério problema de saúde pública, o Brasil também inclui-se neste grupo. Nessas regiões são referidos milhares de acidentes anuais, e dependendo da etiologia, uma significativa porcentagem de óbitos.

Investigações tem sido realizadas com os venenos de escorpiões, dentre eles: os brasileiros *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*, os africanos *Androctonus australis Hector* e *Leiurus quinquestriatus*, o mexicano *Centruroides suffusus*, o norte americano *Centruroides sculpturatus*, assim como a purificação de suas toxinas (BECERRIL *et al*, 1996).

O estudo dos acidentes escorpiônicos é importante devido a sua gravidade e em virtude da grande freqüência com que ocorrem, principalmente em crianças. As picadas atingem predominantemente os membros superiores, 65% das quais mão e antebraço.

No Brasil, algumas regiões não possuíam um estudo adequado e projeção verdadeira sobre as estatísticas do envenenamento e morte. A partir da implantação da notificação dos acidentes escorpiônicos no Brasil, em 1988, verificou-se aumento significativo do número de casos. O Ministério da Saúde indicou neste mesmo ano, a ocorrência de cerca de 80000 acidentes/ano, com um coeficiente de incidência de aproximadamente 3 casos/100.000 habitantes.

O maior número de acidentes é proveniente dos Estados de Minas Gerais

e São Paulo, responsáveis por 50% do total. Tem sido registrado aumento significativo de dados provenientes dos estados da Bahia, Rio Grande do Norte, Alagoas e Ceará.

As principais espécies de escorpiões de importância médica no Brasil pertencem ao gênero *Tityus* são: *T. serrulatus*, responsável por acidentes de maior gravidade, e ainda *T. bahiensis* e *T. stigmurus.*

A distribuição geográfica destes é a seguinte: *Tityus serrulatus* – Bahia , Espírito Santo, Goiás, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo, *Tityus bahiensis*– Goiás, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina; *Tityus stigmurus* localiza-se somente na região Nordeste do Brasil. Na região Sudeste, a sazonalidade é semelhante à dos acidentes ofídicos, ocorrendo a maioria dos casos nos meses quentes e chuvosos.

Segundo NISHIKAWA *et al* (1994), os escorpiões *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* são os principais causadores de acidentes em nosso país, cerca de 80% dos casos de escorpionismo.

Embora medidas tenham sido empregadas para diminuir os casos de envenenamento, os acidentes perduram, principalmente em algumas cidades do país em que *Tityus serrulatus* há muito tempo não era encontrado como São Paulo e Brasília. A reprodução partenogenética de *Tityus serrulatus*, multiplicação muito rápida, constitui seguramente um dos fatores de sua disseminação (LOURENÇO & CUELLAR, 1995).

BUCARETCHI *et al* (1996) registraram 203 casos na região de Campinas por acidentes de *Tityus bahiensis* e 32 por *Tityus serrulatus.* Analisando outros

relatos, temos que BÜCHERL (1969) observou que dos 743 acidentes escorpiônicos onde o agente foi identificado, atendidos no Hospital Vital Brazil, no período de 1954 a 1965, apenas 5,8% foram devido ao *Tityus serrulatus*, enquanto que 94,2% foram por *Tityus bahiensis*. Os acidentes causados por *Tityus bahiensis* e *Tityus stigmurus* são, de modo geral, menos graves. É interessante registrar que cidades como São Paulo e Campinas em que no passado, *T. bahiensis* era a única espécie de *Tityinae* encontrada, estão sendo invadidas pelo *T .serrulatus* , de hábitos mais domésticos e veneno mais potentes.

Os acidentes escorpiônicos têm como principais sintomas: dor local, acompanhada de parestesia, surgimento de manifestações sistêmicas: hipo ou hipertermia, sudorese profusa, prostração, diaforese, taquicardia, náusea, vômitos, sialorréia, dor abdominal acompanhada de diarréia, arritmias cardíacas, hipertensão ou hipotensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva e choque. Além destes, ainda pode apresentar: taquipnéia, dispnéia e edema pulmonar agudo, distúrbios neurológicos como agitação, sonolência, confusão mental, hipertonia e tremores.

Um acidente escorpiônico pode ser grave dependendo de fatores, como a espécie, tamanho do escorpião (a quantidade de veneno inoculada), massa corporal do acidentado e sensibilidade do paciente. A evolução dos sintomas depende do diagnóstico precoce, o tempo decorrido entre a picada e a administração do soro e manutenção das funções vitais.

FREIRE-MAIA, CAMPOS & AMARAL (1994), realizaram um estudo com 3866 pacientes com envenenamento escorpiônico, dos quais estão envolvidos

envolvidos crianças (27%) e adultos (73%). Entre o grupo dos adultos o acidente foi caracterizado benigno, porém no grupo das crianças foram considerados envenenamentos severos. A mortalidade registrada foi 1% para crianças e 0,28% no total do número de pacientes. Os óbitos foram relacionados à complicações como edema pulmonar agudo e choque.

BUCARETCHI *et al* (1995), relataram de janeiro de 1984 a maio de1994 em um estudo realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, 239 casos de acidentes por picada de escorpião. Destes 15,1% por *Tityus serrulatus* e 84,9% por *Tityus bahiensis*, sendo 14 casos de envenenamento severo por *Tityus serrulatus* e 3 por *Tityus bahiensis.* Os pacientes com envenenamento severo apresentaram em geral: vômitos, diarréia, taquicardia, taquipnéia, hipo e hipertensão arterial, aumento na taxa de leucócitos, hipopotassemia, aumento na liberação de enzima creatinino-quinase, nos casos mais sérios edema pulmonar e choque.

De maneira geral, o tratamento básico dos acidentes foi a administração venosa de soro antiescorpiônico, preparado pela primeira vez, por TOOD no Cairo em 1909 e por VITAL BRAZIL (1918) independentemente na segunda década do presente século. A partir de 1936, a sua obtenção expandiu-se gradativamente sendo hoje preparado na África (Algéria, Marrocos, Tunísia, África do Sul), Àsia (Turquia, Israel, Teeran, Índia), Europa (Inglaterra) e nas Américas (México e Brasil). Há quase unanimidade no reconhecimento de seu efeito benéfico sobre a evolução do envenenamento e da necessidade de seu emprego em acidentes graves. Além disso, suporte das funções vitais, medidas que visam

o tratamento da dor, na maioria das vezes lancinantes, com injeção intravenosa de dipirona e infiltração na região da picada de anestésico local, dos vômitos com metoclopramida e da hipertermia com injeção de dipirona.

Alguns distúrbios comuns ao envenenamento como: arritmias cardíacas emprega-se a atropina na vigência de bradicardia severa (causada por parada sinusal ou bloqueio átrio-ventricular), para o tratamento de edema pulmonar o oxigênio e injeção intravenosa de furosemida na ausência de desidratação. Uso de fenoxibenzamina ou prasozin para a hipertensão arterial e a dobutamina ou dopamina para o choque circulatório.

As pesquisas pioneiras de VITAL BRAZIL (1907,1918) e de MAURANO (1915) foram realizadas em épocas que as duas espécies de escorpião eram confundidas sob a denominação de *Tityus bahiensis*. Somente em 1922 a espécie de *Tityus serrulatus* foi descrita por LUTZ & MELLO.

BÜCHERL em 1954 e 1969 determinou em camundongos as doses medianas letais dos venenos das duas espécies de *Tityus* injetados por via venosa e subcutânea. Verificou que enquanto a diferença de toxicidade da peçonha de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* era pequena, provavelmente não significante, quando administrada por via venosa (*T. b.* 750 μg/Kg; *T. s.* 600 μg/Kg; *T. b/T. s.* 1,25). A toxicidade da peçonha de *Tityus serrulatus* mostrou-se consideravelmente maior quando os venenos foram injetados por via subcutânea nos camundongos (*T. b.* 1350 μg/Kg; *T. s.* 650 μg/Kg, *T. b./T. s.* 2,1).

Mais recentemente, NISHIKAWA *et al* (1994) investigaram em camundongos e cobaias a toxicidade do veneno de escorpiões de várias regiões

do Brasil. Registraram os seguintes valores das doses medianas letais em camundongos por via intraperitonial, dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* (*T. b.* 1062 μg/Kg, *T. s.* 1160 μg/Kg e *T. b./T. s.* 0,92). Ao contrário do que se esperava, em cobaias quando o veneno injetado de *T. bahiensis* mostrou-se duas vezes mais tóxico do que o de *T. serrulatus* (*T. b.* 126 μg/kg, *T. s.* 250 μg/kg, *T. b./T. s.* 0,5).

O envenamento escorpiônico tem sido alvo de investigação devido sua gravidade, freqüência, alterações hemodinâmicas e distúrbios cardíacos, este últimos que acometem os pacientes envenenados e trazem sérios problemas . Os distúrbios cardiovasculares geraram curiosidades e vários estudos foram realizados em relação a estas alterações.

CORRADO, ANTÔNIO, & DINIZ, (1968), verificaram em coração isolado de cobaias que o veneno de *Tityus serrulatus* causava bradicardia seguida de aumento na força de contração, esses efeitos foram vistos a uma concentração de 10 a 20 μg/kg. Quando em doses maiores a bradicardia tornava-se mais pronunciada e interferia com o efeito inotrópico positivo. Este efeito do veneno tornava-se muito resistente à taquifilaxia quando o coração era perfundido com propranolol ou bretílio. Também o inotropismo positivo era ausente em corações reserpinisados. Observou-se que, o veneno de *Tityus serrulatus* potencializa a resposta hipertensiva do cão, devido ao aumento da liberação de catecolaminas.

CORRADO, RICCIOPPO, & ANTONIO, (1974), observaram que a resposta hipertensiva do veneno de escorpião permanecia inalterada mesmo em animais adrenalectomisados, e não afetada pelo hexametônio. O aumento da

pressão arterial sangüínea pelo veneno de *Tityus serrulatus* era completamente ausente em animais tratados com bloqueadores alfa-adrenérgico e em animais reserpinizados, sugerindo que o veneno agia diretamente na liberação de catecolaminas pós-ganglionares.

CORRADO, DINIZ & ANTONIO, (1975), demonstraram que a injeção intravenosa do veneno de *Tityus serrulatus* em cães, gatos e coelhos anestesiados, produz aumento na pressão arterial, seguido de hipotensão arterial. A atropina potencializa a hipertensão e previne uma queda inicial da pressão arterial tão bem como a bradicardia produzida pelo veneno. O veneno de *T. serrulatus* é capaz de liberar a acetilcolina e noradrenalina do sistema nervoso autônomo e somático. CORRADO *et al* (1975), verificaram ainda, o aumento na contração de músculo liso de cobaia e íleo de rato pela presença da toxina de *Tityus serrulatus*, este efeito era potencializado pela neostigmina e bloqueado pela morfina.

O veneno de *Tityus serrulatus* também foi estudado quanto aos seus efeitos em músculo esquelético. JAIMOVICH *et al* (1982), observaram alterações sobre os "twitches" em presença de *Tityus serrulatus*, aumento na amplitude das contrações, capaz de restaurar a transmissão neuromuscular bloqueada pela d-Tc. O mesmo foi observado com o veneno de *Centruroides sculpturatus.*

O aumento da amplitude das contrações musculares também foi observado por CORRADO *et al* (1975), que ainda verificaram que o mesmo não ocorria em preparações de músculo esquelético curarizadas e desnervadas. A liberação de ACh pelo veneno é completamente bloqueada pela Tetrodotoxina, demonstrando-

se que o veneno de escorpião *Tityus serrulatus*, produz uma despolarização sustentada da membrana nervosa.

BARHANIN *et al* (1983), verificaram que, o veneno de *Tityus serrulatus* facilita a transmissão neuromuscular e a tensão dos "twitches", também aumenta a freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura e causa redução transitória de potencial de membrana.

A ação do veneno de escorpião *Tityus serrulatus* em músculo esquelético também foi estudada por BARHANIN *et al* (1982), sobre o potencial de membrana e o potencial de ação. Demonstrou que o veneno causava aumento na duração do potencial de ação, causava despolarização e as atividades espontâneas eram abolidas com substituição do sódio e íons de colina, verificando então que o sódio abolia os efeitos do veneno.

BARHANIN *et al* (1984), verificaram que as toxinas de *Tityus serrulatus*, inativavam o canal de sódio (ARANTES *et al*, 1994), assim como a sua afinidade por sinaptossomas de cérebro de rato. A toxina de *Centruroides sculpturatus* competia com a de *Tityus serrulatus* pela afinidade aos receptores na ligação aos sinaptossomas do cérebro de rato.

Ainda comparando-se os efeitos de *Tityus serrulatus* com *Centruroides sculpturatus*, BARHANIN *et al* (1984) demonstraram que *Tityus serrulatus* em membrana cerebral de rato produzia bloqueio no canal de sódio, diminuia a corrente de sódio dos túbulos T e acoplamento excitação contração, mas não alterava a duração do potencial de ação, enquanto que, o veneno de *Centruroides sculpturatus* agia em canal de sódio em músculo esquelético de rã mas não

possuía nenhum efeito nos túbulos T.

Todos os distúrbios que o veneno de escorpião acarreta em sua maioria são devidos à liberação de neurotransmissores, acetilcolina e catecolaminas pelas terminações nervosas dos nervos autonômicos e pela supra-renal. As lesões cardíacas provocadas pelo veneno escorpiônico de *Tityus serrulatus*, são devido a liberação de altas doses de adrenalina. Essa liberação é devida a ativação ou retardo na inativação do canal de sódio voltagem dependente. Em virtude desta ação as neurotoxinas induzem a despolarização da membrana das terminações nervosas ou prolongam a despolarização provocada pelo potencial de ação. Em conseqüência o canal de cálcio voltagem dependente das terminações nervosas é ativado e há um influxo deste íon, que provoca a liberação do neurotransmissor. DINIZ & TORRES (1968), verificaram que a contração do íleo de cobaia produzida pela peçonha de *Tityus serrulatus* é devida a liberação de acetilcolina pelas terminações nervosas e não por interação com receptores muscarínicos. Por outro lado VITAL BRAZIL, NEDER, & CORRADO, (1973), demonstraram que, o veneno de *Tityus serrulatus* induz a liberação de acetilcolina no hemidiafragma inervado de rato e não o faz no hemidiafragma cronicamente desnervado e que essa liberação de acetilcolina é inibida por substâncias que bloqueiam competitivamente o influxo de cálcio nas terminações nervosas (Magnésio e neomicina).

O estudo das ações farmacológicas dos venenos escorpiônicos e suas frações revelou que estes são capazes de promover efeitos em vários sistemas e órgãos de diversas espécies animais. Em virtude da gravidade do

envenenamento escorpiônico, o interesse pelo estudo das frações das toxinas escorpiônicas tem sido alvo de investigações dos cientistas, principalmente do veneno de *Tityus serrulatus*, porém no que tange ao envenenamento escorpiônico por *Tityus bahiensis* e suas toxinas torna-se escasso na literatura médica.

As toxinas do veneno de escorpião tem sido classificadas de acordo com seu efeito sobre a excitabilidade das células e canais iônicos. Os venenos de escorpião do velho mundo contém toxinas que agem sobre os canais de sódio voltagem dependentes, são designados como alfa toxinas. As espécies consideradas do novo mundo, contém toxinas que agem no canal de sódio afetando a ativação do potencial ação são conhecidas como beta toxinas.

A tityustoxina, fração purificada do veneno do *Tityus serrulatus*, isolada por GOMES & DINIZ (1966) é uma neurotoxina que atua nas terminações nervosas periféricas, estimulando fibras pós-ganglionares dos sistemas simpático e parassimpático, ocorrendo liberação de acetilcolina, noradrenalina e também da adrenalina, responsáveis pela maior parte dos sinais e sintomas clínicos do envenenamento escorpiônico.

O veneno de escorpião *Tityus serrulatus* é basicamente composto por mucopolissacarídeos, proteínas de baixo peso molecular, ácido hialurônico e neurotoxinas. As neurotoxinas que são os componentes mais importantes do veneno, são polipeptídeos de baixo peso molecular, por isso a rápida ação neurotóxica, que causa ativação adrenérgica e colinérgica que afetam canais de sódio, cloro e potássio de várias células. As vítimas do envenenamento exibem os primeiros sintomas que envolvem o sistema nervoso central (COUTINHO-

NETO *et al,* 1980; GOMEZ & FARREL, 1985) e por isso exibem convulsões e desmaios, podendo levar à morte por paralisia respiratória (SANDOVAL & DORCE, 1992).

POSSANI *et al* (1977) verificaram o alto grau de toxicidade do veneno de escorpião dado pela grande presença de polipeptídeos neurotóxicos. O veneno de escorpião *Tityus serrulatus* foi separado em duas frações neurotóxicas. A tityustoxina descrita como uma proteína de 61 resíduos básicos, tendo a lisina como aminoterminal. Além desta, a toxina gama, caracterizada como a mais tóxica. Realizou testes com as duas frações, elaborando cromatografia, eletroforese, atividades enzimáticas, DL_{50} e seqüenciamento a fim de caracterizar as principais frações de *Tityus serrulatus*.

Segundo BARHANIN *et al* (1982), encontraram semelhança na descoberta de POSSANI (1977), dois tipos de toxinas (alfa e beta) foram caracterizadas do veneno de escorpião *Tityus serrulatus*, de acordo com sua ligação específica a 3 ou 4 sítios, respectivamente, sobre os canais de sódio voltagem-dependente de sinaptossomas de cérebro de rato.

Uma nova toxina de *Tityus serrulatus* foi sequenciada por BECHIS *et al* (1982), Ts VII que é uma (-toxina, esta toxina que primeiramente foi isolada como toxina II que foi parcialmente caracterizada por TOLEDO & NEVES (1976). Outras novas toxinas foram isoladas e seqüenciadas, tal como a toxina gama por POSSANI, 1981,1985, 1991), TI-VIII por SAMPAIO, LAURE & GIGLIO, (1983), todas possuindo a mesma composição de seqüência NH_2 terminal. A toxina *Tityus serrulatus* VII, possui alta afinidade por quatro sítios do canal de sódio

(BARHANIN *et al* 1982, De LIMA *et al*, 1986).

ARANTES *et al* (1989), isolaram e caracterizaram a TsTX-IV, uma nova neurotoxina de *Tityus serrulatus*. A toxina TsTx-IV foi obtida através cromatografia por troca iônica, que demonstrou prolongar o potencial de ação em fibras mielinizadas de nervo vago de coelho, além disso verificou-se o efeito hipertensor, também observado com o veneno total.

ARANTES *et al* (1994), continuaram o isolamento das neurotoxinas de *Tityus serrulatus*, através de cromatografia por gel filtração, um procedimento simples que também produzia a toxina gama. Além da toxina gama, identificou uma nova toxina a TsTX-V. Esta induzia queda do potencial de membrana, que prolongava a inativação dos canais de sódio em fibras mielinizadas de nervo vago de coelho.

Segundo POSSANI (1991), o veneno de *Tityus bahiensis* possui toxinas semelhantes à tityustoxina e à toxina γ. TREQUATRINI *et al* (1995) isolaram e pesquisaram o modo de ação da toxina do veneno de *Tityus bahiensis* para a qual propuseram a denominação de toxina IV-5b por apresentar seqüência de aminoácidos N-terminais idêntica à da toxina IV -5 (tityustoxina) de *Tityus serrulatus* e atuar como esta retardando a inativação do canal de sódio.

As toxinas do veneno de escorpião *Tityus serrulatus* foram largamente estudadas, do contrário não ocorre o mesmo com as toxinas do veneno de *Tityus bahiensis* que foram pouco exploradas e não constam em literatura médica descritas de modo detalhado.

2-OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi comparar os efeitos dos venenos de escorpião, das principais espécies de importância médica do país: *Tityus serrulatus* e de *Tityus bahiensis*, bem como de suas principais toxinas, na junção neuromuscular.

Comparou-se também a capacidade dos venenos de liberar acetilcolina e noradrenalina em várias preparações, principalmente na pressão arterial de rato, além do estudo bioquímico destes venenos, como o fracionamento e a verificação das suas atividades enzimáticas.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-Animais

Ratos machos Wistar (±180 g) e camundongos machos Swiss (±20 g) foram obtidos da Central de Bioterismo – (CEMIB), da UNICAMP. Pintainhos da linhagem HY LINE W 36 com idade entre 4 e 10 dias, foram fornecidos pela granja ITO S/A, Campinas, SP. Cobaios machos (350 g), obtidos do Laboratório de Referência Animal (LARA), Campinas, SP.

Todos os animais mantidos com acesso à ração Purina® e água *ad libitum*, em biotério com temperatura de 25 ± 2°C e ciclo diurno:noturno de 12 horas.

3.2-Veneno

Os venenos dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis* foram adiquiridos do Instituto Butantan. Estes venenos foram coletados por estimulação elétrica de espécimes na Seção de Artrópodes Peçonhentos do Instituto.

Estes venenos estavam na forma liofilizada, foram devidamente armazenados em frascos, acondicionados em dessecador e colocados em geladeira na temperatura de ± 5°C.

3.3-Estudos farmacológicos:

O estudo comparativo da toxicidade dos venenos de *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* foi efetuado nas preparações nervo frênico-diafragma de rato, aurícula isolada de cobaia, *biventer cervicis* de pintainho, pressão arterial de rato. Além destes experimentos, calculou-se a dose mediana letal (DL_{50}) em camundongos.

Na preparação nervo frênico-diafragma de rato verificou-se o efeito dos venenos sobre a amplitude das contrações musculares. A amplitude das contrações musculares também foi observada em preparações curarizadas (d-tubocurarina, 14,6 μM) sob estimulação elétrica do músculo, em presença dos dois venenos. Pesquisou-se também o efeito dos venenos sobre os potenciais: de membrana e de placa terminal em miniatura.

O efeito dos venenos de escorpião também foi avaliado sobre os "twitches" (contração isolada) tanto na preparação nervo frênico-diafragma de rato como em preparação nervo frênico-diafragma de rato curarizada (d-Tc, 14,6 μM). Pesquisou-se em diafragma de rato o antagonismo dos dois venenos sobre o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina (1,46 μM) .

A determinação da significância da diferença entre as médias foi feita usando-se a análise de variância, com nível de significância de 1%, seguido do teste de Dunett, de comparações múltiplas.

3.3.1-Letalidade

Determinou-se as doses medianas letais (DL_{50}) dos dois venenos por via venosa em camundongos (18-20 g). Usou-se quatro doses em progressão geométrica de razão 1,25 e seis animais por dose. As doses medianas letais e seus intervalos ao nível fiducial de 95% foram calculados pelo método de WEIL (1952).

3.3.2-Preparação nervo frênico-diafragma de rato

Foram usados ratos brancos Wistar de 180 a 200 g de peso. Após anestesia geral dos animais pelo hidrato de cloral (240 mg/kg por via intraperitonial) e sangria por secção dos vasos do pescoço, procedeu-se a retirada e montagem do segmento do hemidiafragma esquerdo com uma porção do nervo frênico correspondente, de acordo com a técnica descrita por BÜLBRING (1946).

O músculo de forma triangular foi fixado por sua base em suporte apropriado (o qual permite através de eletrodos de platina estimular o nervo ou diretamente o músculo) e o vértice correspondente à sua porção tendinosa foi fixado a um fio através de um transdutor Myograph F60 em fisiógrafo Narco Bio System tipo Narco trace 40 ligado a um acoplador universal tipo 7159, cuja tensão dada foi de 2,5 g/cm para registro das contrações musculares. O volume do banho foi de 30 ml e sua temperatura mantida à 37°C. Oxigenou-se a preparação

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

pelo borbulhamento de carbogênio (95% O_2 + 5% CO_2) no banho. Como meio nutritivo usou-se solução de Tyrode com as seguintes concentrações (em mM): NaCl 137; KCl 2,7; $CaCl_2$ 1,8; $NaHCO_3$ 11,9 mg; $NaHPO_4$ 0,3 e glicose 11,0.

Na estimulação elétrica indireta do diafragma utilizou-se pulsos retangulares supramaximais, freqüência de 0,1 Hz e duração de 0,2 milissegundos. Os estímulos foram fornecidos por um estimulador GRASS S88. Em experimentos realizados sob estimulação elétrica direta do músculo diafragma, usou-se estímulos com pulsos retangulares de 2 milissegundos de duração, 0,1 Hz de freqüência e voltagem maximal.

Em todos os experimentos utilizou-se o seguinte protocolo: estimulação elétrica do nervo frênico por 15 minutos (controle), à seguir adição do veneno nas doses de 1,25; 2,5 e 5,0 μg/ml, observando-se os efeitos do veneno durante 60 minutos.

Para observar o efeito antagônico das peçonhas sobre as preparação nervo frênico-diafragma de rato as preparações foram curarizadas (dTc, 1,46 μM), após bloqueio total, adicionou-se o veneno (2,5 μg/ml), os efeitos do qual foram observados durante 60 minutos sob estimulação elétrica indireta.

A dose de 2,5 μg/ml foi escolhida por prover resultados mais nítidos e consistentes, baseado em uma curva dose-resposta inicial (1,25 – 5,0 μg/ml). Os experimentos foram repetidos pelo menos por quatro vezes, total de cinco experimentos de cada série.

3.3.3-Atividade sobre os "twitches"

A atividade dos venenos (2,5 μg/ml) sobre os "twitches" provocados por excitação elétrica direta ou indireta foi avaliada em preparação nervo frênico-diafragma de rato na presença ou ausência de curare (14,6 μM). A duração da incubação com o veneno foi de 60 minutos.

3.3.4-Estudo dos potenciais bioelétricos

Descrição dos procedimentos:

Utilizou-se ratos brancos Wistar de 180-200g de peso, cujo hemidiafragma esquerdo foi retirado, segundo a técnica de BÜLBRING (1946). Estendeu-se o músculo e fixou-se com alfinetes apropriados com sua face torácica voltada para cima no fundo de uma cuba de perspex com 10 centímetros de comprimento, 5 centímetros de largura e 2 centímetros de profundidade. A cuba foi preenchida com 30 ml de solução de Tyrode, sendo a oxigenação da preparação feita pelo borbulhamento com carbogênio. Manteve-se a preparação à temperatura de 37°C.

Descrição sumária da aparelhagem eletrofisiológica

Os potenciais foram captados através de microeletrodo de vidro preenchido com solução de KCl 3 M. Os microeletrodos com resistência de 5 a 20 MΩ, foram preparados no próprio laboratório e conservados em geladeira. Para sua confecção, utilizaram-se tubos de vidro apropriados (capilares de vidro Clark que continham microcapilar interno para facilitar o preenchimento com KCl) e um estirador de microeletrodo "Microelectrode Puller", Model 8104 (Palmer).

O microeletrodo entrava em contato por sua extremidade posterior contido no seu interior KCl 3 M. Encaixava-se o microeletrodo em uma das extremidades deste suporte, saindo pela outra um fio condutor que unia o microeletrodo a um seguidor catódico através de um filamento de mercúrio. O pequeno tubo era sustentado pelo braço de um micromanipulador JENA acoplado a um microscópio estereoscópico Zeiss para aumento de até 40 vezes. Este equipamento permitia realizar pequenos deslocamentos verticais e horizontais, controlando assim o microeletrodo. O seguidor catódico estava posicionado próximo ao braço do micromanipulador e conectava-se ao canal do osciloscópio TEKTRONIX 5.103 N com módulos 5A 22N "differential ampl" e 5B 12N, " dual time base". O eletrodo indiferente, constituído por um tubo de vidro curvo preenchido com ágar, mantinha-se mergulhado de um lado no mercúrio e no outro em solução nutritiva. Estava ligado por meio de um fio condutor a um gerador de impulsos capaz de

fornecer sinais de 100, 20, 5, 1 e 0,2 mV. A preparação e toda a aparelhagem empregada permaneciam no interior de uma gaiola de Faraday montada sobre uma mesa rígida, fixada no solo a fim de evitar vibrações. O circuito descrito, apresenta-se no gráfico a seguir.

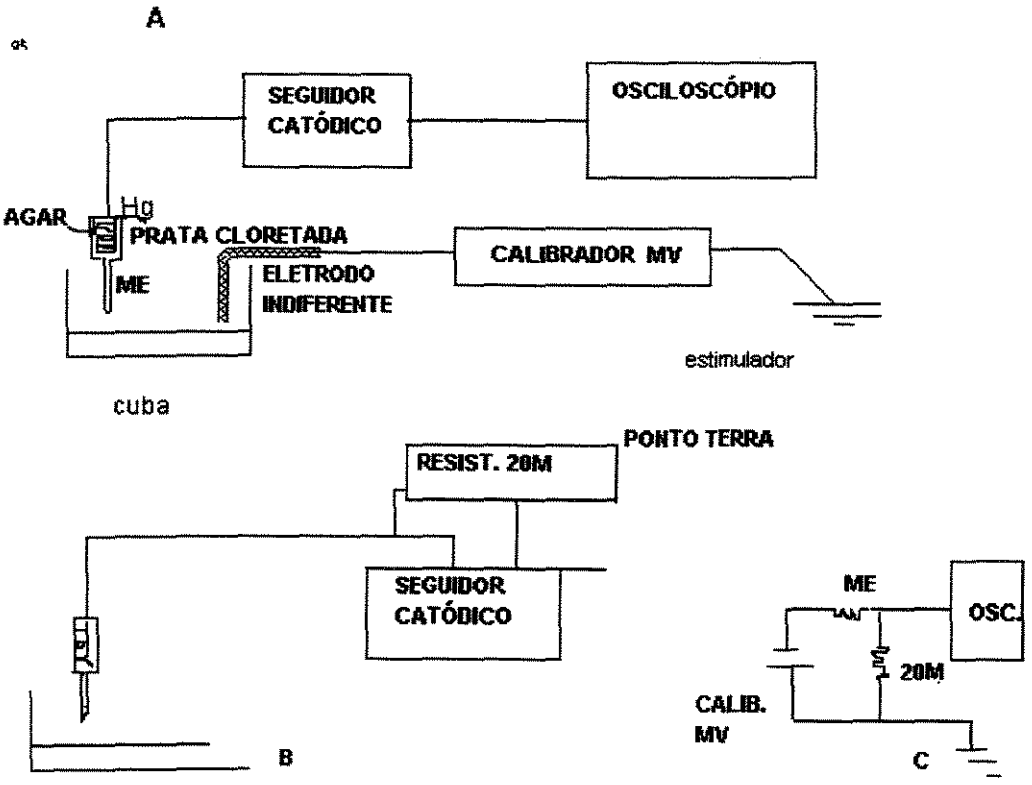

Figura 1- Esquema do circuito para registro eletrofisiológico dos potenciais bioelétricos.

A- esquema simplificado

B- esquema para obtenção de resistência do microeletrodo

C- circuito para medida da resistência do microeletrodo

PROCEDIMENTOS

Após ser retirado do seu suporte de estocagem, o microeletrodo era encaixado no suporte. Fixava-se o conjunto no braço do micromanipulador, ligando-se o fio condutor ao seguidor catódico.

Procedia-se à medida da resistência do microeletrodo mergulhando-o na solução nutritiva e introduzindo em paralelo no circuito uma resistência de valor conhecido (20 MΩ). Eram desprezados aqueles cuja resistência não compreendia entre 5 e 20 MΩ.

3.3.5-Potencial de membrana

A determinação do potencial de membrana (potencial de repouso) das fibras musculares foi feita da seguinte forma: sob o controle de microscópio, inseria-se o microeletrodo no interior de uma fibra muscular e media-se o deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da penetração. Repetia-se o mesmo procedimento em cinco fibras distintas em período não superior a um minuto, calculando-se a média aritmética das leituras realizadas. Determinava-se o potencial de repouso multiplicando-se o valor da média por um fator de correção (fc). Este era estabelecido introduzindo-se no circuito um sinal de 100 mV e medindo-se a deflexão correspondente no osciloscópio (fc=100/deflexão correspondente).

Estudou-se a atividade despolarizante dos venenos *T. serrulatus* e *T. bahiensis* nas regiões das placas terminais e extrajuncionais em preparações de diafragma de rato e em preparações curarizadas pela d-tubocurarina (d-Tc, 14,6 μM). Após a determinação da medida do potencial de membrana controle, adicionou-se o veneno ao banho na dose de 2,5 μg/ml e procediam-se as leituras aos 15, 30 ,45 e 60, 75 e 90 minutos.

3.3.6-Potencial de placa terminal em miniatura

Os potenciais de placa terminal em miniatura foram captados através da inserção do microeletrodo nas fibras musculares na região da placa motora na preparação diafragma de rato e registrados através do osciloscópio (sensibilidade 0,5-1,0 mV/cm). Nestes experimentos estudou-se a atividade das peçonhas de *T. serrulatus* e de *T. bahiensis* sobre a freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura.

Os potenciais de placa terminal em miniatura foram fotografados com filme "Polaroid" por meio de uma câmara de osciloscópio modelo C-5A. Os parâmetros controles foram definidos antes da adição do veneno. Os potenciais de placa terminal em miniatura foram registrados 5, 30, e 60 minutos após adição do veneno (2.5 μg/ml).

3.3.7-Atividade sobre as contrações auriculares espontâneas

Cobaios foram anestesiados com hidrato cloral na dose de 300mg/kg e seus corações rapidamente retirados e colocados em solução de Ringer Locke à temperatura ambiente. As aurículas, livres de outros tecidos, foram suspensas em banho de 40 ml com solução de Ringer Locke à 35°C, com borbulhamento de oxigênio e suas contrações espontâneas registradas em fisiógrafo Narco Trace Bio-System 40 através de transdutor miográfico "Linear Core F50". A composição da solução de Ringer-Locke foi (em g/l): NaCl 9,0; KCl, 0,42; $CaCl_2$, 0,24; $NaHCO_3$ 0,5; glicose 1,0. Testou-se os venenos, nas doses de 25 e 5,0 μg/ml.

3.3.8-Preparação do músculo *biventer-cervicis* de pintainho

A preparação seguiu a técnica descrita por GINSBORG e WARRINER (1960). O músculo foi suspenso em uma cuba com 5 ml de solução nutritiva de Krebs com a seguinte composição (em mM): NaCl 136; KCl 5,0; $CaCl_2$ 2,5; $KHPO_4$ 1,2; $NaHCO_3$ 23,8 e glicose 2,0). A preparação foi oxigenada com carbogênio (95% O_2 e 5% CO_2) a uma temperatura de 37°C. O músculo foi mantido sob uma tensão constante de 0,5 g/cm e estimulado através de eletrodos bipolares

posicionados na região de transição entre o tendão e o músculo de modo a produzir uma estimulação de campo. Estímulos elétricos indiretos supramaximais de 0,05 Hz de freqüência e 0,2 ms de duração e estímulos elétricos diretos de 10 V com a mesma freqüência e duração foram aplicados às preparações por um estimulador Grass S88.

Todas as preparações foram submetidas a um período de estabilização não inferior a 15 minutos antes do início dos experimentos. As contrações eram registradas em um fisiógrafo Narco trace Bio-System 40, usando-se transdutores isométricos modelo Load cell BG 50 GMS (Kulite Semiconductor Product Inc.) acoplados a um fisiógrafo Gould RS 3400. Após o controle, foi adicionado o veneno (1,25, 2,5 e 5,0 μg/ml) e observado o seu efeito.

3.3.9-Pressão arterial em ratos

Ratos machos Wistar foram inicialmente anestesiados com pentobarbital sódico (Sagatal®, 40 mg/kg) pela via intraperitoneal (ip) e, quando necessário, doses de manutenção foram administradas no decorrer do experimento. Os animais foram então fixados na mesa cirúrgica, em decúbito dorsal. Em seguida, foi realizada pequena incisão longitudinal na pele (aproximadamente 2 cm) na linha mediana, expondo-se assim a traquéia do animal, na qual foi introduzido um tubo endotraqueal para eventual necessidade da respiração artificial. A carótida direita foi então isolada da glândula tireóide, musculatura paratraqueal e nervo

vago. Ambas as extremidades da carótida foram clampeadas, isolando-se a porção distal com fio de algodão. Com auxílio de uma tesoura oftálmica, fez-se pequena incisão na parede anterior da carótida, na qual foi inserido e fixado uma cânula heparinizada (scalp 23). Para medir a pressão arterial no rato, o scalp foi acoplado a um transdutor de pressão arterial (Strain Gage Coupler Type 7179 – Spectramed) e os sinais da pressão arterial amplificados e registrados através de um fisiógrafo Narco Trace 40 ligado um acoplador universal tipo 7159, previamente acoplado a um transdutor de pressão, devidamente calibrado.

A veia femoral esquerda (ou direita) foi canulada para a administração endovenosa do veneno. Após a cirurgia, aguardou-se um período de estabilização da pressão arterial de aproximadamente quinze minutos antes de iniciar os protocolos. Considerou-se adequada a pressão arterial basal média dos animais em torno de 60 a 110 mmHg.

Na maioria dos protocolos experimentais, as peçonhas em estudo eram injetadas por via venosa em bolus de 100 µl, seguidos da administração de 1000 µl de salina, para lavagem da cânula.

O protocolo para a verificação da alteração na pressão arterial causada pelo veneno de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*, resumidamente foi o seguinte:

1-Normalização e estabilização da pressão arterial do rato após a cirurgia por quinze minutos.

2-Verificação da pressão máxima e mínima do animal, registrando-se uma pressão média.

3-Administração endovenosa do veneno nas doses crescentes: 100, 200, 300, 400

e 500 μg/kg.

4-Lavagem da cânula com salina, após a administração do veneno afim de certificar-se que o veneno havia sido totalmente administrado.

3.4-Estudos bioquímicos

3.4.1-Atividades enzimáticas

Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada pelo método de KUNITZ (1947). O controle positivo para tal atividade foi o veneno de *Botrops jararaca*. Para 1,9 ml de uma solução de caseína 1% em 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8, pré-incubado por 5 min à 37°C, foi adicionado 0,1 ml de amostra dos venenos de *T. serrulatus, T. bahiensis* e *B. jararaca* (500μg/ml) seguida de incubação na mesma temperatura por 20 min. A reação foi interrompida pela adição de 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5% e as amostras incubadas permaneceram em gelo por 30 min, após os quais foram centrifugadas e a absorbância do sobrenadante lida em espectrofotômetro a 280 nm. Um aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto correspondia a uma unidade de atividade. Esta atividade foi expressa em unidades/mg de veneno.

Atividade hialuronidásica

A atividade hialuronidásica foi determinada pelo método de DI FERRANTE (1956). A 0,2 ml de tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 6,0, contendo 0,15 M de NaCl e 0,2 ml de substrato (0,2 mg de ácido hialurônico dissolvido em tampão acetato) foi adicionado 0,1 ml de amostra dos venenos de *T. serrulatus* e *T. bahiensis,* a mistura incubada por 15 min à 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 2 ml de brometo de cetrimetilamônio 2,5% em NaOH 2%, sob agitação vigorosa. A turbidez resultante foi medida a 400 nm após 30 min de incubação à temperatura ambiente. Uma unidade de atividade (turbidity reducing unit, TRU) foi definida como a quantidade de veneno capaz de causar uma redução de 50% na turbidez gerada por 200 μg de ácido hialurônico.

3.4.2-Fracionamento dos venenos

Gel filtração:

Inicialmente, os venenos de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* foram fracionados por gel através filtração em coluna (1 cm x 3 cm HR 10/30) de resina Superdex 75 pré-equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M e pH=5,0. O veneno (15 mg cada) foi dissolvido em 1ml de NaCl 0,9%, centrifugado em microcentrífuga (>10.000 g) por 3min, e a absorbância a 280nm determinada em espectrofotômetro Uvikon 810 (Kontron Instruments) para estimar o conteúdo

protéico (A 280 nm de 1,0 = concentração protéica de 1mg/ml). Em seguida, o veneno foi aplicado à coluna e a mesma foi eluída com o tampão acetato a um fluxo de 0,5 ml/min em um sistema ÄKTA – Purifier 10 à 22 °C. Após eluir a coluna com pelo menos 1,5 volumes da coluna, o tampão inicial foi trocado pelo mesmo tampão contendo NaCl 0,2 M. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e frações de 1ml foram coletadas. Os tubos correspondentes aos picos principais foram armazenados em Eppendorfs e congelados (-20 °C) até serem testados para atividade neuromuscular em preparações de nervo frênico-diafragma de rato, conforme descrito anteriormente.

Em alguns casos, as frações que apresentaram atividade neuromuscular foram recromatografadas em coluna HiTrap (5 ml) contendo resina Sephadex G-25 pré-equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M, pH = 5,0. A coluna foi eluída com o mesmo tampão a um fluxo de 1 ml/min e frações de 1 ml foram coletadas e testadas novamente para sua atividade neuromuscular.

Troca iônica

Para comparação dos componentes básicos, os venenos (5-10 mg cada) foram dissolvidos em tampão bicarbonato de amônio 0,01M, pH = 7,8, e processados conforme descrito acima. A seguir, foram aplicados à uma coluna (1,6 cm x 10 cm; HR 16/10) de resina CM-celulose 52 pré-equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01 M, pH 7,8. Após lavagem para remoção de material não ligado, a coluna foi eluída com um gradiente (0,01 – 1,0 M) deste tampão a

um fluxo de 0,5 ml/min (ARANTES *et al.*, 1989). O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e frações de 1,0 ml foram coletadas.

4-RESULTADOS

4.1-Estudos farmacológicos

4.1.1-Letalidade

A dose letal mediana em camundongos para o veneno de *T. serrulatus* injetado por via intravenosa foi 0,54 mg/kg (limite fiducial a 95% = 0,45-0,64 mg/kg), e para *T. bahiensis* foi 0,72 mg/kg (limite fiducial a 95% = 0,68-0,75 mg/kg). Houve diferença significativa entre estes dois valores ao nível de $p<0,05$.

Os animais usados neste teste tiveram sangramento das vias nasais, salivação, diarréia, aumento na diurese e alguns foram à óbito imediatamente após a administração dos venenos.

4.1.2-Estudos miográficos

Em preparações nervo frênico-diafragma de rato sob estimulação elétrica indireta, a adição do veneno de *T. bahiensis* nas doses 1,25 2,5 e 5,0 μg/ml aumentou a amplitude das respostas musculares. Este aumento persistiu durante 60 minutos, e após este tempo percebeu-se uma queda na amplitude das contrações (figuras 2, 3).

Nas mesmas doses o veneno de *T. serrulatus* proveu efeitos semelhantes ao veneno de *T. bahiensis*, especialmente na dose de 1,25 μg/ml. A mesma observação no aumento e em seguida diminuição da amplitude das contrações musculares também ocorreu com o veneno de *T. serrulatus*, quando do emprego das doses de 2,5 e 5,0 μg/ml (figura 4).

O aumento na amplitude das contrações musculares da preparação nervo

frênico diafragma de rato incubado com o veneno de *T.bahiensis* nas doses de 1,25 2,5 e 5,0 μg/ml aos 30 minutos foi: 42,8 ± 3,2%, 50,3 ± 2,3% e 54,2 ± 1,8%, respectivamente. Nas doses de 2,5 e 5,0 μg/ml houve diminuição na amplitude das respostas musculares aos 60 minutos, a amplitude manteve-se ao nível do controle, porém quando a preparação era registrada além deste tempo, a preparação chegava a bloqueio.

O aumento na amplitude das contrações da preparação submetida ao veneno de *T. serrulatus* nas doses de 1,25 2,5 e 5,0 μg/ml aos 30 minutos foi: 44,2 ± 2,4%, 50,3 ± 1,7% e 53,6 ± 2,2%, respectivamente. Quando as preparações foram analisadas além dos 60 minutos ocorria o bloqueio total, principalmente com a dose de 5,0 μg/ml.

Ambos os venenos antagonizaram o bloqueio neuromuscular produzido pela d-Tc (1,46 μM) na concentração de 2,5 μg/ml (figura 5 e 6). O veneno foi utilizado na dose de 2,5 μg/ml, embora o efeito com o veneno de *T. bahiensis* foi menos intenso com o veneno de *T.serrulatus*. Assim a reversão do bloqueio neuromuscular causado pela d-Tc com o veneno de *T. bahiensis* foi de 40,5+2,2% contra 55,2+3,0% para *T. serrulatus* ($n = 5$, $p<0,05$).

A atividade dos venenos sobre os "twitches" provocados por excitação elétrica indireta ou direta, em preparação nervo frênico-diafragma de rato, curarizado (d-Tc 14,6 μM) ou não, e mostrada na figura 7. O tempo de relaxamento observado na preparação não curarizada, foi maior em presença do veneno de *T. bahiensis* do que *T. serrulatus*, na concentração de 2,5 μg/ml. O aumento no tempo de relaxamento foi em torno de 55,5+2,5% para *T. bahiensis* e

48,2+1,8% para *T. serrulatus* (n = 5, p<0,05). Além do aumento no tempo de relaxamento verificou-se o aparecimento de fibrilações e fasciculações nas contrações (figura 7). O mesmo não ocorreu nesta preparação quando foi curarizada (dTc-14,6 μM), após a adição do veneno de *T. serrulatus* (2,5 μg/ml). Não houve alteração nos "twitches", porém a preparação incubada com o veneno de *T. bahiensis* (2,5 μg/ml) observou-se aumento na duração do relaxamento, além de fasciculações e contrações espontâneas (figura 8).

4.1.3-Estudos dos potenciais bioelétricos

Em relação aos estudos bioelétricos dos efeitos dos venenos de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* observou-se que estes provocavam despolarização da placa terminal da preparação diafragma de rato, na concentração de 2,5 μg/ml (figura 9).

Quando a preparação diafragma de rato foi curarizada, a despolarização não ocorreu, diferente daquela somente na presença dos venenos de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*. Em preparações diafragma de rato curarizadas (dTc-14,6 μM) o veneno de *T. bahiensis* produziu contrações e fasciculações, embora estas não influenciaram o potencial de membrana; resultado semelhante foi obtido com o veneno de *T.serrulatus* (figura 10).

Do potencial de placa terminal em miniatura, verificou-se que, os venenos de *T. serrulatus* como de *T. bahiensis* produziram aumento na freqüência e amplitude destes potenciais (figuras 11 e 12), provavelmente devido à liberação do

neurotransmissor, causada pelos venenos. Em algumas preparações este efeito permanecia intenso até 120 minutos da adição do veneno.

4.1.4-Preparação de aurícula isolada

Estudou-se o bloqueio causado pelo veneno de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* em preparações de aurícula isolada de cobaia. Nesta preparação, foram monitorados a freqüência e amplitude das contrações auriculares.

Inicialmente, o veneno de *T. serrulatus* (2,5 μg/ml) aumentou a freqüência das contrações auriculares (134,2 ± 4,5%), mas após 30 minutos houve uma diminuição na freqüência das contrações, que era mais intenso aos 60 minutos de observação.

Ao contrário do veneno de *T. serrulatus, o T. bahiensis* (2,5 μg/ml) desenvolveu um efeito colinérgico inicial, diminuiundo a freqüência das contrações auriculares imediatamente após a sua adição (358,2 ± 3,8), muito mais acentuadamente que o veneno de *T. serrulatus* (figura 13). Seguido de um aumento na freqüência com tendência a retornar ao observado no momento controle.

Os venenos induziram ainda, mudanças bruscas de curta duração e repetidas no rítmo e amplitude das contrações auriculares, estas "alternâncias" ou oscilações na freqüência e tensão das respostas foram observadas com os venenos na dose de 5,0 μg/ml.

4.1.5-Preparação do músculo *biventer cervicis* de pintainho

Nos experimentos realizados com a preparação *biventer cervicis* de pintainho, observou-se bloqueio das respostas musculares sob estimulação elétrica direta, em presença do veneno de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*. A peçonha de *T. serrulatus* induziu, contratura, fibrilação, aumento intenso na amplitude das contrações e bloqueio neuromuscular irreversível da mesma forma que a de *T. bahiensis*, e este bloqueio era dose-dependente, conforme aumentavam-se as doses tais efeitos tornavam-se mais visíveis (figuras 14 e 15).

4.1.6-Pressão arterial em rato

As alterações causadas pelos venenos de *T. bahiensis* e *T. serrulatus* sobre a pressão arterial variavam bastante, dependendo da dose administrada (figura 16). Destes experimentos, observou-se que, pequenas doses os venenos causavam hipertensão, enquanto altas doses produziram hipotensão que levava o animal ao óbito.

4.2-Estudos bioquímicos

4.2.1- Atividades enzimáticas

Atividade proteolítica

Comparado com o veneno de *Botrops jararaca* (15 unidades/mg, controle positivo), os venenos de *T. bahiensis* e *T.serrulatus* possuíam baixa atividade proteolítica (1,35 e 1,0 unidades/mg, respectivamente).

Atividade hialuronidásica

Os resultados obtidos nos ensaios para a verificação da presença da atividade hialuronidásica nos venenos estudados, demonstraram que, as duas espécies de *Tityus* tinham níveis parecidos de hialuronidase. Conforme o gráfico ilustra (figura 17), os dois venenos tem grande quantidade da enzima hialuronidase.

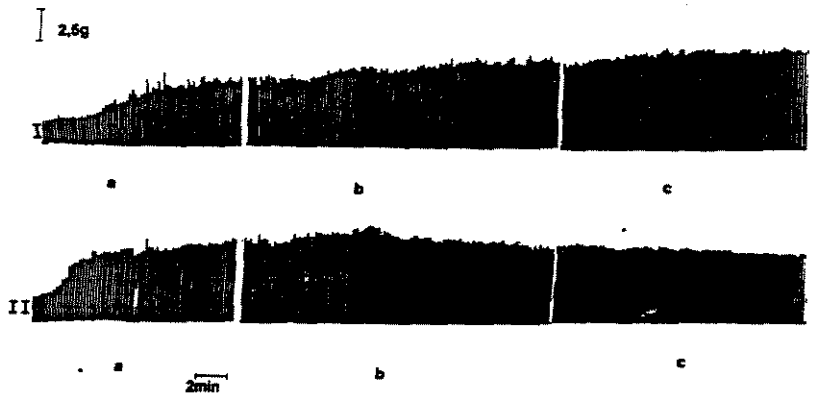

Figura 2- Efeito do veneno de *T. bahiensis* (I) e *T. serrulatus* (II) na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta, (0,1 Hz, 0,2 ms e 3 V) (n = 5). A barra horizontal indica a velocidade em minutos e a barra vertical indica a tensão dada no músculo em gramas.

a-controle, na seta adição do veneno (1,25 μg/ml)

b- 30 minutos após a adição do veneno

c- 60 minutos após a adição do veneno

4.2.2-Fracionamento dos venenos

O fracionamento do veneno de *T. serrulatus* por gel filtração resultou em 12 picos (figura 18) e o de *T. bahiensis* em 13 picos (figura 18). Com ambos os venenos, os últimos picos só foram eluídos quando a coluna fora lavada com tampão contendo NaCl. Das frações de *T. bahiensis* testadas, algumas produziram aumento na amplitude das contrações musculares, aparecimento de contrações espontâneas e fasciculações (figura 19). Além disso, algumas frações causaram bloqueio neuromuscular (figura 20) e contratura muscular (figura 21). Efeitos semelhantes foram observados com o veneno de *T. serrulatus* (figura 22 – 24). O refracionamento das frações 74 (pico 12 do *T. serrulatus*) e 82 (pico 13 do *T. bahiensis*) em coluna Hitrap Sephadex G-25 resultou em dois picos de cada, dos quais apenas um continha atividade neuromuscular (figura 25).

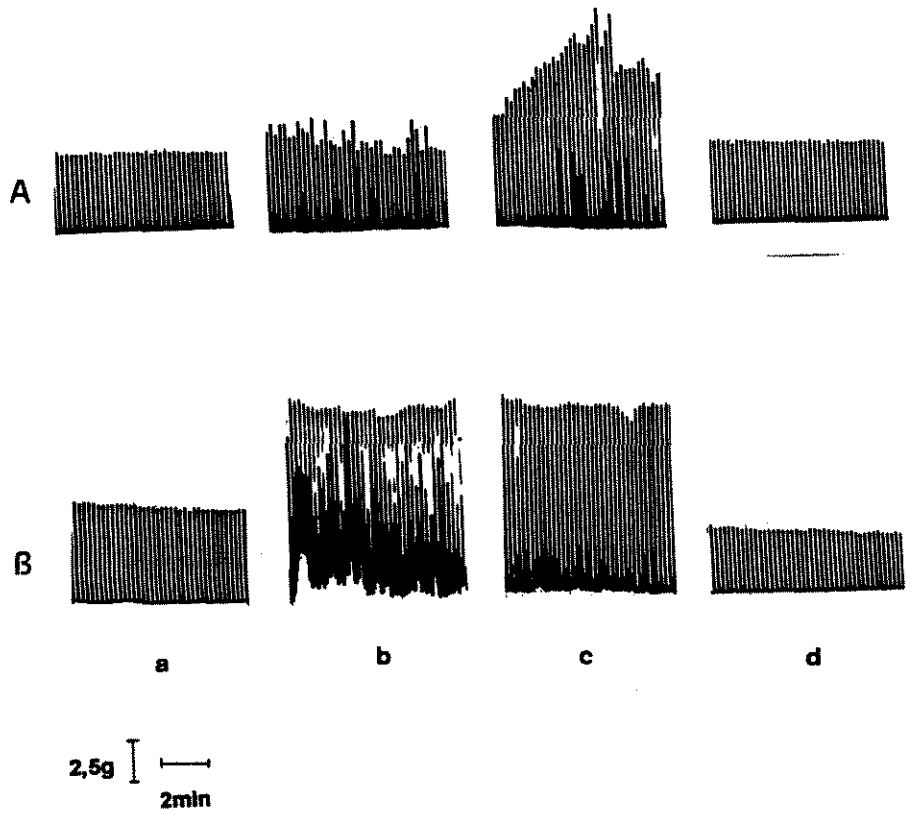

Figura 3- Efeito do veneno de *T. bahiensis* (A = 2,5 μg/ml) (B = 5,0 μg/ml) na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta (0,1 Hz, 0,2ms, 3V), (n = 5). A barra horizontal indica a velocidade em minutos e a barra vertical indica a tensão dada no músculo em gramas.

a- controle

b- 5 minutos após adição do veneno

c- 30 minutos após a adição do veneno

d- 60 minutos após a adição do veneno

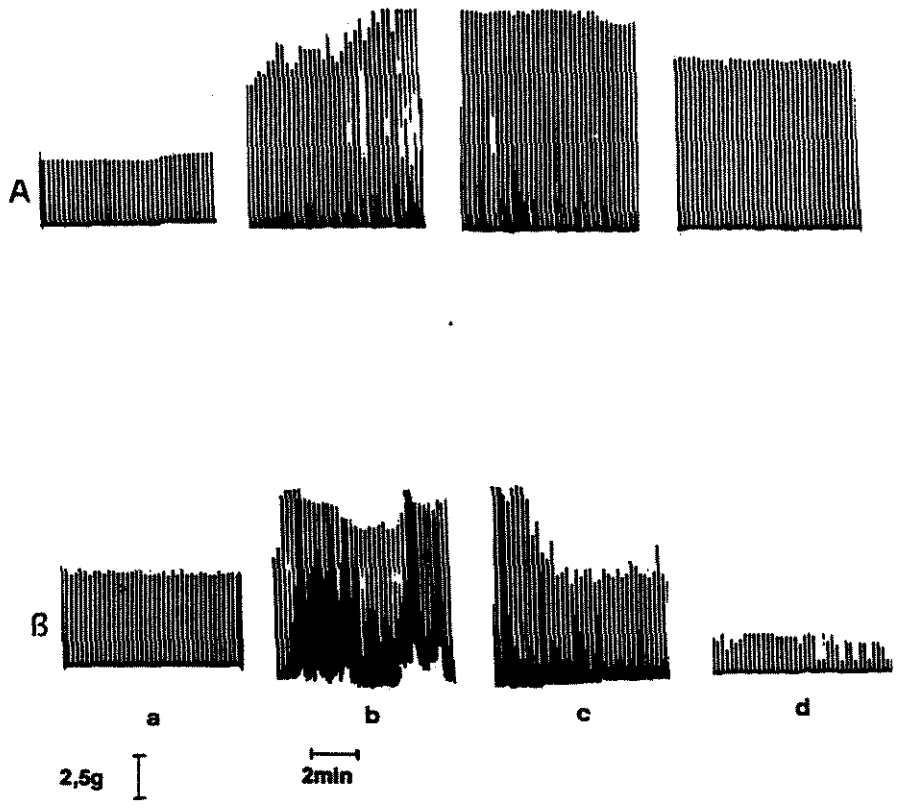

Figura 4- Efeito do veneno de *T. serrulatus* (A = 2,5 μg/ml) (B = 5,0 μg/ml) na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta (0,1 Hz, 0,2 ms, 3 V) (n = 5). A barra horizontal indica a velocidade em minutos e a barra vertical indica a tensão dada no músculo em gramas.

a-controle

b- 5 minutos após a adição do veneno

c-30 minutos após a adição do veneno

d-60 minutos após a adição do veneno

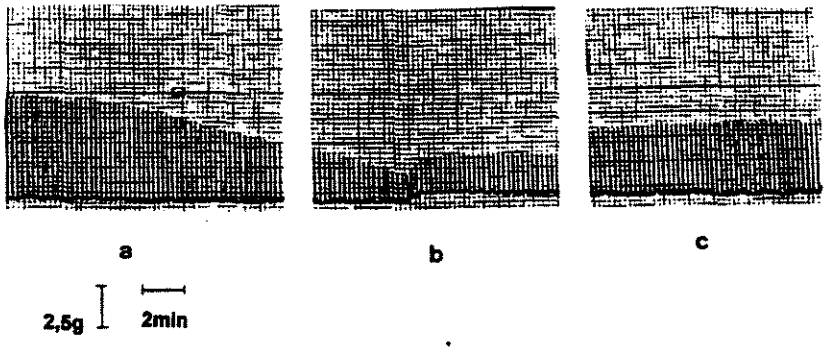

Figura 5- Efeito do veneno de *T. bahiensis* na preparação nervo frênico-diafragma de rato, em presença de d-Tubocurarina, sob estimulação elétrica indireta (0,1 Hz, 0,2 ms, 4 V), (n=5). A barra horizontal indica a velocidade em minutos e a barra vertical indica a tensão dada no músculo em gramas.

a- controle, e adição de d-Tc (1,46 μM)

b- bloqueio das respostas musculares, e adição do veneno de *T. bahiensis* na dose de 2,5 μg/ml.

c-60 minutos após a adição do veneno

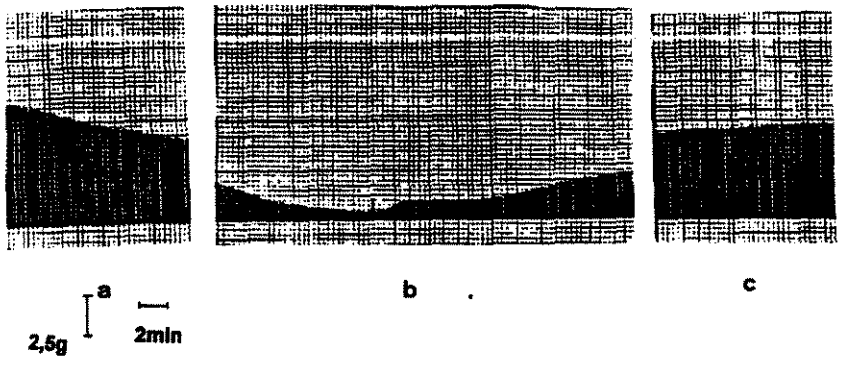

Figura 6- Efeito do veneno de *T. serrulatus*, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, em presença de d-Tubocurarina, sob estimulação elétrica indireta (0,1 Hz, 0,2 ms, 4 V), (n = 5). A barra horizontal indica a velocidade em minutos e a barra vertical indica a tensão dada no músculo em gramas.

a- controle e adição de d-Tc (1,46 μM)

b- bloqueio das respostas musculares e adição do veneno de *T. serrulatus* na dose de 2,5 μg/ml

c- 60 minutos após a adição do veneno

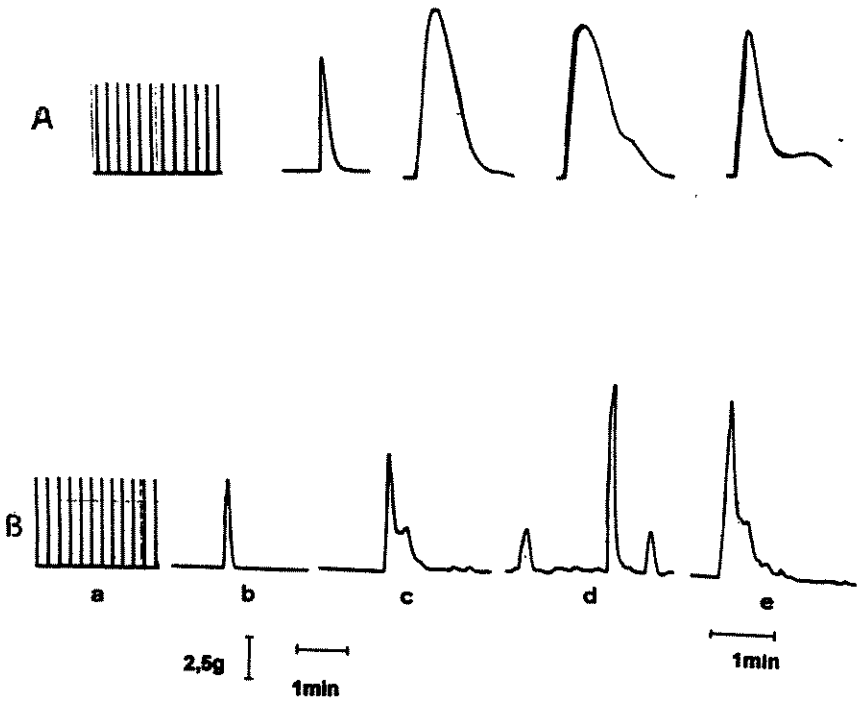

Figura 7- Efeito do veneno de *T. bahiensis* (A) e *T. serrulatus* (B) sobre a atividade dos "twitches" da preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.(0,1Hz, 0,2ms e 4 V), (n = 5). A barra horizontal indica a velocidade em minutos e a barra vertical indica a tensão dada no músculo em gramas.

a- controle

b- "twitch" controle

c- 5 minutos após adição do veneno na dose de 2,5 μg/ml

d- 30 minutos após adição do veneno

e- 60 minutos após adição do veneno

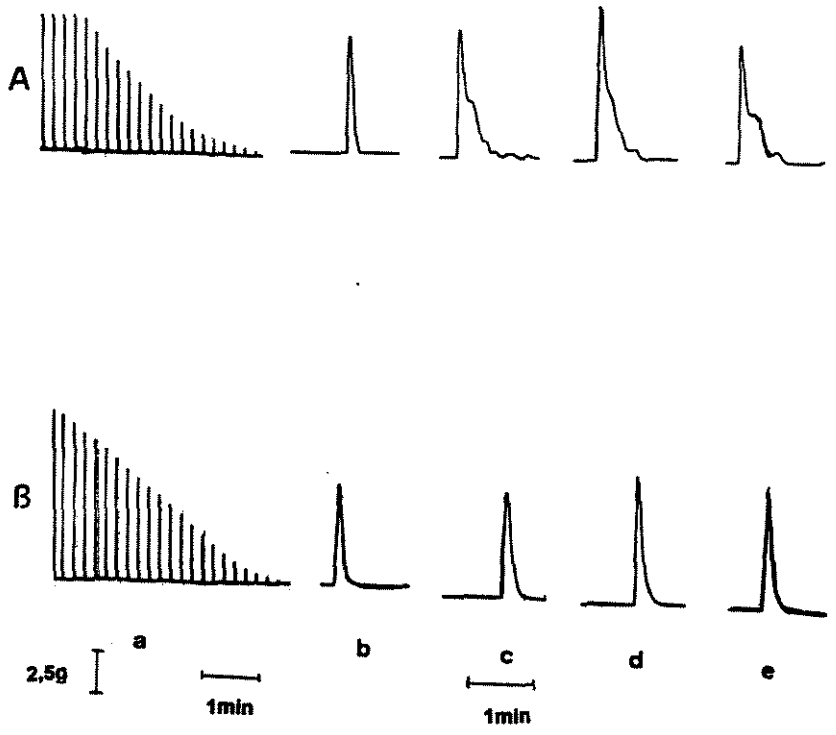

Figura 8- Efeito do veneno de *T.bahiensis* (A) e *T. serrulatus* (B) sobre a atividade dos "twitches" preparação diafragma de rato curarizado, sob estimulação elétrica direta. A barra horizontal indica a velocidade em minutos e a barra vertical indica a tensão dada no músculo em gramas.

a- controle e adição de d-Tc (14,6 μM)

b- "twitch" controle curarizado

c- 5 minutos após adição do veneno de na dose de 2,5 μg/ml

d- 30 minutos após adição do veneno

e- 60 minutos após adição do veneno

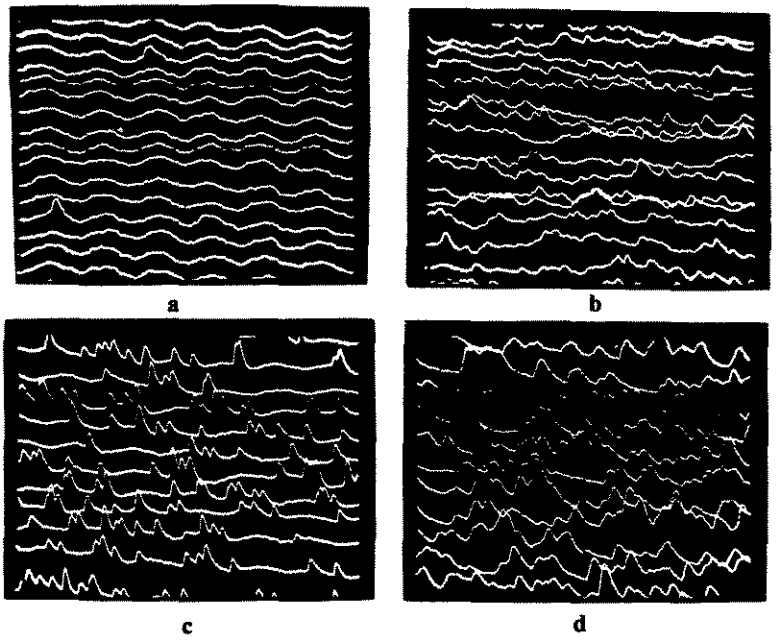

Figura 11- Efeito do veneno de *T. bahiensis* sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (pptm), da preparação diafragma de rato.

a- controle

b- 5 minutos após adição do veneno (2,5 μg/ml)

c- 30 minutos após adição do veneno

d- 60 minutos após adição do veneno

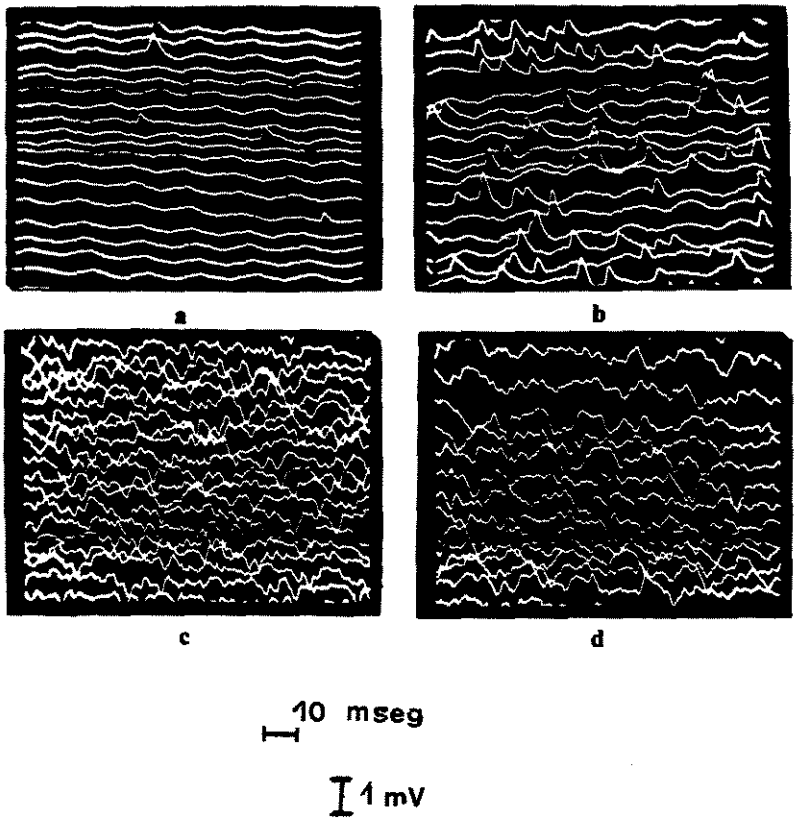

Figura 12- Efeito do veneno de *T. serrulatus* sobre os potenciais de placa terminal em miniatura, da preparação diafragma de rato.

a- Controle

b- 5 minutos após adição do veneno (2,5 μg/ml)

c- 30 minutos após adição do veneno

d- 60 minutos após adição do veneno

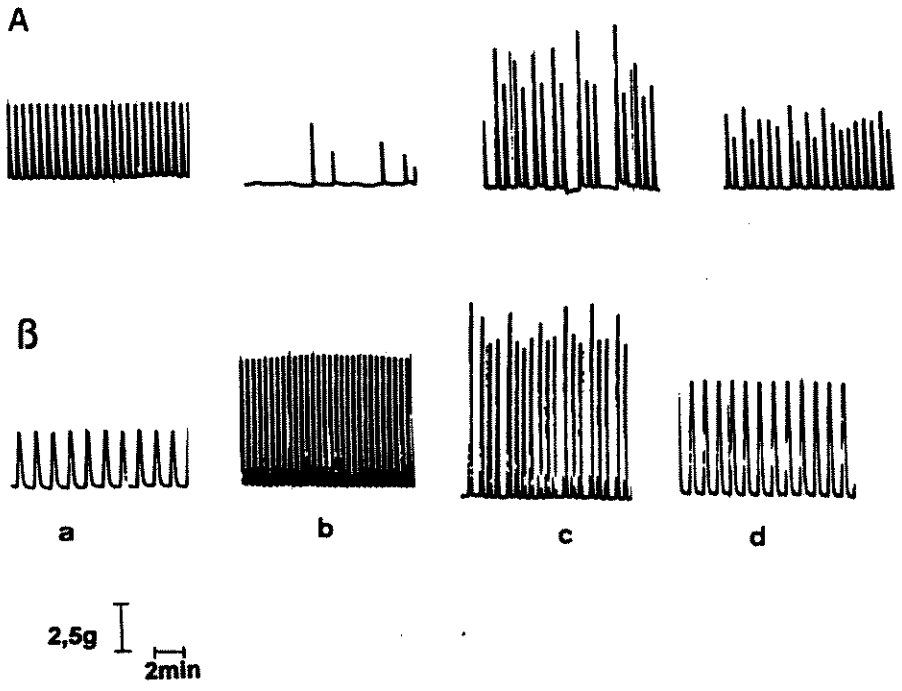

Figura 13- Efeito do veneno de *T. bahiensis* (A) e *T. serrulatus* (B) sobre as contrações auriculares da preparação de aurícula isolada de cobaia. A barra horizontal indica a velocidade em minutos e a barra vertical indica a tensão dada no músculo em gramas.

a- registro controle das contrações auriculares

b- 5 minutos após a adição do veneno (2,5 μg/ml)

c- 30 minutos após a adição do veneno

d- 60 minutos após a adição do veneno

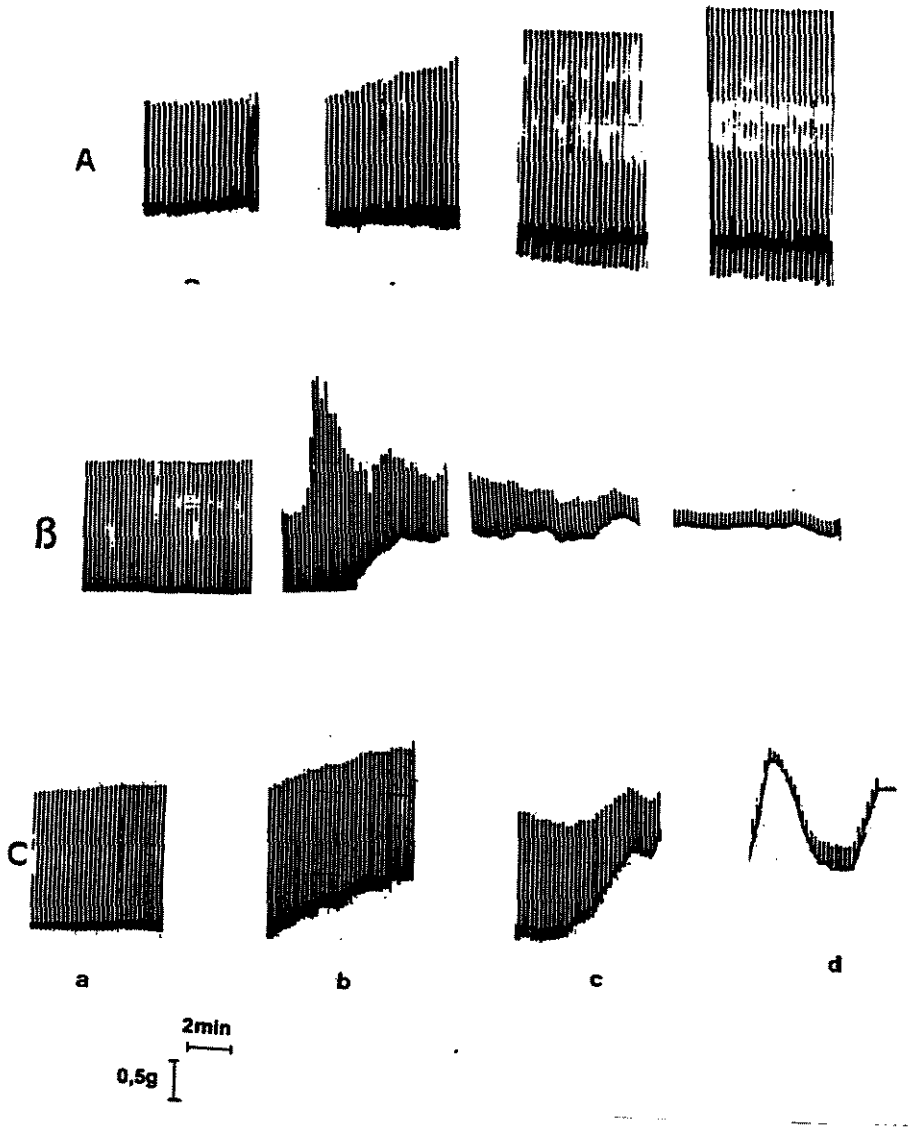

Figura 14- Efeito do veneno de *T. bahiensis* (A = 1,25 µg/ml) (B = 2,5 µg/ml) (C = 5,0 µg/ml) sobre a preparação de *biventer cervicis* de pintainho. A barra horizontal indica a velocidade em minutos e a barra vertical indica a tensão dada no músculo em gramas.

a- controle

b- 5 minutos após adição do veneno

c- 30 minutos após adição do veneno

d- 60 minutos após adição do veneno

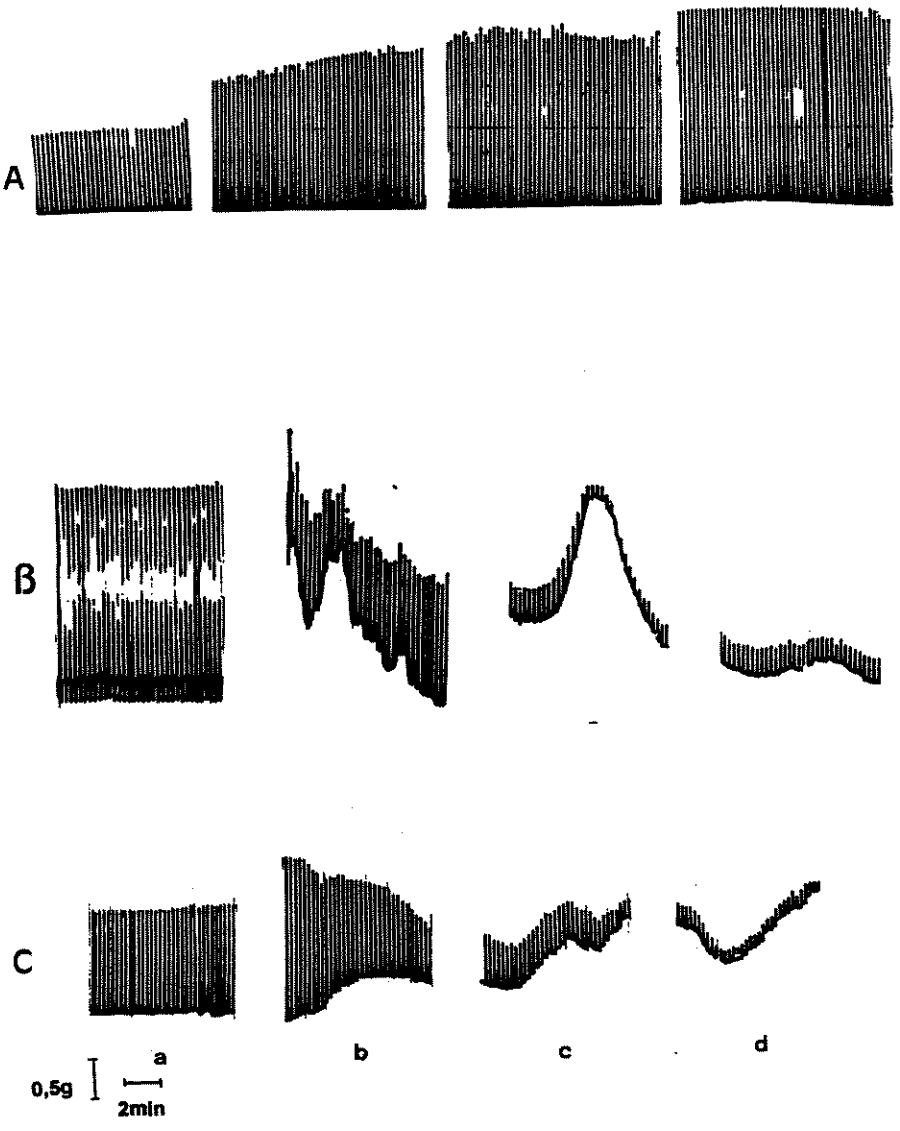

Figura 15- Efeito do veneno de *T. serrulatus* (A = 1,25 µg/ml) (B = 2,5 µg/ml) (C = 5,0 µg/ml) sobre a preparação de b*iventer cervicis* de pintainho. A barra horizontal indica a velocidade em minutos e a barra vertical indica a tensão dada no músculo em gramas.

a- controle

b- 5 minutos após adição do veneno

c- 30 minutos após adição do veneno

d- 60 minutos após adição do veneno

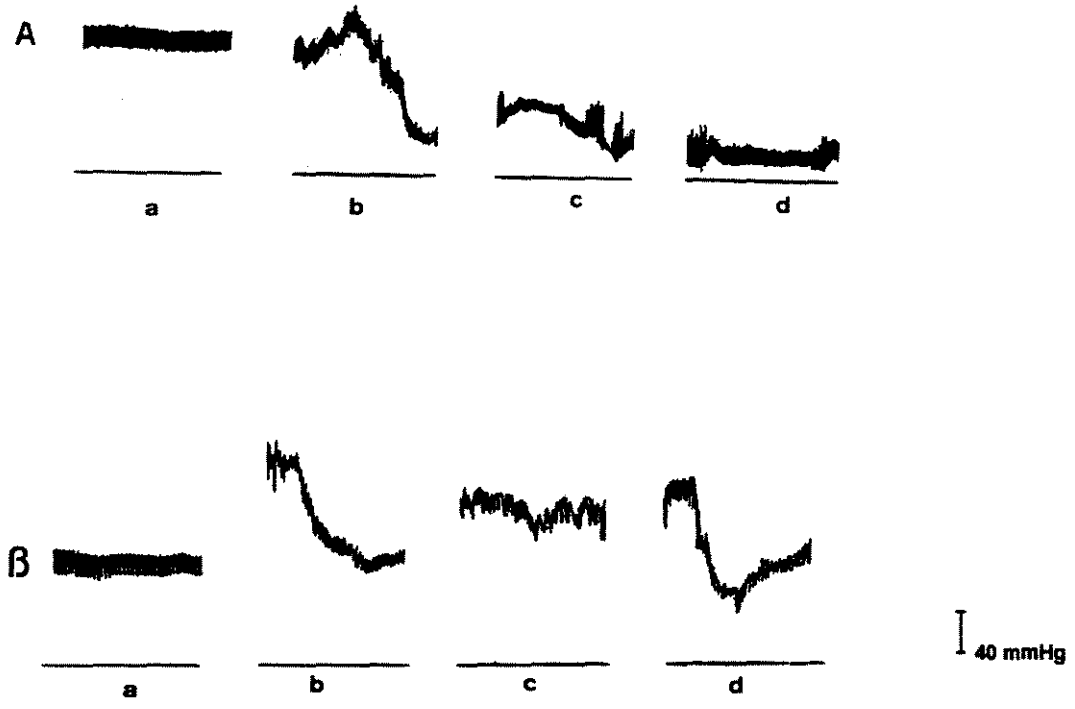

Figura 16- Efeito do veneno de *T. bahiensis* (A) e *T. serrulatus* (B), sobre o registro da pressão arterial de rato. A barra na vertical representa que cada centímentro possui 40 mmHg.

a- controle

b- adição do veneno (100 μg/kg)

c- adição do veneno (200 μg/kg)

d- adição do veneno (300 μg/kg)

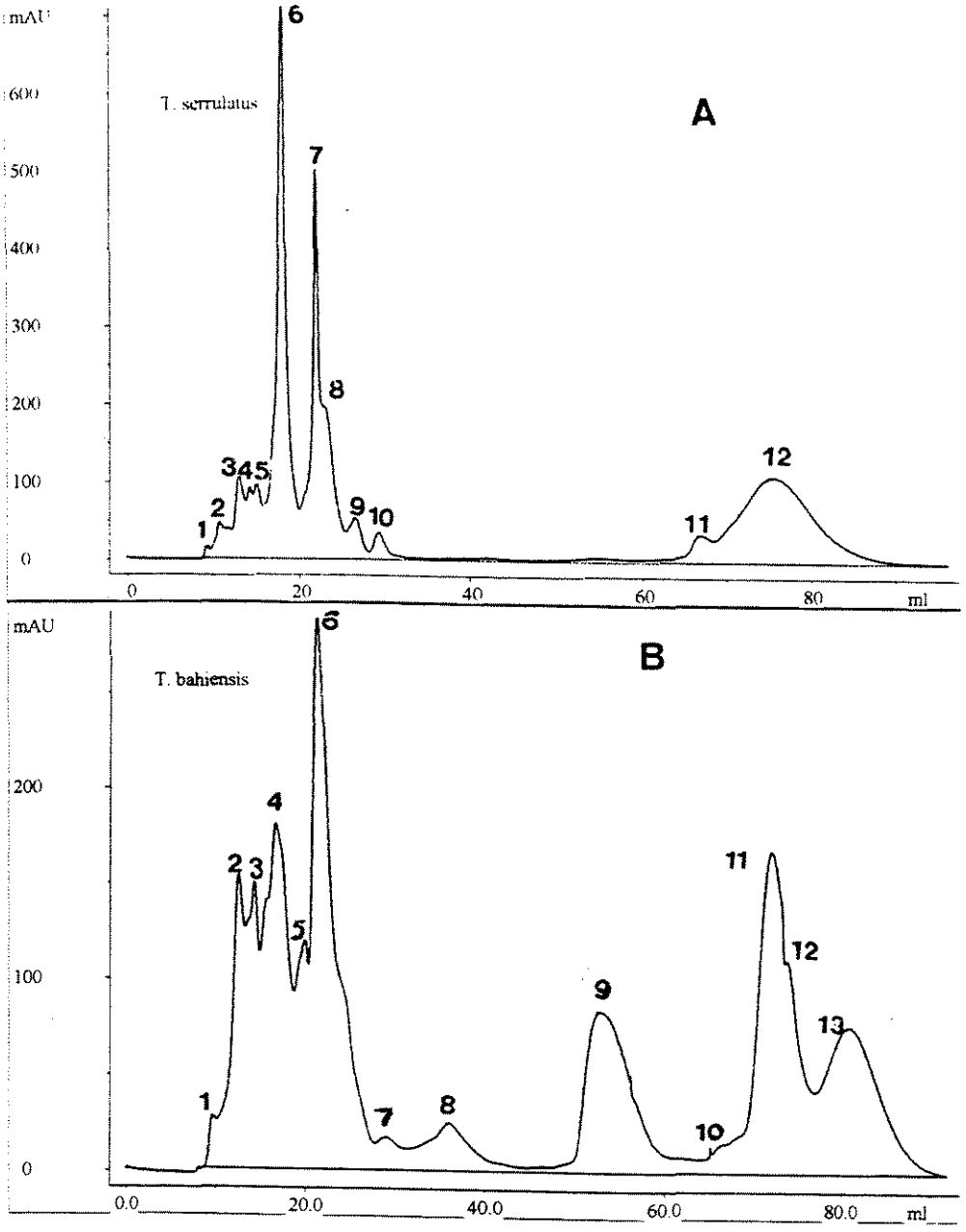

Figura 18- Perfil de eluição do veneno de *T. serrulatus* (A) e *T. bahiensis* (B), em coluna de Superdex 75 (1 cm x 30 cm) equilibrada e eluida com acetato de de amônio 0,02 M e pH = 4,7. A coluna foi eluida a um fluxo de 30 ml/h e frações de 1 ml foram coletadas. O perfil de eluição foi determinado a 280 nm.

A- Fracionamento de veneno de *T. serrulatus*

B- Fracionamento do veneno de *T. bahiensis*

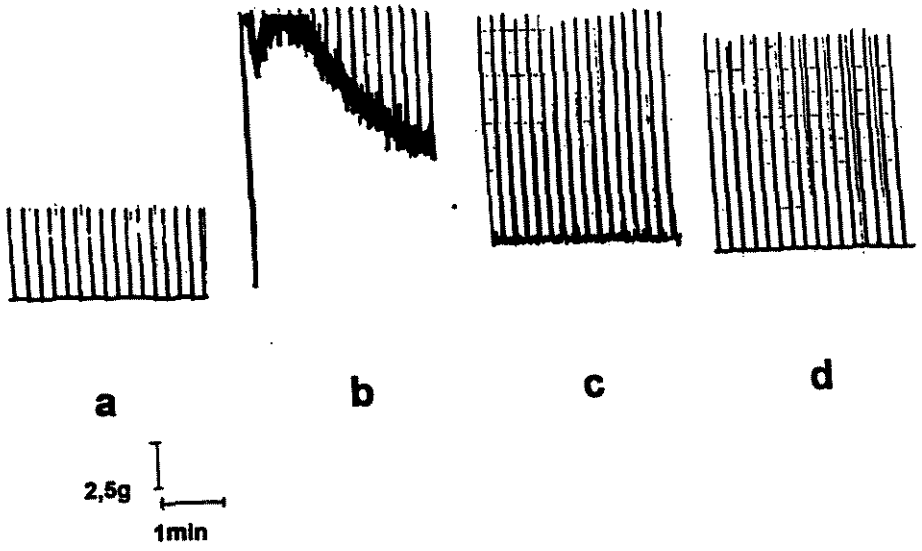

Figura 19- Efeito neuromuscular da fração do pico 13 do veneno de *T. bahiensis*, na preparação nervo frênico-diafragma de rato.

a- controle

b- adição da fração

c- 30 minutos após adição da fração

d- 60 minutos após adição da fração

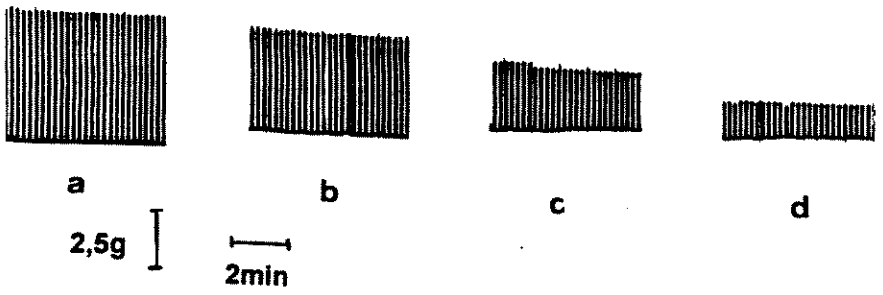

Figura 20- Efeito neuromuscular da fração do pico 12, do fracionamento do veneno de *T. bahiensis*, na preparação nervo frênico-diafragma de rato

a- controle

b- 5 minutos da adição a fração

c- 30 minutos após adição da fração

d- 60 minutos após adição da fração

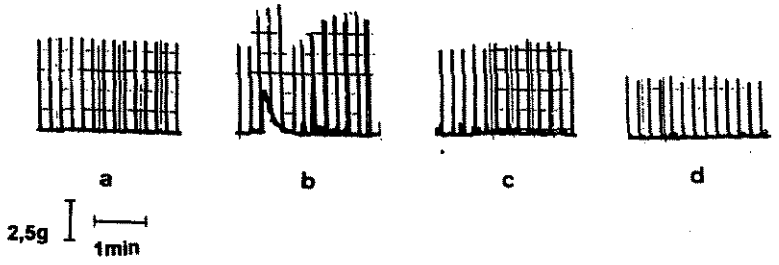

Figura 21 – Efeito neuromuscular da fração do pico 8, do fracionamento de *T. bahiensis*, na preparação nervo frênico-diafragma de rato

a- controle

b- 5 minutos após adição da fração

c- 30 minutos após adição da fração

d- 60 minutos após adição da fração

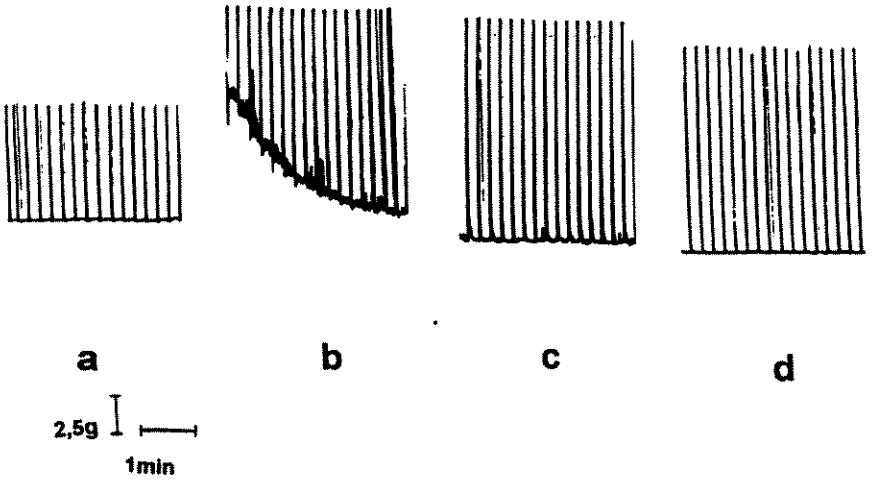

Figura 22- Efeito neuromuscular da fração do pico 12 do fracionamento de *T. serrulatus*, na preparação nervo frênico-diafragma de rato.

a- controle

b- 5 minutos após adição da fração

c- 30 minutos após adição da fração

d- 60 minutos após adição da fração

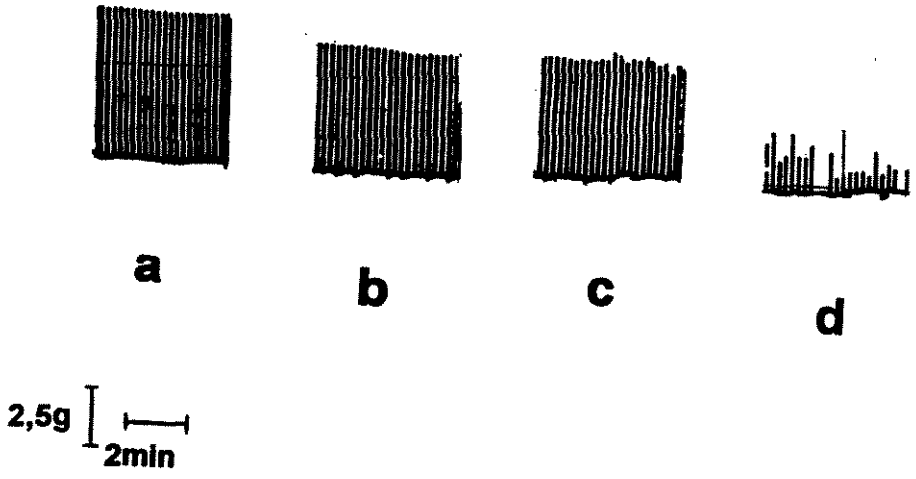

Figura 23– Efeito neuromuscular da fração do pico 10 do fracionamento de *T. serrulatus* na preparação nervo frênico-diafragma de rato.

a- controle

b- 5 minutos após adição da fração

c- 30 minutos após adição da fração

d- 60 minutos após adição da fração

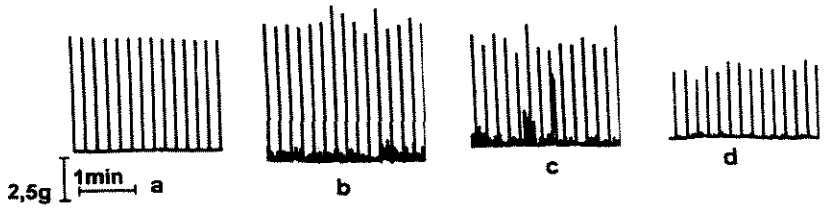

Figura 24- Efeito neuromuscular da fração do pico 8, do fracionamento de veneno de *T. serrulatus* na preparação nervo frênico-diafragma de rato

a- controle

b- 5 minutos após adição da fração

c- 30 minutos após adição da fração

d- 60 minutos após adição da fração

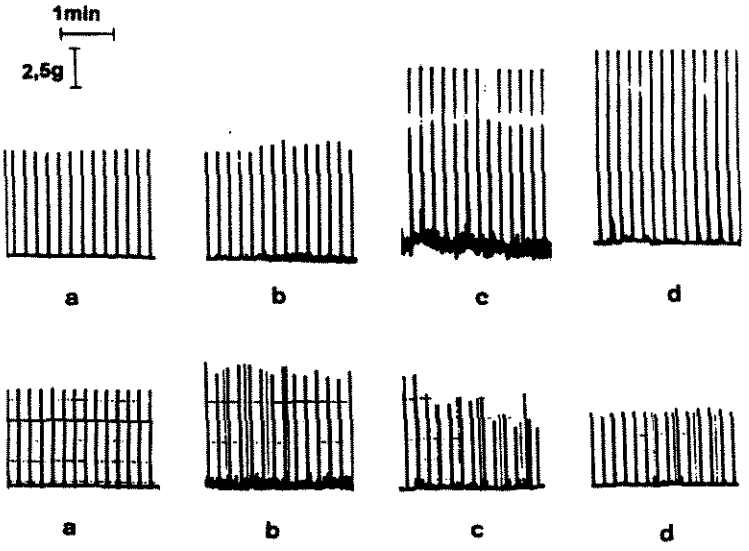

Figura 25- Efeito neuromuscular das frações purificadas do veneno de *T. bahiensis* (A) e *T. serrulatus* (B), na preparação nervo frênico-diafragma de rato.

a- controle

b- 5 minutos após adição das frações

c- 30 minutos após adição das frações

d- 60 minutos após adição das frações

5-DISCUSSÃO

As pesquisas sobre o escorpionismo e o envenenamento escorpiônico assumem grande importância na literatura médica e científica, devido à gravidade do acidente escorpiônico que muitas vezes torna-se fatal.

No Brasil, o escorpião *T. serrulatus*, é o principal causador de mortes por envenenamento escorpiônico. (NISHIKAWA *et al* 1994)

Os efeitos do veneno de escorpião na pressão arterial foram estudados, principalmente por CORRADO *et al* (1975), ARANTES *et al* (1992), BUCARETCHI *et al* (1995) e FREIRE-MAIA *et al* (1995) entre outros, mas seus resultados restringem-se apenas ao veneno de *T. serrulatus*. A este fato deve-se à importância de que em algumas regiões do país encontra-se muito mais *T. bahiensis* do que *T. serrulatus*, o que acontece em algumas cidades importantes do Brasil como: Campinas, São Paulo e Ribeirão Preto.

Estudos realizados no presente trabalho sobre a DL_{50} foram comparáveis com os obtidos por BÜCHERL (1953,1969). Os resultados de NISHIKAWA *et al* (1994) não são diretamente comparáveis com os nossos por terem sido obtidos pela via intraperitoneal.

O veneno de *T. serrulatus,* através da interação de suas toxinas com o canal de sódio, induz despolarização da membrana das terminações nervosas, com aumento do influxo de cálcio voltagem dependente e em conseqüência, liberação de neurotransmissores. DINIZ e TORRES (1968) foram os primeiros a demonstrar essa liberação em experiências usando íleo de cobaia. VITAL BRAZIL *et al* (1973) mostraram que o veneno de *T. serrulatus* também libera neurotransmissor no diafragma de rato e que essa liberação é cálcio dependente, de modo semelhante à provocada pelos impulsos nervosos.

neurotransmissor no diafragma de rato e que essa liberação é cálcio dependente, de modo semelhante à provocada pelos impulsos nervosos.

Nossos experimentos estão de acordo com estas observações, pois em preparações nervo frênico-diafragma de rato houve aumento da liberação de acetilcolina refletido no aumento da amplitude das contrações musculares, e pela presença de contrações espontâneas, bem como um aumento na freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura, isso em preparações incubadas com ambos os venenos.

VITAL BRAZIL *et al* (1973), verificaram um aumento na tensão e retardo no relaxamento dos "twitches" provocados pela excitação indireta do diafragma de rato, incubada com veneno de *T. serrulatus*. Estes efeitos não ocorriam em diafragma curarizado e não ocorriam as contraturas do diafragma, produzidos pelo veneno na ausência de estimulação elétrica do músculo.

A tityustoxina, a principal α-toxina da peçonha de *T. serrulatus,* foi isolada pela primeira vez por GOMES e DINIZ (1966), porém considerada impura (Arantes *et al*, 1992). Esta toxina também foi estudada por VITAL BRAZIL *et al* (1973) na preparação diafragma de rato.

WARNICK, ALBUQUERQUE & DINIZ, (1976) constataram que a tityustoxina aumenta a tensão e retarda o relaxamento dos "twitches" não só em diafragma de rato estimulado indiretamente, mas também em músculo curarizado estimulado diretamente. Verificaram ainda que a toxina despolariza a membrana das fibras musculares e induz grande aumento na duração do potencial de ação muscular (como também fazem substâncias que retardam a inativação do canal

de sódio). Concluiram que a tityustoxina, além de atuar nas terminações nervosas, também atua na membrana das fibras musculares.

Entretanto, VITAL BRAZIL *et al* (1973) demonstraram que na preparação nervo frênico-diafragma de rato a peçonha de *T. serrulatus*, mesmo em elevadas concentrações (10 μg/ml) não altera os "twitches" provocados por estimulação direta em diafragma curarizado ou em hemidiafragma cronicamente desnervado. Ou seja, mesmo na concentração de 10 μg/ml, não atua na membrana das fibras musculares.

Em experimentos realizados na presente pesquisa, constatou-se que na preparação curarizada (dTc, 14,6 μM) não houve alteração no tempo de relaxamento dos "twitches", o que não ocorreu quando se utilizou estímulos elétricos indiretos. Estes resultados com o veneno de *T. serrulatus* corroboram com os achados de VITAL BRAZIL *et al* (1973). As observações para o veneno de *T. bahiensis* diferem um pouco, em função de que algumas preparações curarizadas responderam com um aumento no tempo de ralaxamento. Esse efeito pode ser conseqüente ao retardo da inativação do canal de sódio, talvez decorrente de diferentes quantidades de toxinas alfa e beta presentes no veneno de *T. bahiensis.*

Estes resultados mostram que apesar da similaridade das espécies estudadas, há algumas diferenças na composição do seu veneno.

O aumento da tensão das respostas do diafragma à excitação do nervo frênico com estímulos elétricos isolados, produzido pelas duas peçonhas, pode ser explicado pelo aumento da duração do potencial de ação das membranas das

terminações nervosas, pela ativação do canal de sódio e pela instabilidade das membranas excitáveis.

Na presente pesquisa foi verificado que as peçonhas de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* são capazes de antagonizar o bloqueio produzido pela d-Tc (1,46 μM) na preparação nervo frênico-diafragma de rato. Nos experimentos realizados em nervo frênico-diafragma de rato pode-se também observar a maior eficiência do veneno de *T. serrulatus* em relação ao veneno de *T. bahiensis* para antagonizar os efeitos da d-Tc. Estes efeitos decorrem da ação liberadora de acetilcolina das terminações nervosas motoras. Um outro efeito atribuível à ação direta sobre o músculo foi uma ligeira e transitória contratura observado no hemidiafragma cronicamente desnervado (VITAL BRAZIL *et al*, 1973). Em experimentos realizados com diafragma curarizado (d-Tc, 14,6 μM) para medir o potencial de membrana, observou-se contrações e fibrilações da preparação diafragma de rato ao microscópio, em presença do veneno do *T. bahiensis* (2,5 μg/ml) porém incapazes de alterar o valor do potencial de membrana. Efeito semelhante não foi observado com o veneno de *T. serrulatus*.

Conforme descrito em literatura por vários autores, todos os distúrbios do envenenamento por *Tityus* em sua maioria, são devido à liberação de acetilcolina e catecolaminas pelas terminações nervosas. (WATT & SIMARD, 1984). Essa liberação resulta da ativação ou retardo da inativação do canal de sódio voltagem-dependente. (KOPPENHOFER & SCHMIDT, 1968; CATTERALL, 1980; BARHANIN *et al*, 1982; COURAND *et al*, 1982). Em virtude desta ação, as

neurotoxinas escorpiônicas induzem a despolarização das terminações nervosas e prolongam a duração do potencial de ação.

Os resultados obtidos na presente pesquisa reafirmam estes dados, uma vez que os venenos estudados causaram alterações no potencial de membrana, despolarizando as membranas das terminações nervosas. Esse resultado foi igual para ambas as espécies e demonstra sua semelhança aos venenos de *Centruroídes sculpturatus*, *Leiurus quinquestriatus* e *Hector androctorus australis*.

CORRADO *et al* (1975), relataram os efeitos colinérgicos e adrenérgicos do veneno de *T. serrulatus* em diversas preparações. Observaram primeiro que o veneno causava aumento na amplitude das contrações de músculo cardíaco de cobaia e do íleo de rato, efeito o qual é potencializado pela neostigmina e bloqueado pela atropina.

Também observaram em coração isolado (técnica de Langendorff) que o veneno produzia bradicardia seguida de taquicardia.

Resultados obtidos com a preparação de aurícula isolada de cobaia, *a priori* mostraram um efeito parassimpático ocasionando uma redução inicial da freqüência e da tensão das contrações, seguida de efeitos simpáticos como taquicardia e aumento de força de contração dos batimentos cardíacos.

Os experimentos realizados por CORRADO *et al* (1975), são parâmetros de comparação com aqueles realizados neste trabalho, e que também vem ao encontro não somente com experimentos realizados com o veneno de *T. serrulatus*, mas com o veneno de *T. bahiensis*. Além disso, outro efeito observado na maioria das experiências com a concentração de 2,5 μg de veneno/

ml foi a mudança brusca a curtos intervalos na freqüência e tensão das contrações. Estas alternâncias ou oscilações já registradas por SILVEIRA *et al* (1991), em experiências sobre a ação de *T. serrulatus* em corações isolados de cobaia, perfundidos pelo método de Langendorff, indicam liberação simultânea da acetilcolina e noradrenalina, com efeito predominante ora de um, ora de outro neurotransmissor.

DRUMOND *et al* (1995) pesquisaram a ação da toxina γ e da tityustoxina em àtrios isolados de rato, concluindo que os efeitos da primeira são principalmente a liberação de acetilcolina pelas terminações nervosas colinérgicas, enquanto os provocados pela tityustoxina resulta primordialmente em efeitos simpáticos.

Em experimentos realizados neste trabalho com os dois venenos em preparações de aurícula isolada, observou-se a instalação inicial de uma redução da freqüência e da tensão das contrações espontâneas atriais, seguida de aumento de ambas, perfeitamente bem visualizados a partir da adição dos venenos, principalmente pelo veneno de *T. bahiensis*, no entanto os efeitos simpáticos são bem observados após 15 minutos da adição. O veneno de *T. serrulatus* também diminuiu a freqüência das contrações auriculares, porém de maneira menos intensa que o de *T. bahiensis*, embora os efeitos simpáticos foram mais nítidos com o veneno de *T. serrulatus*.

Ainda, CORRADO *et al* (1975) descreveram os efeitos hipertensivos do veneno de *T. serrrulatus*, seguido por hipotensão arterial, e diminuição na

freqüência e força dos batimentos cardíacos, efeitos estes bloqueados por antagonistas alfa adrenérgicos.

Após a administração intravenosa do veneno de *T. serrulatus* em ratos anestesiados, observou-se que a administração de pequenas doses de veneno causavam uma hipertensão, seguida de hipotensão, e este segundo efeito era agravado em doses crescentes levando o animal a óbito. Os resultados para o veneno de *T. bahiensis* foram parecidos, porém a hipotensão com este veneno, era muito mais acentuada. Logo, o efeito do veneno de *T. bahiensis* aparentemente apresenta efeitos e ações semelhantes ao veneno de *T. serrulatus* em preparações de aurícula isolada de cobaia e pressão arterial de rato.

Os dois venenos estudados causaram hipertensão, supõe-se que seja em decorrência da concentração elevada de noradrenalina bem como da adrenalina circulante causada tanto por *T. serrulatus* como por *T. bahiensis* frente a liberação das terminações dos nervos esplâncnicos nas suprarrenais e na membrana de células cromafins. A hipertensão instala-se relativamente rápida e intensa é a causa de insuficiência do coração esquerdo, edema pulmonar bilateral e choque cardiogênico (BUCARETCHI *et al* , 1995).

O veneno de escorpião contém um grupo de peptídeos de baixo peso molecular que são tóxicos para vários organismos, este peptídeos têm sido estudados intensivamente e representam excelentes modelos para investigar a função e relação dos canais iônicos.

As toxinas escorpiônicas são divididas em toxinas alfa e toxinas beta. As α-toxinas retardam a inativação do canal do sódio, não interferindo com a sua

ativação. A sua afinidade para o sítio receptivo depende do potencial de membrana. A este grupo pertencem as principais toxinas da peçonha de escorpiões da subfamília *Buthinae* da África e Ásia como os dos gêneros *Androctorus*, *Leiurus*, *Buthus* (COURAND *et al*, 1982).

As beta-toxinas atuam no canal de sódio interagindo em sítio desse canal distinto do sítio em que as alfa-toxinas se fixam (COURAND *et al*, 1982). As beta-toxinas não interferem na inativação do canal de sódio como fazem as alfa-toxinas, mas após a repolarização do potencial de ação dão origem à uma corrente (despolarização) denominada "venom-induced current" por CALAHAN (1975), que atinge o pico dentro dos 25 ms e depois declina em centenas de milissegundos.

As alfa-toxinas também atuam no sentido de hiperpolarização, de dependência da ativação do potencial de ação, isto é, o potencial de membrana em que o potencial de ação é deflagrado torna-se mais negativo. As β-toxinas induzem respostas iterativas e dão lugar a potenciais espontâneos.

A toxina γ, isolada por POSSANI *et al* (1977), é a principal β-toxina do veneno de *T. serrulatus,* e é a mais tóxica das toxinas. A toxina γ, é uma proteína fortemente básica (peso molecular, 7000), constituída por cadeia de 61 aminoácidos com quatro pontes dissulfídicas. Apresenta excepcional afinidade pelo canal de sódio, induzindo mudança drástica na voltagem-dependência de ativação e de inativação do canal de sódio. Estas alterações produzem desvios para potenciais mais negativos (VYVERBERG & LAZDUNSKI, 1984). Em miotubos cultivados de rato, hiperpolarizados por passagem intra-celular de

corrente, a toxina γ torna instável a membrana dos miotubos, provocando lentas oscilações, as quais dão origem a descargas de potenciais de ação (breves tétanos).

Na presente pesquisa, o aumento extremamente elevado na freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura são atribuídos a essas oscilações do potencial de membrana das terminações nervosas causadas pela toxina γ. A ativação do canal do cálcio voltagem dependente tem brevíssima duração. Em conseqüência disto, causa despolarização persistente da membrana das terminações nervosas por maior tempo, dando lugar a ativações e inativações rápidas do canal de sódio provocando potenciais iterativos, logo causando aumento na freqüência dos potenciais de placa em miniatura.

TREQUATTRINI *et al* (1995) pesquisaram e isolaram uma toxina da peçonha de *T. bahiensis*, para a qual propuseram a denominação de IV-5b por apresentar seqüência de aminoàcidos N-terminais idêntica à toxina IV-5 (tityustoxina) de *T. serrulatus* e atuar inativando o canal de sódio. Segundo o autor, a toxina causava demora na inativação do canal de sódio em preparações de neurônios de aves. Em pequenas doses a toxina causava inativação do canal de sódio, sendo esta voltagem dependente e esta inativação aumentava com a despolarização.

WATT *et al* (1978), isolaram uma série de frações por cromotografia do veneno de *C. sculpturatus* (sul dos EUA e México). Dividiu as toxinas em 3 grupos pelos efeitos produzidos na preparação biventer cervicis de pintainho. O primeiro grupo induzia bloqueio sem prévio aumento da tensão dos "twitches", o segundo

grupo pertencia as toxinas que aumentavam a tensão das respostas previamente ao bloqueio e finalmente o terceiro grupo de toxinas que induziam oscilações regulares na tensão dos "twitches" e aparecimento de contraturas.

Realizou-se experimentos com a preparação *biventer cervicis* de pintainho constatando a presença de contraturas, aumento na amplitude das contrações musculares e aparecimento do bloqueio neuromuscular. Tal preparação respondia de maneira dose-dependente. Conforme pode ser observado nas figuras 14 e15, em preparação *biventer cervicis* de pintainho obteve-se resultados similares, pequenas doses causaram apenas aumento na amplitude das contrações musculares, doses maiores causavam aparecimento de contraturas e dificuldade no relaxamento das contrações musculares, doses ainda maiores levaram à contratura seguida rapidamente de bloqueio neuromuscular irreversível.

Sabe-se que os venenos de escorpião contém grupos variados de toxinas, conforme dito anteriormente, sendo as mais importantes toxinas alfa e beta. Em acordo com os resultados de WATT *et al* (1978) que identificaram três grupos de toxinas baseadoa nos seus efeitos (bloqueio neuromuscular, aumento da tensão das respostas e contraturas), respostas semelhantes também foram obtidas em experimentos com o veneno total.

ARANTES *et al* (1994), isolaram e caracterizaram a TsTX-V, uma nova neurotoxina de *T. serrulatus* que retarda a inativação do canal de sódio. O veneno foi fracionado através de cromatografia por CM-celulose e 13 frações foram coletadas e analisadas. Analisou-se a dose mediana letal desta toxina, assim como o seu efeito hipertensor e o efeito sobre o prolongamento do potencial de ação. A toxina TsTX-V era responsável pela inativação do canal de sódio.

Altas doses da TsTX-V induziam queda no potencial de membrana e causavam despolarização que parecia ser irreversível. Seu efeito hipertensor em ratos era caracterizado da mesma forma que o veneno total, atribuída à liberação de catecolaminas pelas adrenais e pelas terminações nervosas pós-ganglionares. Em seguida havia uma redução da pressão arterial devido à liberação de acetilcolina, em virtude do estímulo dado nos presso-receptores causada pela liberação excessiva de catecolaminas.

O efeito farmacológico da toxina TsTX-V sobre a pressão arterial mostrou-se diferente daquele obtido na presente pesquisa. Observou-se que pequenas doses de veneno de escorpião causava uma hipertensão, enquanto altas doses levava à uma hipotensão. Sabendo que o veneno de escorpião causa liberação dos mediadores adrenérgicos e colinégicos, concluímos que a hipotensão era conseqüente da liberação de acetilcolina, mas pelo próprio efeito do veneno e não por estimulação dos presso-receptores.

Esta hipótese baseia-se nos experimentos realizados com a preparação de aurícula isolada de cobaia, preparação esta desprovida de presso-receptores e onde a diminuição da força e freqüência de contração ocorre devido à liberação de acetilcolina pelo veneno de escorpião.

O fracionamento dos venenos de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*, através de gel filtração resultou em 12 e 13 picos respectivamente. Todos os picos foram testados quanto à sua atividade neuromuscular em preparação nervo frênico diafragma de rato. Os picos 5, 8, 12, 13 do veneno de *T. bahiensis* apresentavam atividade neuromuscular. No caso do veneno de *T. serrulatus*, os picos que causaram atividade neuromuscular foram 3, 8, 10 e 12. Destes picos, algumas

frações promoveram aumento na amplitude das contrações musculares, contraturas, fasciculações, fibrilações, diminuição da amplitude das contrações musculares e bloqueio neuromuscular.

Do veneno de *T. serrulatus,* o pico 3 apresentou discretas contrações espontâneas e uma sensível diminuição na amplitude das contrações musculares.

O pico 5 de *T. bahiensis* também apresentou contrações espontâneas, mas um discreto aumento na amplitude das contrações musculares, muito provavelmente dada pela liberação de acetilcolina das terminações nervosas presentes nesta preparação predominantemente colinérgica.

O aumento na amplitude das contrações musculares também era evidenciado nos picos 8 para ambos os venenos, assim como o aparecimento de contratura. Tal pico possuía um perfil semelhante, quanto sua concentração de proteínas. As contraturas indicavam aumento muito grande da liberação colinérgica.

Uma diminuição na amplitude das contrações musculares e um discreto bloqueio neuromuscular eram visíveis nos picos 12 e 10 para *T. bahiensis* e *T. serrulatus*, respectivamente. Além destas, era notória a presença de contrações espontâneas e pequenas fasciculações. A diminuição na amplitude das contrações e o bloqueio neuromuscular podem ser explicados por uma liberação excessiva de acetilcolina pelos terminações nervosas da preparação nervo-frênico diafragma, dando também lugar ao aparecimento das contrações espontâneas e fasciculações.

Os picos que realmente se consagraram quanto à um efeito farmacológico imediato foram 13 e 12 para o veneno de *T. bahiensis* e *T. serrulatus*,

respectivamente. Tais picos apresentaram aumento exacerbado na amplitude das contrações musculares, imediatamente após a adição das frações, com aparecimento de contratura, seguida pela presença de contrações espontâneas, fasciculações e fibrilações. Além destas, foi nítido a observação de que houve aumento no tempo de relaxamento e, portanto, maior duração da contração.

Os picos 12 e 13 do fracionamento do veneno de *T. bahiensis* e *T. serrulatus* demonstraram conter uma toxina que interage imediatamente com o canal de sódio, diminuindo o tempo de ativação deste, e aumentando e prolongando a inativação deste canal.

Os resultados obtidos no fracionamento dos venenos de escorpião da presente pesquisa corroboram com aqueles obtidos por WATT. *et al*, 1978 que dividiu as toxinas fracionadas em 3 grupos. O mesmo ocorreu, conforme demonstrado acima, um grupo de causava o bloqueio neuromuscular, outro fasciculações e fibrilações, e outro grupo ainda, causador de aumento na amplitude das contrações musculares.

Os dois venenos apresentaram atividade hialuronidásica em níveis similares, a atividade hialuronidásica indica um fator de difusão entre as células. Esse fator é demonstrado pelo potente efeito da hialuronidase, uma enzima que decompõe a matriz intracelular, aumentando a taxa de difusão através do espaço intersticial, muito provavelmente, este deva ser um dos fatores responsáveis pelo imediato efeito do veneno nos pacientes envenenados.

6-CONCLUSÃO

Baseado no presente estudo comparativo, concluímos que:

1- O veneno de *T. serrulatus* possui letalidade maior em camundongos do que o de *T. bahiensis* (DL_{50} de 0,54mg/kg vs 0,72mg/kg), quando administrado por via intraperitonial.

2- Em preparações neuromusculares de diafragma de rato, os dois venenos causaram aumento na amplitude das contrações musculares, porém o veneno de *T. serrulatus* foi mais potente que o de *T. bahiensis* em produzir bloqueio neuromuscular.

3- Na preparação nervo frênico diafragma de rato curarizada sob estimulação elétrica indireta, o veneno de *T. serrulatus* foi mais potente em antagonizar o bloqueio neuromuscular causado pela d-Tc, em relação ao veneno de *T. bahiensis* sugerindo que o veneno de *T. serrulatus* induza uma maior liberação de acetilcolina pelas terminações nervosas colinérgicas do que o veneno de *T. bahiensis*.

4- Nas preparações curarizadas de diafragma de rato, o veneno de *T. bahiensis* aumentou a tensão das respostas do músculo à excitação direta e retardo no relaxamento destas contrações. Também em preparações curarizadas, apenas o veneno de *T. bahiensis* produziu fibrilações e fasciculações. Este efeito sugere atuação no canal de sódio

(retardo na nativação deste canal altera o relaxamento da contração muscular), sugerindo maior teor de toxinas alfa.

5- Em preparações de *biventer cervicis* de pintainho, os dois venenos comportaram-se de maneira similar. As fibras musculares desta preparação são multifocais, ou de inervação múltipla; responderam aos venenos com contratura e bloqueio neuromuscular. Sugere-se, que a intensa contratura seja decorrente da grande quantidade de liberação de acetilcolina, provocada pelos venenos.

6- Sabendo que o veneno de *T. serrulatus* é capaz causar liberação dos neurotransmissores sinápticos, resultantes da ação excitatória de suas toxinas na membrana axonal (Watt *et al*, 1984), sugere-se desta forma, que, o mesmo proceda para o veneno de *T. bahiensis*, uma vez que nos experimentos sobre a avaliação de alteração da pressão arterial os dois venenos causaram liberação de catecolaminas e acetilcolina.

7- Em preparações de aurícula isolada de cobaia, os efeitos parassimpáticos prevaleceram mais nas preparações incubadas com o veneno de *T. bahiensis*, sugerindo que as toxinas deste veneno causem uma despolarização mais sensível às terminações nervosas colinérgicas.

8- Baseado no fracionamento destes venenos sugere-se que eles possuam diferenças em sua composição peptídica uma vez que o perfis de fracionamento destes revelaram-se diferentes e as toxinas que tiveram ação neurotóxica ocupavam posições diferentes neste perfil. Através da cromatografia por gel filtração observou-se que, as principais frações que continham neurotoxicidade possuíam baixo peso molecular, para as duas espécies.

7- SUMMARY

T. bahiensis and *T.serrulatus* are the main scorpion species involved in envenomations in the Brazil, the latter being the more widely distributed. Clinically, envenomations by *T. serrulatus* is more serious than that by *T. bahiensis.* In this thesis, the lethal and neurotoxic activities of venoms from these two species were compared.

Male Swiss withe mice (18-20 g) were used to determine the i.v. LD_{50} of the venoms and the rat phrenic nerve-diaphragm preparations was used to examine the neuroxic activity. The LD_{50} for *T. bahiensis* and *T. serrulatus* venom was 0,72 (95% CI: 0,68 –0,75) mg/Kg and 0,54 (95% CI: 0,45-0,64) mg/Kg, respectively. In phrenic nerve-diaphragm preparations, both venoms (2,5 μg/ml) produced similar responses, namely, na increase in contraction amplitude and in the number of fasciculations, as well as mucle contracture followed by neuromuscular blockade. Similar effects were observed for the two venoms in the *chik biventer* cervicis neuromuscular preparation.

T.serrulatus venom completely reverted the neuromuscular blockade produced by d-tubocurarine (d-Tc 1,46 M) in 35,0 $\pm$ 1,8 min and 18,0 $\pm$ 1,2 min at the concentrations of 2,5 μg/ml and 5 μg/ml, respectively. At these same concentrations, *T. bahiensis* venom produced only partial reversal after 60 min. Both venoms (100-600μg/Kg) produced marked alterations in the blood pressure of anesthesized rats, including hypo- and hypertensive responses as well as bradycardia. The latter effect was also observed in guinea-pig isolated atria. In both of these preparations, *T. bahiensis* venom was moe potent than *T.serrulatus* venom.

The fractionation of *T. bahiensis* and *T.serrulatus* venoms by gel filtration on Superdex 75 resulted in 13 na 12 peaks, respectively. All peaks were tested neuromuscular activity in the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation. Several peaks increased the amplitude of the contractions in indirectly stimulated preparations and produced neuromuscular blockade and fasciculations, as well as spontaneous muscle contractions.

In general, the venoms of *T. bahiensis* and *T. serrulatus* produced similar pharmacological effects but differed in potency. Since Tityus scorpions venoms contain a variety of alfa and beta neurotoxins with marked neuromuscular activity, the differences seen between these two venoms may reflect variation in their content of these toxind or may indicate the presence of novel toxins with similar pharmacological effects on the mammalian neuromuscular junction.

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARANTES, E.C., SAMPAIO, S.V., VIEIRA, C.A. & GIGLIO, J.R. – What is tityustoxin? **Toxicon 20**: 786-789, 1992.

ARANTES, E.C., RICCIOPO, F., SAMPAIO, S.V., VIEIRA, A.C. & GIGLIO, J. R. – Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na^+ channels. **Biochimica et Biophysica Acta 1199**: 69-75, 1994.

BARHANIN, J., GIGLIO, J.R., LEOPOLD, P., SCHMID, A., SAMPAIO, S.V. & LAZDUNSKI, M. - *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. **J. Biol. Chem. 21**: 1253-1258, 1982.

BARHANIN, J., PAURON, D., LOMBET, A., NORMAN, R.J., VIJVERBERG, P.M., GIGLIO, J.R. & LAZDUNSKI, M. – Electophysiological characterization, solubilization and purification of the *Tityus* γ receptor associated Na^+ channel from rat brain. **EMBO J. 2**: 915-920, 1983.

BARHANIN, J., MEIRI, H., ROMEY, G., PAURON, D. & LAZDUNSKI, M. - Monoclonal immunotoxin acting on the Na^+ channel, with properties similar to those of a scorpion toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci USA 82**: 1842-1846, 1984.

BECERRIL, B., CORONA, M., MEIJA, M.C., BOLIVAR, F., & POSSANI, L. D. – Toxins and genes isolated of *Tityus* genus. – **Toxicon 35**: 821-835, 1996.

BECHIS, G., SAMPIEIRI, F., YUAN, P.M., BRANDO, T., MARTIN, M.F., DINIZ, C.R., & ROCHAT, H. – Amino acid sequence of toxin VII, a beta-toxin from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Biochem. Biophys. Res. Commum 122**: 1146-1153, 1982.

BRAZIL, V. - Contribuição ao estudo do envenenamento pela picada de escorpião e seu tratamento.- **Col. Trabs. Inst. Butantan 1901-917**: 71-81, 1907.

BRAZIL, V. - Soro anti-escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan 1**: 47-52, 1918.

BUCARETCHI, F., NOGUEIRA, R.J.N., FONSECA, M.R.C., & ZAMBRONE, F.A D. A comparative study of severe envenomation scorpion caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Rev. Inst. Med Trop. São Paulo 37**: 331-336, 1995.

BUCARETCHI, F., BARACAT, C. E., ZAMBRONE, F. A. D., & CHAVES, A.– Severe scorpion envenomation caused *by Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Toxicon 34**: 15, 1996.

BÜCHERL, W. - Escorpiões e escorpionismo no Brasil. I. Manutenção de escorpiões em viveiros e extração de venenos. **Mem. Inst. Butantan 25**: 53-82, 1935.

BÜCHERL, W.- Escorpiões e escorpinismo no Brasil II. Atividade das peçonhas de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* sobre camundongos. **Mem. Inst. Butantan 25:** 83-103, 1953.

BÜCHERL, W. - Escorpionismo no Brasil. **Mem. Inst. Butantan 34**: 9-24, 1969.

BÜLBRING, E. - Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation on the rat. **Brit. J. Pharmacol. 1**: 38, 1946.

CALAHAN, M.D.- Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibers by *Centruroides sculputuratus* scorpion venom. **J. Physiol. 244**: 511-533, 1975.

CATERALL, W.A. - Neurotoxins that act on voltage sensitive sodium channels In frog muscle. **J. Gen Physiol. 743**: 357-391, 1980.

CORRADO, A.P., ANTONIO, A. &. DINIZ, C.R. - Recent advances on the mechanism of action of Brazilian scorpion venom *T. serrulatus* **Mem. Inst. Butantan 33**: 957-960, 1968.

CORRADO, A.P., RICCIOPPO, F. & ANTONIO, A. - The mechanism of the hypertensive effect of Brazilian scorpion venom (*Tityus serrulatus* Lutz e Mello). **Toxicon 12**: 145-150, 1974.

CORRADO, A.P., DINIZ, C.R. & ANTONIO, A. – Neurotransmitter release by the Toxin brazilian scorpion venom *Tityus serrulatus* Lutz e Mello. **Concepts of membranes in Regulation and Excitation, edited by rocha e Silva,**193-199, 1975.

CORRADO, A.P., ANTONIO, A. & DINIZ, C.R. - Brazilian scorpion venom *Tityus serrulatus* an unusual sympathetic post-ganglionic stimulant. **J. Pharmacol. Exp. Ther 164**: 253-258, 1978.

COURAUD, F., JOVER, E., DUBOIS, J.M. & ROCHAT, H. - Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to activation, the other to inativation of the action potential sodium channel. **Toxicon 20**: 9-16, 1982.

COUTINHO-NETO, J., ABDUL-GHANI, A.S., NORRIS, P.J., THOMAS, A.J. & BRADFORD, H. F. - Effects of scorpion venom toxin on release of amino acid neurotransmitter from cerebral cortex *in vivo* and *in vitro*. **J. Neurochem. 35**: 558-565, 1980.

DE LIMA, M., MARTIN, M. F., DINIZ, C. R. & ROCHAT, H. – *Tityus serrulatus* bears pharmacological properties of boot beta–toxin and insect toxin from scorpion venoms. **Biochem. Biophys. Res. Commum 139**: 296-302, 1986.

DI FERRANTE, N., - Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. **J. Biol. Chem 220:** 303-306, 1956.

DINIZ, C.R. & TORRES, J.M. - Release of acetylcholine-like substance from guinea-pig ileum by scorpion venom. **Toxicon 5**: 277-281, 1968.

DINIZ, C.R., GOMEZ, M.V., ANTONIO, A. & Corrado, A.P. - Chemical properties and biological activity of *Tityus* venom. **Mem. Inst. Butantan 33**: 899-902, 1972

DRUMOND, Y.A., COUTO, A.S., MORAIS-SANTO, T., ALMEIDA, A.P. & MAIA-FREIRE-MAIA - Effects of toxin Ts-γ and tityustoxin purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom on isolated rat atria. **Comp. Biochem. Physiol. 111 C**: 183-190, 1995.

FREIRE MAIA, L. – Peripheral effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom. **J. Toxinol Toxin Rev. 14**: 423-435, 1995.

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

GINSBORG, B.L. & WARRINER, J.N. – The isolated chick *biventer cervicis* nerve Muscle preparation. **Brit. J. Pharmacol. 15**: 410-411, 1960.

GOMES, M.V. & DINIZ, C.R. - Separation of toxic components from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. **Mem. Inst. Butantan 33**: 899- 902, 1966.

GOMES, M.V. & Farrel, N. – The effect of tityustoxin on the release of Acetylcholine from slices of cortex of rat brain – **Neuropharmacology 24**: 1103-1107, 1985.

JAIMOVICH, E., ILDEFONSE, M., BARHANIN, J., ROUGIER, O. & LAZDUNSKI, M. – Centruroides toxin, a selective blocker of surface sodium channel, in skeletal muscle: voltage-clamp analysis and biochemical characterzation of the receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci USA 79**: 3896-3900, 1982.

KOPENHOFER, E., & SCHMIDT, H., - Die Wirkiung von Skorpiongift auf die Ionestrom des ranvierischem Schurring II, Unvollstandige Natrium-Inaktivierung. **Pflügers Arch. Ges. Physiol. 303**: 150-161, 1968.

KUNITZ, M. – Crystalline soybean trypsin inhibitor. II general properties.– **J. Gen. Physiol. 32:** 291-230, 1947.

LOURENÇO, W.R. & CUELLAR, O. – Scorpions, scorpionism, life history strategic and parthenogenesis **J.venom. Anim. Toxins 1**: 51-52, 1995.

MAURANO, H. - Envenenamento escorpiônico e seu tratamento. (Ext. these inaugural. Dr. H. Maurano,1915). **Col. Trabs. Inst. Butantan 1901- 917**: 369-398, 1915.

NISHIKAWA, A.K., CARISATI, C.P., LIMA, M.L.S.R., Dos SANTOS, M.C., KIPNIS, T.L., EICKSTED, V.R.D., KNYSAK, L., da SILVA, M.H., HIGASHI, H.G. & Dias da Silva. – Antigenic cross reactivity among the venoms from several Species of scorpions. **Toxicon 32**: 989-998, 1994.

POSSANI, L.D., ALAGÓN, A.C., FLETCHER JR., P.L. & ERICKSON, B.W. - Purification and properties of mamalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. **Arch. Biochem. Biophys 180**:394-403, 1977.

POSSANI, L.D, MARTIN, B.M., MOCHA-MORALES ,J.- Purification and chemical characterization on the major toxin from the venom of *Tityus serrulatus*. **Carlsberg Res. Commun 46**: 195-205, 1981.

POSSANI, L.D., MARTIN, B.M., SVENDSEN, J., RODE, G.S. & ERICKSON, B.W. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus.* **Biochem. J. 229**: 739-750, 1985.

POSSANI, L.D., FLETCHER JR, P.S, FLETCHER, M., RODE, G.S., MOCHEA MORALES, J., LUCAS, S., CORONAS, F.V., ALAGÓN, A.C & MARTIN, B.M. Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. **Mem.Inst.Butantan 54**: 35-52, 1991.

SAMPAIO, S.V., LAURE, C.J., & GIGLIO, J.R. – Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus.* **Toxicon** (21) 265-277, 1983.

SANDOVAL, M.R. L. & DORCE, V.A.C. – Behavioral and electroencephalographic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom **Toxicon 31**: 205-212, 1992.

SILVEIRA, N.P., MORAIS-SANTOS, T., AZEVEDO, A.D. & FREIRE -MAIA, L. - Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venopm and one of its purified toxins on isolated guinea pig heart. **Comp.Biochem. Physiol. 98 C**: 329-336, 1991.

TOLEDO, D. & NEVES, A.G.A. – Purification and partial characterization of a scorpion *Tityus serrulatus* **Comp. Bioche. Phisyol. 558**: 249-553,1976.

TOOD, J.W. – The treatment of scorpion sting. **J. Hyg 9**: 69-85, 1909.

TREQUATRINI, C., ZAMUDIO, F.Z., PETRIS, A., PRESTIPINO, G. POSSANI, L.D. & FRANCIOLINI, F. - *Tityus bahiensis* toxin IV-5b selectively affects Na^+ channel inactivation in chick dorsal root ganglion neurons. **Comp. Biochem. Physiol.112 B**: 21-28 1995.

VIJVERBERG, H.P. M & LAZDUNSKI, M. A. – The effect of *Tityus serrulatus* scorpion on Na^+ channel in neuroblastoma cells **Pflügers Arch 401**: 297-303 1984.

VITAL BRAZIL, O., NEDER, A.C. & CORRADO, A.P. - Effects and mechanisms of action of *Tityus serrulatus* venom on skeletal muscle. **Pharmacol. Res. Commum 5**:137-150, 1973.

WARNICK, J.E., ALBUQUERQUE, E.X. & DINIZ, C.R. - Eletrophysiological observations on the action of the purified scorpion venom, Tityustoxin on nerve and skeletal muscle of the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther. 198**: 155-167, 1976.

WATT, D.D, SIMARD, J.M., BABIN, D.R. & MLEJNCK, R.V. – Physiological characterization of toxins isolated from scorpion venom. **Toxins Animal, Planta and Microbial: 647-660,** 1978.

WATT, D.D. & SIMARD, J.M. – Neurotoxic proteins scorpion venom.

J. Toxinol. Toxin 3: 181-221, 1984.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE