



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JACKSON GABRIEL MIYAMOTO

**LESÃO PULMONAR AGUDA NO ESCORPIONISMO
EXPERIMENTAL:
COMPARATIVO ENTRE PEÇONHAS DE DOIS
REPRESENTANTES DA FAMÍLIA BUTHIDAE DA
ESCORPIOFAUNA BRASILEIRA**

JACKSON GABRIEL MIYAMOTO

**LESÃO PULMONAR AGUDA NO ESCORPIONISMO
EXPERIMENTAL:
COMPARATIVO ENTRE PEÇONHAS DE DOIS
REPRESENTANTES DA FAMÍLIA BUTHIDAE DA
ESCORPIOFAUNA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Miyamoto, Jackson Gabriel .

LESÃO PULMONAR AGUDA NO ESCORPIONISMO EXPERIMENTAL: COMPARATIVO ENTRE PEÇONHAS DE DOIS REPRESENTANTES DA FAMÍLIA BUTHIDAE DA ESCORPIOFAUNA BRASILEIRA / Jackson Gabriel Miyamoto. - Londrina, 2018.
54 f. : il.

Orientador: Fábio Henrique Kwasniewski.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2018.
Inclui bibliografia.

1. A comparative study of pathophysiological alterations in scorpionism induced by *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* venoms - Tese. I. Kwasniewski, Fábio Henrique . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

JACKSON GABRIEL MIYAMOTO

LESÃO PULMONAR AGUDA NO ESCORPIONISMO

EXPERIMENTAL:

COMPARATIVO ENTRE PEÇONHAS DE DOIS REPRESENTANTES
DA FAMÍLIA BUTHIDAE DA ESCORPIOFAUNA BRASILEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador : Prof. Dr. Fábio Henrique
Kwasniewski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Andressa de Freitas Mendes Dionisio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de abril de 2018.

Dedico este trabalho a todos professores, do ensino fundamental, médio, graduação e pós graduação, que me incetivaram, orientaram e zelaram durante toda minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos professores, graduandos, pós-graduandos, técnicos e servidores que de alguma forma me ensinaram e auxiliaram meu desenvolvimento, particularmente as Glauretes, Philenéticas e Waldicênicas.

Ao Instituto Butantan, em especial, as pesquisadoras do Laboratório de Artrópodes, Denise Maria Candido e Irene Knysak, por cederem as peçonhas utilizadas neste estudo.

Aos responsáveis pela Pós-graduação em Patologia Experimental, professor Wander Rogério Pavanelli e o secretário Sérgio Camargo Sisti, e aos docentes ligados ao programa, pela contribuição em minha formação.

À CAPES pela bolsa de estudo, permitindo que dedicasse exclusivamente a pesquisa.

À banca de qualificação, Andressa de Freitas Mendes Dionisio e Emerson José Venancio por contribuírem na edificação deste trabalho.

Em particular os colegas: Eliane Swely Amador Monteiro Sanches, Fabio Bonifacio de Andrade, Paola Gomes Benicio Souza, Rafaela Pires Erthal, Rito Santo Pereira, e todos moradores do pensionato Galvão pela amizade, cumplicidade e acolhimento, sendo primordiais durante esse período.

À Maria Isabel Lovo Martins Busch Pereira e Vanessa Jacob Victorino pela paciência, disponibilidade e amparo durante as experimentações.

Por fim, gostaria de agradecer especialmente meu orientador pela oportunidade, conhecimentos, companheirismo, honestidade e integridade, sendo um exemplo profissional e pessoal.

Miyamoto, Jackson Gabriel. **Lesão pulmonar aguda no escorpionismo experimental:** comparativo entre peçonhas de dois representantes da família Buthidae da escorpiofauna brasileira. 2018. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

O escorpionismo é importante assunto de saúde pública no Brasil e em vários países, sendo os escorpiões da família Buthidae envolvidos nos acidentes de importância médica. No Brasil, os principais escorpiões dessa família são do gênero *Tityus*, cujos representantes respondem pela maioria dos acidentes. Os *Tityus serrulatus* são os principais desencadeadores de acidentes graves no Brasil, quando edema pulmonar pode se instalar e está envolvido com o óbito. Assim, a maioria dos estudos é desenvolvida com sua peçonha, tendo sido demonstrado que desencadeia inflamação sistêmica e pulmonar, com leucocitose, edema e influxo leucocitário para os pulmões. Os escorpiões *Rhopalurus rochai* também pertencem à escorpiofauna brasileira e à família Buthidae; ocupando regiões de cerrado, pouco habitadas, não existem estudos epidemiológicos ou experimentais acerca da ação da sua peçonha no aparelho respiratório. Investigamos comparativamente a fisiopatologia do escorpionismo experimental em ratos machos, induzido pela administração intravenosa (iv) das peçonhas de *T. serrulatus* 200 µg/kg (pTs) e *R. rochai* 200 µg/kg (pRr 200) ou 400µg/kg (pRr 400); animais controles receberam NaCl 0,9% apirogênica iv em mesmo volume que as peçonhas. Foram avaliados parâmetros pulmonares como a permeabilidade vascular por extravasamento de azul de Evans (aE, 30 minutos) e proteínas (por Bradford) no lavado bronco-alveolar (LBA, 4 e 24 horas), hemorragia pela quantificação da cianometahemoglobina (60 minutos), influxo de leucócitos (4 e 24 horas) para os pulmões pela atividade da mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG), e contagem no LBA, e produção de óxido nítrico (NO) nos pulmões pelo método de Griess modificado. Foram avaliadas também a mobilização de leucócitos para o sangue (contagem total e diferencial por microscopia) e produção do NO no coração. As peçonhas induziram aumento da permeabilidade vascular (30 minutos) no aparelho respiratório e acúmulo de proteínas nos pulmões após 24 horas, porém, ambos foram mais afetados pela pTs e só esta promoveu aumento da permeabilidade nos brônquios internos e pulmões, e acúmulo de proteínas em 4 horas. A hemorragia ocorreu nos brônquios internos e pulmão do grupo pTs. A atividade da MPO (4 e 24 horas) e NAG (24 horas), além da concentração de NO nos pulmões (4 e 24 horas), aumentou apenas no grupo pTs. No LBA houve aumento de leucócitos e células mononucleares (4 horas) no grupo pRr 400, enquanto o grupo pTs apresentou aumento de polimorfonucleares da 4^a a 24^a hora quando também ocorreu leucocitose. Alterações no leucograma ocorreram apenas no grupo pTs, com leucocitose, neutrofilia e linfopenia após 4; em 24 horas observou-se adicionalmente linfocitose e monocitose. No coração, apenas a pRr 400 promoveu diminuição de NO abaixo dos controles. Concluímos que a maioria das alterações avaliadas, ocorreram, e foram mais intensas com a pTs; a pRr não pode ser considerada atóxica, mas provavelmente é incapaz de induzir acidentes graves e morte.

Palavras-chave: Escorpiões. Fisiopatologia. Edema pulmonar. Leucócitos. Óxido nítrico.

Miyamoto, Jackson Gabriel. **Acute lung injury in experimental scorpionism: comparison between two Buthidae venoms from Brazilian scorpiofauna.** 2018. 65 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

The scorpionism is a public health issue in Brazil and several other countries and the Buthidae's family scorpions are involved in accidents medically relevant. In Brazil, the main scorpions of this family belong to *Tityus* genus, whose representatives account for most of the accidents. Severe envenomation is related mainly to *Tityus serrulatus* in Brazil, and pulmonary edema is involved in death; thus the majority of studies are developed with its venom. It was demonstrated that the venom from this triggers systemic and pulmonary inflammation, with pulmonary edema, leukocytosis and leukocyte migration to the lungs. The *Rhopalurus rochai* belong to Brazilian scorpiofauna and to Buthidae family as well; residing in regions of cerrado, poorly inhabited, therefore there are no epidemiological or experimental studies concerning its activity in the respiratory system. The study investigated comparatively the pathophysiology of experimental scorpionism in rats by intravenous (iv) administrations of *T. serrulatus* venom 200 µg/kg (Tsv) and *R. rochai* 200 µg/kg (Rrv 200) or 400 µg/kg (Rrv 400). Control group received NaCl 0,9% apyrogenic in the same volume as the venoms. We evaluated pulmonary parameter, such as vascular permeability by Evans blue extravasation (aE, 30 minutes) and proteins (by Bradford method) in bronchoalveolar lavage (BAL, 4 and 24 hours), hemorrhage by cyanomethemoglobin quantification (60 minutes), leukocytes mobilization (4 and 24 hours) to the lungs through the activity of myeloperoxidase (MPO) and N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG), leukocyte counts in BAL, and nitric oxide (NO) production in lung's parenchyma by modified Griess method. We also evaluated leukocyte mobilization to peripheral blood (total and differential counts through microscopy) and quantified NO in cardiac tissue. Both venoms were able to induce aE extravasation in respiratory tract's segments and protein accumulation after 24 hours, however both parameters were more affected by Tsv and only this promoted increase aE in internal bronchi and lungs and protein accumulation in BAL at 4 hours. Hemorrhage occurred in lower segments (internal bronchi and lung) only in Tsv group. The activity of MPO (4 and 24 hours), NAG (within 24 hours), and NO content in lungs (4 and 24 hours), were increased only in Tsv group. There was an increase of leukocytes and mononuclear cells in BAL (4 hours) in Rrv 400 group, while Tsv group showed a raise in polymorphonuclear cells, lasting up to the 24th hour (when leukocytosis also occurred). Changes in leukogram were found only in Tsv group, with leukocytosis, neutrophilia and lymphopenia after 4 hours; after 24 hours, lymphocytosis and monocytosis also occurred. Only Rrv 400 affected the heart, promoting a decrease on NO levels, below those found in NaCl group. We conclude that the majority of the evaluated parameters were more affected by Tsv; and Rrv although not atoxic, probably will not induce severe envenomations nor deaths.

Keywords: Scorpions. Pathophysiology. Pulmonary edema. Leukocytes. Nitric oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Anatomia do escorpião.....	11
Figura 2 – <i>Tityus serrulatus</i>	13
Figura 3 – <i>Rhopalurus rochai</i>	14
Figura 4 – Permeabilidade vascular nas vias aéreas.....	26
Figura 5 – Dosagem de proteínas no LBA.....	27
Figura 6 – Lesões hemorrágicas nas vias aéreas.....	27
Figura 7 – Atividade da MPO em homogenatos pulmonares.....	28
Figura 8 – Atividade da NAG em homogenatos pulmonares.....	28
Figura 9 – Leucócitos no LBA.....	28
Figura 10 – Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos.....	30
Figura 11 – Concentração de NO_2^- em homogenatos cardíacos e pulmonares.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aE	azul de Evans
AP-1	fator de transcrição AP-1 (<i>activator protein 1</i>)
CD11	antígeno CD11
CD14	antígeno CD14
CD18	antígeno CD18
CK-MB	creatinoquinase fração MB
cNOS	óxido nítrico sintases constitutivas
eNOS	óxido nítrico sintases endoteliais
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
ICAM-1	molécula 1 de adesão intercelular
IFN- γ	interferon gama
IL-1R	receptores de interleucina-1
IL-1 α	interleucina 1alfa
IL-1 β	interleucina 1beta
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
iNOS	óxido nítrico sintases induzíveis
iv	intravenoso
LBA	lavado bronco-alveolar
LTB ₄	leucotrieno B ₄
LTD ₄	leucotrieno D ₄
MPO	mieloperoxidase
MyD88	fator 88 de diferenciação mieloide
NF- κ B	fator nuclear kappa B
NK ₁	receptores de neurocinina-1
NLRP3	proteína 3 que contém domínio de pirina da família NLR
nNOS	óxido nítrico sintases neuronais
NO	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito
NOS	óxido nítrico sintase
NAG	N-acetil- β -D-glicosaminidase

PAF	fator ativador de plaquetas
PGE ₂	prostaglandina E ₂
pRr	peçonha de <i>Rhopalurus rochai</i>
pRr 200	peçonha de <i>Rhopalurus rochai</i> na dose de 200 µg/kg
pRr 400	peçonha de <i>Rhopalurus rochai</i> na dose de 400 µg/kg
pTs	peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>
SARA	síndrome da angústia respiratória aguda
SINAN	sistema de informação de agravos de notificação
SP	substância P
TLR	receptor toll- <i>like</i>
TLR2	receptor 2 toll- <i>like</i>
TLR4	receptor 4 toll- <i>like</i>
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
VAMP	padrões moleculares associados à peçonha

SUMÁRIO

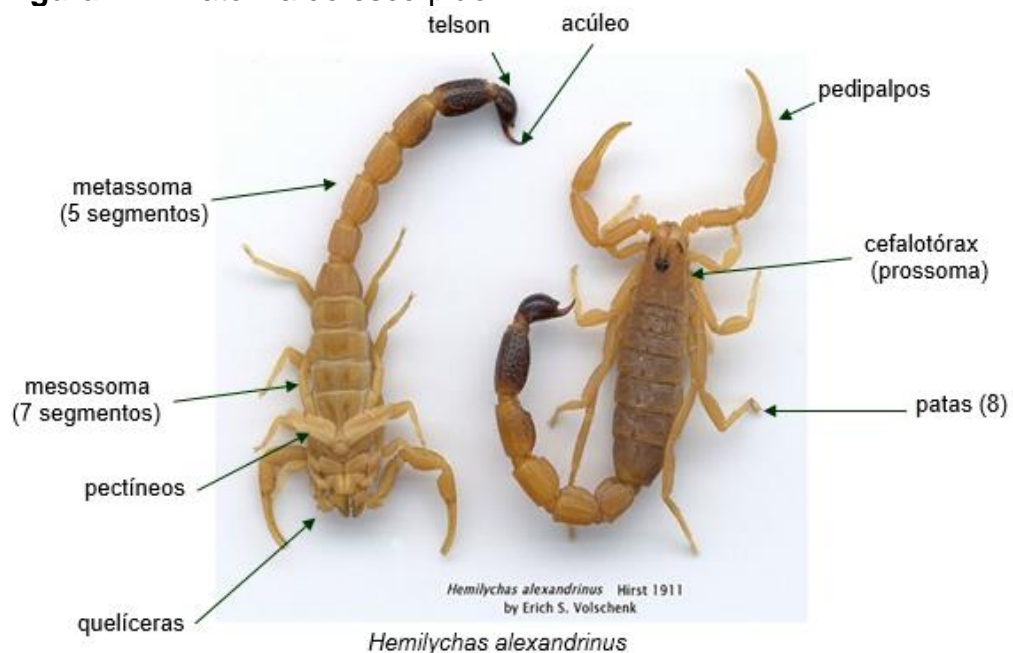
1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Epidemiologia e clínica do escorpionismo.....	14
1.2	Escorpionismo e inflamação	16
1.3	Considerações finais	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivos específicos	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	Animais experimentais e peçonha escorpiônica	22
3.2	Indução do escorpionismo experimental	22
3.3	Avaliação do aumento da permeabilidade vascular no aparelho respiratório	22
3.4	Avaliação da hemorragia no aparelho respiratório.....	23
3.5	Mobilização de leucócitos para o aparelho respiratório e sangue	23
3.6	Avaliação da produção de NO no pulmão e coração.....	25
3.7	Análise estatística.....	25
4	RESULTADOS	26
4.1.	Permeabilidade vascular nas vias aéreas.....	26
4.2.	Hemorragia nas vias aéreas.....	27
4.3.	Mobilização de leucócitos para o pulmão	27
4.4.	Mobilização de leucócitos para o sangue.....	29
4.5.	Concentração de óxido nítrico no sistema cardiorespiratório	30
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42
	ANEXO A – <i>A comparative study of pathophysiological alterations in scorpionism induced by <u>Tityus serrulatus</u> and <u>Tityus bahiensis</u> venoms</i>	55

1 INTRODUÇÃO

Os escorpiões são artrópodes quelicerados, pertencentes ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida e ordem Scorpiones, existindo na Terra há cerca de 400 milhões de anos. A maioria das espécies envolvidas nos acidentes considerados de importância médica (escorpionismo) são representantes da família Buthidae, respondendo por 95% dos acidentes e suas espécies consideradas as mais mortíferas; exceções são as famílias Hemiscorpiidae e Scorpionidae, responsáveis pelos 5% dos acidentes restantes (LORET; HAMMCOCK, 2001; LOURENÇO, 2018).

A fauna escorpionica brasileira é representada pelas famílias Bothriuridae, Chactidae, Liochelidae e Buthidae, destaca-se que a última detém a maior parte das espécies, incluindo as de interesse em saúde pública. O escorpião (Figura 1) é constituído por prossoma (carapaça), onde estão inseridos um par de quelíceras, um par de pedipalpos e quatro pares de pernas; mesossoma (tronco) onde encontram-se o opérculo genital, apêndices sensoriais e espiráculos; e metassoma (cauda), possuindo em sua extremidade, o télson, onde localizam-se o ferrão e glândulas de veneno sendo, portanto, caracterizados como animais peçonhentos (BRASIL, 2009).

Figura 1 – Anatomia do escorpião.



Adaptado de: *The spiral burrow library*¹

¹ Disponível em: <<http://www.thedailylink.com/thespiralburrow/species/alex01.html>>. Acesso em jan.2018.

A peçonha dos escorpiões é uma mistura de sais, muco, lipídeos, aminas, nucleotídeos, enzimas, aminoácidos, peptídeos e proteínas de alto peso molecular (PUCCA et al., 2015); suas toxinas podem ser classificadas por diferentes critérios como: peso molecular, atividade em diferentes animais (insetos, mamíferos e crustáceos), mecanismo de ação (neurotoxinas e citotoxinas) e de acordo com sua estrutura (ZHIJIAN et al., 2006). As toxinas melhor caracterizadas e conhecidas são aquelas que contêm pontes dissulfeto e possuem seletividade por canais iônicos, como as neurotoxinas que atuam em canais de Na^+ , divididas em α e β , aumentam a permeabilidade da membrana a este íon. As do tipo α diminuem ou atrasam a desativação desses canais, prolongando o potencial de ação, enquanto as do tipo β levam a hiperpolarização e redução do pico de amplitude de sódio, produzindo potenciais de ação espontâneos, intensificando a cinética de ativação (GWEE et al., 2002). A maioria dos efeitos conhecidos desencadeados pela peçonha escorpiônica em mamíferos são devidos às suas ações em terminações nervosas pós-ganglionares do sistema nervoso autônomo, e também da medula da supra-renal, levando à liberação de catecolaminas e acetilcolina, que atuando em diversos sítios do organismo, são responsáveis por muitos dos sintomas do envenenamento (DINIZ et al., 1974; FREIRE-MAIA, 1995). As toxinas que atuam sobre os canais de K^+ podem ter diversos alvos celulares uma vez que existem cerca de 30 canais permeáveis a este cátion, portanto sua ação depende particularmente da atuação sobre o canal específico. Nesse grupo encontramos toxinas com efeitos sobre doenças como asma, diabetes, câncer, doenças auto-imunes e outras, gerando grande interesse da indústria farmacêutica e biotecnológica (BERGERON; BINGHAN, 2012). Apesar dos transcritos preponderantes atuarem principalmente sobre canais de Na^+ e K^+ , ainda são descritos toxinas dentre os Buthidae que interagem com canais de Ca^{++} , Cl^- , e outras com características de metaloproteases, serino proteases, hialuronidases, fosfolipases, peptídeos antimicrobianos, hipotensinas e potenciadores de bradicinina (ALVARENGA et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2015; DIEGO-GARCÍA; CALISKAN; TYTGAT, 2014; MILLE et al., 2015; NADERISOORKI et al., 2016; ZHIJIAN et al., 2006).

Na fauna brasileira os representantes da família Buthidae envolvidos em acidentes são geralmente do gênero *Tityus*, estando o *Tityus serrulatus* (Figura 2) entre os que possuem a peçonha mais potente da América Latina. Seus representantes apresentam tamanho entre 5 a 7 cm, pernas, cauda e pedipalpos de

coloração amarelo-claro e tronco escuro; a denominação da espécie se deve a presença de serrilha no terceiro e quarto segmentos de sua cauda. São os mais amplamente distribuídos, encontrados em todas as regiões do país (SOUZA et al., 2009) e também responsáveis pela maioria dos acidentes considerados graves e fatais (CUPO et al., 2003; BUCARETCHI et al., 2014). No entanto, dependendo da região do país, o escorpião envolvido pode ser de outra espécie; na Bahia, o principal envolvido é o *Tityus stigmurus* (LIRA-DA-SILVA et al., 2000; BARBOSA et al., 2003), no Pará o *Tityus obscurus* (PARDAL et al., 2003) e em São Paulo o *Tityus bahiensis* (RIBEIRO; RODRIGUES; JORGE, 2001). Acidentes com outros escorpiões da família Buthidae são ocasionalmente descritos e pouco documentados.

Figura 2 – *Tityus serrulatus*.



Fonte: Brasil (2009).

Rhopalurus rochai (Figura 3) é outro escorpião da família Buthidae que faz parte da fauna brasileira; possuem coloração amarelo-palha e alcançam até 8 cm de comprimento, sendo encontrados nos estados da região Nordeste (BRASIL, 2009; PORTO; BRAZIL; LIRA-DA-SILVA, 2010). Embora os pouquíssimos acidentes descritos com *Rhopalurus* (*agememnon* e *amazonicus*) tenham sido leves a moderados (BRANDÃO; FRANÇOSO, 2007; CARVALHO; SANTOS; DIAS, 2007; FUENTES-SILVA; SANTOS-JR; OLIVEIRA, 2014), deve-se considerar que mesmo

os acidentes com *T. serrulatus* embora sejam em sua maioria leves (aproximadamente 90%), têm potencial gravidade descrita em relatos de casos bem documentados e estudos experimentais (AMARAL; DE REZENDE; FREIRE-MAIA, 1993; AMARAL et al. 1994; BRASIL, 2018; FREIRE-MAIA, 1995). Ademais, devido à ocupação pelos *Rhopalurus* de áreas pouco habitadas (cerrado e caatinga), não temos estudos epidemiológicos, a despeito dos acidentes com os *T. serrulatus*, que ocupam regiões densamente povoadas. Além disso, de acordo com Chippaux e Goyffon (2008) qualquer dos escorpiões Buthidae de gêneros reconhecidos como causadores de acidentes de importância médica, que excedam os 5 cm devem ser considerados potenciais causadores de acidentes graves. Os *R. rochai* estão entre os maiores do seu gênero com 6 a 8 cm, e não há descrição de acidentes causados por eles.

Figura 3 – *Rhopalurus rochai*.



Fonte: Brasil (2009).

1.1 Epidemiologia e clínica do escorpionismo

O escorpionismo é um problema de saúde pública nos países na América Central, África, Ásia e na América do Sul, com o número de acidentes anuais no mundo excedendo os 1,5 milhões (CHIPPAUX, 2012). No Brasil é agravo de interesse nacional de notificação ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Entre os acidentes com animais peçonhentos notificados (ofidismo, araneísmo e escorpionismo) é o mais comum e ocorre em todo o território

nacional, mas de forma mais pronunciada nos estados das regiões Nordeste e Sudeste (RECKZIEGEL; PINTO JR, 2014). De acordo com as informações epidemiológicas presentes no SINAN (BRASIL, 2018), nos anos de 2010 a 2014 o número absoluto de acidentes por animais peçonhentos aumentou (124.096 e 170.139 respectivamente), grande parte em virtude dos acidentes ocasionados por escorpiões (51.469 e 87.801 respectivamente), que suplantam em número os ocorridos por serpentes e aranhas. Esse aumento é explicado pela alta capacidade de infestação de ambientes urbanos, propícios para sua proliferação e permanência, provendo abrigo e alimento em abundância. Deve-se destacar que o número de acidentes com esses animais permanece praticamente constante com pequenas flutuações; no entanto, a letalidade é menor no escorpionismo se comparado ao ofidismo. O uso do soro antiescorpiônico é a forma de tratamento preconizada nos casos moderados e graves, sendo dispensado em casos leves. O escorpionismo deve sempre ser avaliado como emergência (especialmente em crianças) por tratar-se de um quadro dinâmico, podendo a classificação da gravidade mudar rapidamente mesmo após a administração do soro antiescorpiônico (CAMPOLINA et al., 2013).

A rápida absorção e distribuição nos tecidos tornam o escorpionismo uma situação de emergência. De acordo com os resultados obtidos em ratos, a peçonha alcança níveis sanguíneos elevados em menos de 5 minutos, e níveis circulantes e de distribuição máximas após 30 minutos da injeção subcutânea, sendo completamente absorvida no período de 2 horas. A peçonha distribui-se amplamente, sendo detectada nos rins, pulmões, coração e fígado. Adicionalmente à rápida taxa de absorção e distribuição da peçonha, sua taxa de redistribuição é pequena, provavelmente devido à sua grande afinidade pelos tecidos, e sua meia vida de eliminação é vagarosa (NUNAN et al., 2003; REVELO et al., 1996; SANTANA et al. 1996).

Clinicamente os acidentes com escorpiões variam entre leves, moderados e graves. Nos acidentes leves ocorrem parestesias (sensação de queimação e formigamento) e, preponderantemente, dor local, cuja intensidade pode avolumar-se e irradiar por todo o membro acometido. Nos acidentes classificados como moderados, acrescido às alterações locais, sucedem-se perturbações sistêmicas, como sudorese, náuseas, salivação e lacrimação, podendo ocorrer desidratação, prostração, agitação, hipertensão ou hipotensão arterial, hiperglicemia,

midríase, piloereção e taquicardia. Nos acidentes graves, somam-se sinais de insuficiência cardíaca, respiratória e neurológica; como insuficiência ventricular esquerda, edema pulmonar, e coma (AMARAL, 1994; FREIRE-MAIA; CAMPOS; FREIRE-MAIA, 1995; KHATTABI et al., 2011). São descritos no envenenamento humano achados laboratoriais como aumento de enzimas cardíacas (creatinquinase MB, CK-MB) e leucocitose (AMITAI, 1998; BUCARETCHI et al., 1995). Praticamente as mesmas alterações são relatadas quanto às peçonhas de escorpiões de importância médica encontrados em outras regiões do mundo (BAWASKAR; BAWASKAR, 1994; BERTKE; ATKINS, 1964; CURRY et al., 1984; DEHESA-DÁVILA; POSSANI, 1994; FREIRE-MAIA et al., 1978; GOYFFON; VACHON; BROGLION, 1982; ISMAIL et al., 1972; ISMAIL; GHAZAL; EL-FAKAHANY, 1980; ISMAIL; FATANI; DABEES, 1992; SOFER; GUERON, 1988).

As alterações relacionadas ao óbito são o edema pulmonar e o choque cardio-respiratório (BUCARETCHI et al., 1995), também presentes no escorpionismo experimental com a peçonha do *T. serrulatus* (FREIRE-MAIA; MATOS, 1993). Devido ao fato de que o *T. serrulatus* é o mais comumente associado aos casos graves de envenenamento, deu-se maior importância ao estudo das ações de sua peçonha; sendo assim, dados sobre a ação das peçonhas de outros escorpiões da fauna brasileira são escassos ou inexistentes. Não podemos descartar que outros escorpiões de nossa fauna possam desencadear acidentes graves visto que são descritos acidentes graves por *T. bahiensis* e *T. obscurus* (BUCARETCHI et al., 1995, 2014; PARDAL et al., 2014).

1.2 Escorpionismo e inflamação

No escorpionismo há indícios de que inflamação local e sistêmica seja relevante para os sintomas observados. Nos acidentes graves a ocorrência de edema pulmonar é um complicador importante, aceitando-se que tenha origem cardiogênica e/ou inflamatória (FREIRE-MAIA, 1995).

Em envenenamentos severos, as peçonhas escorpiônicas são associadas com anormalidades cardíacas e hemodinâmicas, induzindo hipertensão pulmonar e edema em consequência da liberação de catecolaminas por fibras nervosas pós-ganglionares cardíacas ou ainda por ação direta da peçonha sobre os cardiomiócitos (TEIXEIRA et al., 2001). A liberação massiva desses neurotransmissores provoca o aumento da frequência cardíaca, hipertensão e

aumento da contratilidade ventricular (FREIRE-MAIA, 1995); a partir disso, o aumento da pressão hidrostática nos capilares pulmonares resultaria no aumento da filtração no interstício pulmonar, ultrapassando a capacidade de drenagem dos vasos linfáticos e sanguíneos (RASSLER et al., 2003). Durante a fase hipocinética do envenenamento, caracterizada pela hipotensão e choque, esses sinais refletem a falência ventricular esquerda, ocasionando o aumento da pressão atrial esquerda e deslocando o débito sistêmico para a circulação pulmonar, levando a hipertensão venosa pulmonar (congestão venocapilar) e ao escape plasmático para o espaço intersticial e alveolar (ABROUG et al., 1991; RAHAV; WEISS, 1990). Apesar da contribuição cardíaca para a gênese do edema ser bem documentada (BAHLOUL et al., 2013) a participação da lesão capilar-alveolar não cardiogênica no desenvolvimento do edema não pode ser excluída, além disso, a sobreposição dos fenômenos pode atuar de forma sinérgica, como a modulação da contratilidade cardíaca e injúria microvascular coronária, induzida por mediadores inflamatórios, e consequente lesão tecidual e disfunção cardíaca (BAHLOUL et al., 2012; DESHPANDE; AKELLA, 2012)

Devido às similaridades com a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), patologia pulmonar inflamatória com alta letalidade e desencadeada por fatores diversificados (KOLLEF; SCHUSTER, 1995), foi proposto que o termo edema pulmonar no escorpionismo fosse abandonado em favor de “síndrome da angústia respiratória desencadeada pela peçonha de escorpião” (D’SUZE et al., 1999). Os eventos iniciais da SARA são o aumento da permeabilidade alvéolo-capilar e o infiltrado de neutrófilos (HASLETON; ROBERTS, 1999; DOWNEY et al., 1999), fenômenos identificados em vítimas fatais do *T. serrulatus* (AMARAL et al., 1994; AMARAL; REZENDE; FREIRE-MAIA, 1993) e experimentalmente (COELHO et al., 2007; FREIRE-MAIA; MATOS 1993; ZOCCAL et al., 2016).

A ocorrência de aumento sérico de vários mediadores, como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, óxido nítrico, quimiocinas e leucocitose no envenenamento humano está implicada na patogênese do escorpionismo e correlacionada com sua severidade (ABDEL-HALEEM et al., 2006; MAGALHÃES et al., 1999; MEKI; MOHEY EL-DEAN, 1998). Em animais de experimentação também foram encontradas as IL-1 β , IL-6 e TNF- α (FIALHO et al., 2011; PESSINI et al., 2003; PETRICEVICH; PEÑA 2002). Uma das ações dessas citocinas recai sobre os leucócitos, podendo estimular sua produção e mobilização para o sangue e,

disponíveis no sangue, podem ser estimulados a migrar para um tecido extravascular, como os pulmões. Os neutrófilos são células da linhagem mielóide produzidas na medula óssea, comprometidas com a fagocitose de microrganismos invasores, possuindo uma série de grânulos que contêm produtos tóxicos aos microrganismos e que também podem neutralizar seus produtos. No entanto, em determinadas situações, esse arsenal lesivo pode ser mobilizado contra tecidos do próprio organismo, resultando em injúria (BORREGAARD, 2010).

Nos pulmões, a cinética de leucócitos difere de outros leitos capilares, contendo por impedimento mecânico (diâmetro celular) e moléculas de adesão expressas na superfície dos neutrófilos e células endoteliais, um extenso reservatório dessas células em sua microvasculatura, denominado *pool* marginal. Estimulados por diversos mediadores pró-inflamatórios, os neutrófilos emigram para o interstício pulmonar e espaços aéreos (revisado por KUEBLER, 2005). Uma vez no tecido pulmonar terão potencial de desencadear dano (MORAES; ZURAWSKA; DOWNEY, 2006). Sabe-se que a peçonha de *T. serrulatus* é capaz de induzir neutrofilia (BORGES et al., 2000; FIALHO et al., 2011; PESSINI et al., 2003) e migração de neutrófilos para os pulmões (AMARAL et al., 1994; COELHO et al., 2007; ZOCCAL et al., 2016), contribuindo com a patogênese do escorpionismo.

A princípio, a primeira fonte descrita de mediadores inflamatórios utilizando peçonhas escorpiônicas foram macrófagos murinos (PETRICEVICH, 2002; PETRICEVICH; LEBRUN, 2005); recentemente, utilizando camundongos *knockout* Zoccal et al. (2014; 2016) identificaram a capacidade da ativação dos receptores *Toll-like* (TLRs; TLR2, TLR4 e CD14) de macrófagos pelo reconhecimento da peçonha de *T. serrulatus* e suas frações, nomeados como VAMPS (do inglês, *venom-associated molecular patterns*). Essa interação leva ao recrutamento de MyD88, ativação de fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B, culminando na produção de TNF- α , IL-6, PGE₂ e LTB₄.

Quanto à atividade inflamatória da peçonha dos *R. rochai* há apenas um estudo demonstrando que o edema local (pata de camundongos) é leve se comparado aos *T. serrulatus* e *T. bahiensis* (SEVERINO et al., 2009). No entanto, a partir dos resultados desse estudo não é possível fazer extrapolação para efeitos sistêmicos ou pulmonares, uma vez que a concentração escolhida da peçonha foi pautada no efeito local, sem registro de sinais de alteração sistêmica.

Outro mediador com grande impacto na inflamação é o óxido nítrico (NO). Sua descoberta como agente químico na biologia teve início em 1980 quando Furchgott e Zawadzki identificaram um mediador responsável pela vasodilatação induzida pela acetilcolina em preparações *in vitro* de vasos sanguíneos, cuja característica físico-química era desconhecida. Inicialmente denominado fator relaxante derivado do endotélio, foi posteriormente identificado como o NO (IGNARRO et al., 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987; PALMER et al., 1988) e, a partir daí, como uma pequena molécula gasosa envolvida em processos de sinalização altamente regulados (MUSTAFA; GADALLA; SNYDER, 2009), com diversas funções farmacológicas além de sua atuação no relaxamento de vasos sanguíneos. O NO é produzido pela conversão da L-arginina em L-citrulina pela enzima NOS, encontrada em 3 isoformas: NOS 1 ou nNOS (neuronal), NOS 2 ou iNOS (induzível), e NOS 3 ou eNOS (endotelial); as nNOS e eNOS são expressas constitutivamente, desse modo sendo denominadas constitutivas (cNOS), enquanto a iNOS não é tipicamente expressa, necessitando de indução por citocinas ou produtos microbianos (GELLER; BILLIAR, 1998).

O NO é produzido por diversas células, como células imunológicas (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos), células epiteliais, nervosas e endoteliais, e está envolvido em processos de recrutamento e adesão de leucócitos, atividade microbicida e citotóxica (dano tecidual e atividade antitumoral), implicando sua atividade em amplo espectro de doenças inflamatórias humanas (infecciosas, autoimunes, crônico-degenerativas e câncer) (BOGDAN, 2001). Ademais, a produção deste mediador por macrófagos pulmonares contribuem para a resposta inflamatória neste órgão, mediando a injúria inflamatória por peróxinitrito (WIZEMANN et al., 1994) sendo correlacionado também com disfunções cardiovasculares (LECOUR et al., 2001; ROGERS; CISMOWSKI, 2018). No escorpionismo humano e experimental encontram-se níveis séricos de NO aumentados (AHMED et al., 2015; EL-DEEK et al., 2017; MEKI; EL-DEAN, 1998; PETRICEVICH; PEÑA, 2002; SANTHOSH, 2016).

1.3 Considerações finais

Ainda que a maioria dos acidentes com escorpiões considerados graves sejam desencadeados pelos *T. serrulatus*, a escorpiofauna brasileira é rica em animais de possível importância médica pertencentes à família Buthidae. A maior

parte dos dados clínicos e experimentais em nosso país provém do estudo com os *T. serrulatus*, sendo poucos os estudos com peçonhas de outros escorpiões. Recentemente demonstramos que a peçonha de outro escorpião importante da nossa escorpiofauna, o *T. bahiensis*, também é capaz de desencadear alterações fisiopatológicas no aparelho respiratório (MIYAMOTO et al., 2018).

Esse estudo buscou investigar efeitos das peçonhas dos escorpiões *T. serrulatus* (a maior parte desses resultados encontra-se publicada – MIYAMOTO et al., 2018) e *R. rochai* no rato. Os resultados contribuirão para solidificar e aumentar o conhecimento acerca do escorpionismo por *T. serrulatus* e desvendar o potencial toxicológico da peçonha de outro escorpião de nossa escorpiofauna (o *R. rochai*) cuja atividade é praticamente desconhecida. A interpretação comparativa dos resultados auxilia no melhor entendimento do escorpionismo, possibilitando a formulação de ações aplicáveis às vítimas do escorpionismo (casos moderados a graves) sejam essas ações adjuvantes ou não ao tratamento com soro hiperimune.

2 OBJETIVOS

Investigar a fisiopatologia do escorpionismo em modelo experimental decorrente da administração intravenosa das peçonhas dos escorpiões *T. serrulatus* e *R. rochai*.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito das peçonhas no aparelho respiratório:

- a) No aumento da permeabilidade vascular e na hemorragia em seus diferentes segmentos (traquéia, brônquios externos e internos, e pulmões);
- b) No edema pulmonar pela dosagem de proteínas no lavado bronco-alveolar (LBA);
- c) Na mobilização de leucócitos para o espaço aéreo pela contagem de mononucleares e polimorfonucleares no LBA, e no interstício pulmonar pela detecção da atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetil- β -D-glicosaminidase;
- d) Na produção de NO nos pulmões.

Adicionalmente, avaliar os efeitos das peçonhas sobre:

- a) A mobilização de leucócitos para o sangue periférico;
- b) A produção de NO no tecido cardíaco.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais e peçonha escorpiônica

Foram utilizados ratos machos Wistar (200 a 250 g) obtidos do biotério da Universidade Estadual de Londrina em gaiolas com no máximo 5 animais, com ração e água *ad libitum* e em ciclo claro/escuro de 12 horas. As peçonhas dos *T. serrulatus* (pTs) e *R. rochai* (pRr) foram cedidas pelo Laboratório de Venenos do Instituto Butantan, liofilizadas e estocadas em -20°C e no momento do uso, foram diluídas em NaCl 0,9% apirogênica. O estudo engloba projetos aprovados pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL 16583.2013.29 e CEUA/UEL 19958.2016.54).

3.2 Indução do escorpionismo experimental

O escorpionismo experimental foi desencadeamento pela administração por via intravenosa (iv) da pTs na dose de 200 µg/kg (dose subletal). Essa dose foi capaz de induzir edema nas vias respiratórias de ratos Wistar (ZULIANI et al., 2011), e dose semelhante induziu, no mesmo modelo animal, alterações sistêmicas relacionadas com acidentes severos (BORGES et al., 2000). Para a pRr utilizamos as doses de 200 (pRr 200) e 400 µg/kg (pRr 400), posto que a pRr apresenta concentração similar de proteínas em sua peçonha quando comparado a pTs e peçonha de *T. bahiensis* (dados não publicados). Como grupos controles foram utilizados ratos injetados apenas com NaCl isotônica apirogênica (NaCl).

3.3 Avaliação do aumento da permeabilidade vascular no aparelho respiratório

O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado por métodos distintos, em 30 minutos de envenenamento pelo extravasamento de aE, e em 4 e 24 horas após pela dosagem de proteínas no lavado bronco-alveolar (LBA).

O corante azul de Evans (Sigma) diluído em NaCl isotônica apirogênica foi administrado (20 mg/kg) em conjunto com as peçonhas (iv). Após 30 minutos os animais foram mortos pela inalação de CO₂ e exsanguinados. A seguir, a circulação pulmonar foi perfundida com 50 mL de NaCl 0,9% (25 mL/minuto) através de cânula inserida no tronco pulmonar. O aparelho respiratório foi retirado e a traqueia, brônquios externos e internos e o parênquima pulmonar foram isolados e

divididos em dois fragmentos: um colocado em formamida (4 mL/g de tecido, Sigma) para a extração do corante e o outro acondicionado na estufa à 60°C por 48 horas para determinação da razão peso seco/peso úmido. Após 24 horas 75 µL do sobrenadante das amostras em formamida foram coletados e distribuídos em poços de placas de 96 poços com 75 µL de água destilada/poço e a absorbância da amostra determinada por espectrofotometria em leitor de microplacas com filtro de 630 nm. A densidade óptica foi comparada com uma curva padrão do corante previamente estabelecida e os valores obtidos expressos como µg de aE/g de peso seco de tecido.

Para dosagem de proteínas, após 4 e 24 horas da administração das peçonhas foram seguidos os procedimentos de morte e perfusão como descrito acima, logo após foi realizado o LBA com 5 mL de NaCl 0,9% por uma cânula inserida na traquéia. O volume recolhido foi centrifugado a 3000 RPM à 4°C por 10 minutos e a concentração de proteínas determinada pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976) com filtro de 595 nm. Os resultados foram obtidos utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina e representadas como mg/mL.

3.4 Avaliação da hemorragia no aparelho respiratório

A hemorragia foi avaliada utilizando a concentração de hemoglobina tecidual como índice, dosada pelo método colorimétrico da cianometahemoglobina. Após 1 hora da administração das peçonhas, o mesmo procedimento descrito acima para a retirada dos tecidos do aparelho respiratório foi realizado e, após pesagem, foram colocados em líquido de Drabkin (8 mL/g de tecido, Sigma). Após 24 horas, o líquido de Drabkin das amostras foi recolhido, centrifugado à 12.000 RPM por 5 minutos, 150 µL do sobrenadante foi retirado e a absorbância determinada em leitor de microplacas com filtro de 540 nm, comparando os resultados com uma curva padrão previamente estabelecida com hemoglobina de rato (Sigma). Os resultados foram expressos em mg de hemoglobina/g de tecido.

3.5 Mobilização de leucócitos para o aparelho respiratório e sangue

Passadas 4 e 24 horas após o envenenamento foi avaliado a migração de leucócitos aos pulmões e a mobilização para o sangue. Para tanto, os animais foram sacrificados e realizada a perfusão da circulação pulmonar (item 3.3)

e as células presentes no espaço respiratório coletadas através do LBA com 10 mL de NaCl 0,9% gelado por via intratraqueal. O volume recolhido foi centrifugado a 1000 RPM à 4°C por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o botão celular ressuspenso em 1 mL de NaCl 0,9%. Uma alíquota foi diluída em líquido de Turk (1/20) para a contagem de células totais em câmara de Neubauer, e outra alíquota contendo 2×10^5 células (em volume ajustado para 400 μ L) centrifugada a 600 RPM por 4 minutos em citocentrífuga e a lâmina submetida à coloração (Giemsa) para identificação morfológica. Os valores foram expressos como leucócitos $\times 10^6$ /mL.

Além da contagem total e diferencial de leucócitos no LBA, o que permite investigar a presença de leucócitos no lúmen do espaço respiratório, avaliamos a quantidade de leucócitos concentrados no interstício pulmonar. A quantidade de neutrófilos foi avaliada através da dosagem de mieloperoxidase (MPO) (Bradley et al., 1982), e a de macrófagos pela dosagem de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) (LEABACK; WALKER, 1961). Para a dosagem de MPO os pulmões foram pesados e acondicionados em tampão fosfato de potássio 50 mM contendo HTAB (brometo de hexadecil trimetil amônio) 13,72 mM, pH 6,0, na concentração de 2 mL de tampão/g de tecido. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do Polytron (PT3100), seguida de 3 pulsos de ultrassom de 40 Hz por 30 segundos, em intervalos regulares de 5 segundos, em seguida centrifugadas por 2 minutos, 13000 RPM, a 4°C. A dosagem por reação colorimétrica cinética foi realizada em placas de 96 poços contendo os 10 μ L dos sobrenadantes das amostras e 200 μ L da solução de reação (52,64 mM de dihidrocloro de O-dianisidina, 0,05% de H_2O_2 30%, 90 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0 e 10 mL de H_2O destilada). A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placa com filtro de 450 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos por miligrama de tecido, utilizando-se uma curva padrão de neutrófilos. Para a dosagem da NAG, 10 μ L de sobrenadante dos pulmões homogeneizados e com pulsos de ultrassom (como descrito para a MPO) foram colocados em placa de 96 poços e em seguida adicionado 40 μ L de tampão citrato-fosfato 0,04M. A reação foi iniciada pela adição de 50 μ L de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosamina 2,24 mM. A placa foi incubada a 37°C durante 10 minutos e a reação parada pela adição de 50 μ L de tampão glicina 0,2 M pH 10,4. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placa

com filtro de 400 nm. Os resultados foram expressos como número de macrófagos por miligrama de tecido, utilizando-se uma curva padrão de macrófagos.

Para contagem e identificação dos leucócitos sanguíneos, 20 μL de sangue foram retirados pela cauda e adicionados (1/20) em líquido de Turk para a contagem de células totais em câmara de Neubauer e microscópio óptico em aumento de 400x; outra alíquota de 20 μL foi utilizada para a realização de um esfregaço posteriormente corado com Giemsa (HEMA-3), identificando-se as células em microscópio óptico (1000x). Os valores foram expressos como leucócitos $\times 10^3/\mu\text{L}$ de sangue.

3.6 Avaliação da produção de NO nos pulmões e coração

A produção de NO foi avaliada indiretamente pelos níveis de NO_3^- e NO_2^- através do método de Griess adaptado (SUN et al., 2003). As amostras de pulmão e coração foram coletadas após perfusão (item 3.3), pesadas, colocadas em salina isotônica (5 mL/g) e homogeneizadas com auxílio do Polytron (PT3100). Em seguida foram centrifugadas por 10 minutos, 3.000 RPM, a 4°C. O sobrenadante (60 μL) foi submetido a duas etapas de desproteinização e centrifugação 13.000 RPM, com ZnSO_4 75 mM e NaOH 55 mM (2 e 5 minutos respectivamente) e estabilizados com 50 μL de tampão glicina 45 g/L (pH 9,7). As amostras foram incubadas com grânulos de Cádmio previamente ativados com solução de CuSO_4 5mM em tampão glicina por 10 minutos, para conversão de nitrato a nitrito. Por fim, as amostras foram acondicionadas em microplacas de 96 poços com reagente de Griess. A concentração de NO_2^- foi obtida utilizando curvas padrões de NaNO_2 com leitura espectrofotométrica a 550nm. Os valores foram expressos como μM de NO_2^- /grama de tecido.

3.7 Análise estatística

Os dados foram comparados por análise de variância, seguido de comparações múltiplas pelo método de Tukey (dados paramétricos) ou pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de Dunn (dados não paramétricos), com nível de significância de 0,05. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (5.0) (GraphPad, San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

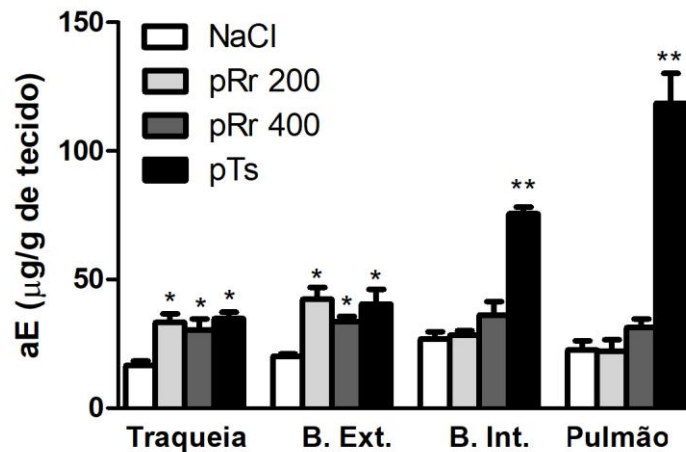
4 RESULTADOS

Em cerca de 5 a 10 minutos, em média, e podendo perdurar por horas após a administração da pTs, foram observados sinais clássicos do envenamento, tais como: lacrimação, salivação, rinorreia, piloereção, pieira, taquipneia, e eventualmente, convulsões. Por outro lado, os animais que receberam a pRr, independentemente da dose, não apresentaram nenhum dos sinais citados.

4.1 Permeabilidade vascular nas vias aéreas

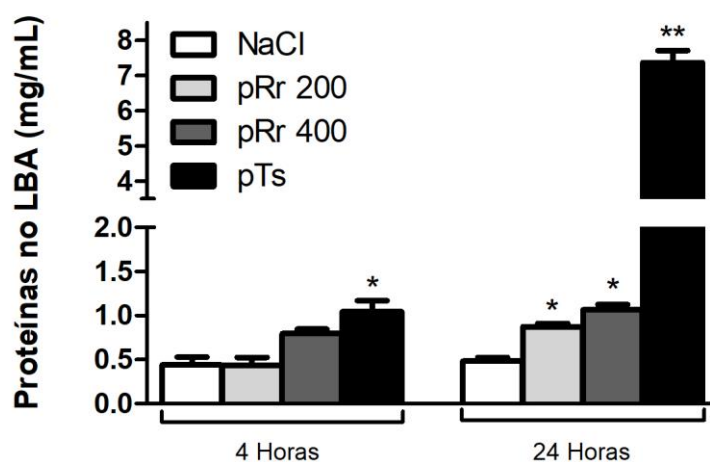
O extravasamento de aE foi maior em todos os segmentos das vias aéreas (traqueia, brônquios externos, internos e pulmão) após 30 minutos da administração de pTs, comparado a salina, enquanto o aumento nos grupos pRr ocorreu apenas na traqueia e brônquios externos (Figura 4). A concentração de proteínas no LBA aumentou após 4 e 24 horas no grupo pTs, enquanto nos grupos pRr o aumento foi observado apenas na 24^a hora (Figura 5).

Figura 4 – Permeabilidade vascular nas vias aéreas. 5 a 9 animais por grupo.



* $p < 0,05$ comparado a NaCl. ** $p < 0,05$ comparado a NaCl e aos grupos pRr.

Figura 5 – Dosagem de proteínas no LBA. Média de proteínas/ml de LBA após 4 e 24 horas, 5 a 7 animais por grupo.

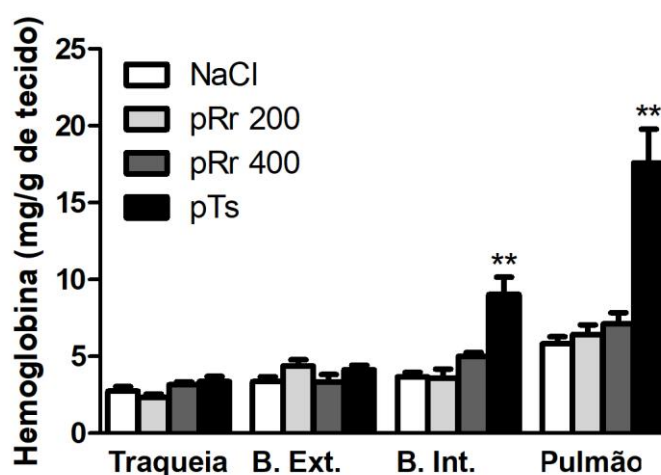


* $p < 0,05$ comparada a NaCl. ** $p < 0,05$ comparado a NaCl e aos grupos pRr.

4.2 Hemorragia nas vias aéreas

Os níveis de hemoglobina não diferiram dos níveis basais nos ratos envenenados com pRr, independentemente da dose utilizada, em todos segmentos estudados; em contraste, a pTs provocou hemorragia nos segmentos inferiores (brônquios internos e pulmão) de forma proeminente (Figura 6).

Figura 6 – Lesões hemorrágicas nas vias aéreas. 5 a 14 animais por grupo.



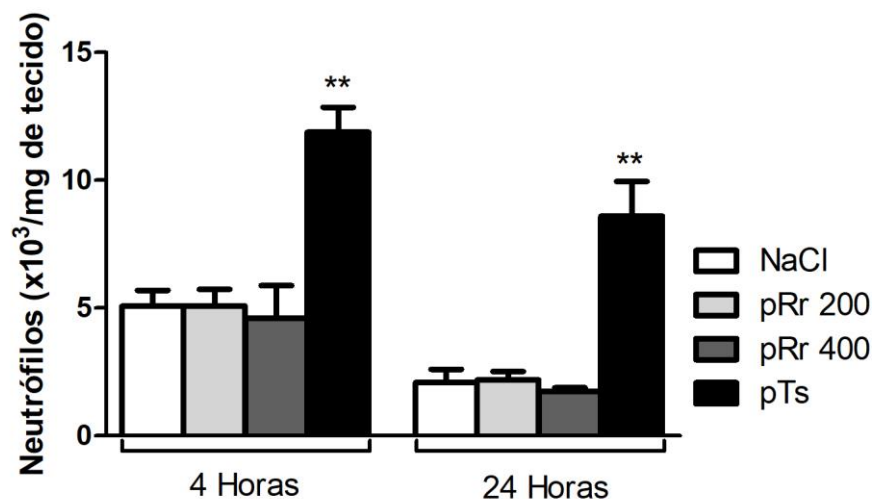
** $p < 0,05$ comparado a NaCl e aos grupos pRr

4.3 Mobilização de leucócitos para o pulmão

A atividade das enzimas MPO e NAG foi utilizada como marcadores indiretos da presença de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, no parênquima pulmonar. Os valores da atividade da MPO aumentaram no grupo pTs (Figura 7)

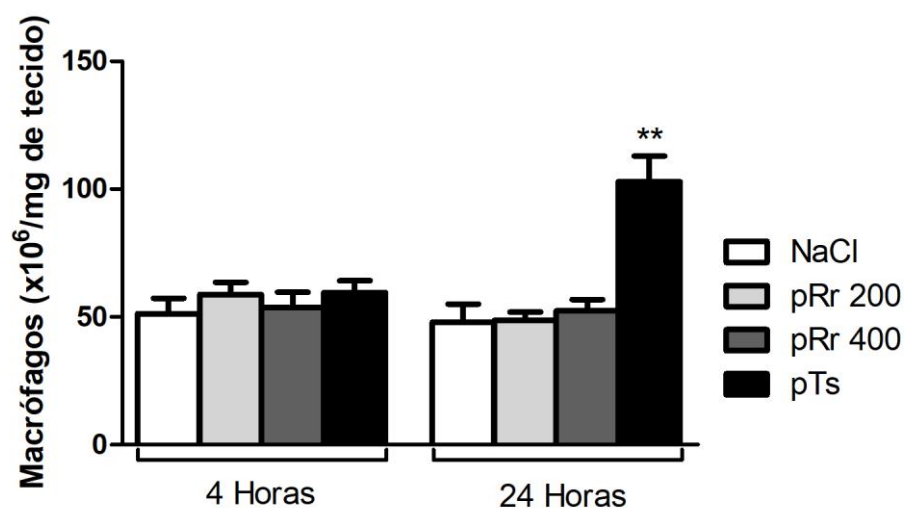
após 4 e 24 horas da administração, enquanto os níveis de NAG encontraram-se aumentados apenas após 24 horas (Figura 8), enquanto os valores das duas enzimas nos animais envenenados com a pRr permaneceram semelhantes ao grupo NaCl, não importando a dose utilizada e o tempo analisado.

Figura 7 – Atividade da MPO em homogenatos pulmonares. 5 a 13 animais por grupo.



** $p < 0,05$ comparado a NaCl e aos grupos pRr.

Figura 8 – Atividade da NAG em homogenatos pulmonares. 5 a 11 animais por grupo.

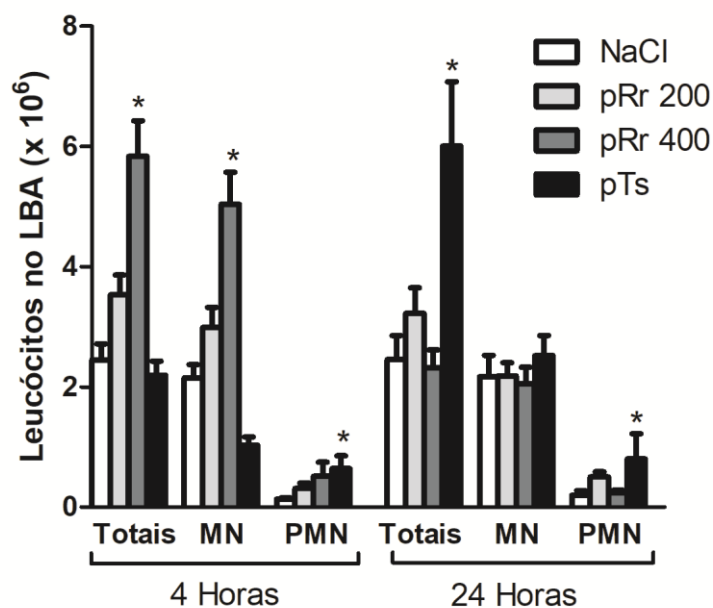


** $p < 0,05$ comparado a NaCl e aos grupos pRr.

O número de leucócitos no LBA, portanto, presentes no lúmen das vias respiratórias, foi afetado pelas peçonhas (Figura 9). Após 4 horas, nota-se o

aumento de leucócitos totais, representado pelo aumento de células mononucleares no grupo pRr 400. No grupo pTs o aumento de polimorfonucleares é evidenciado na 4ª hora, e na 24ª hora em conjunto com leucocitose.

Figura 9 – Leucócitos no LBA. 4 a 16 animais por grupo. PMN: Polimorfonucleares; MN: Mononucleares.

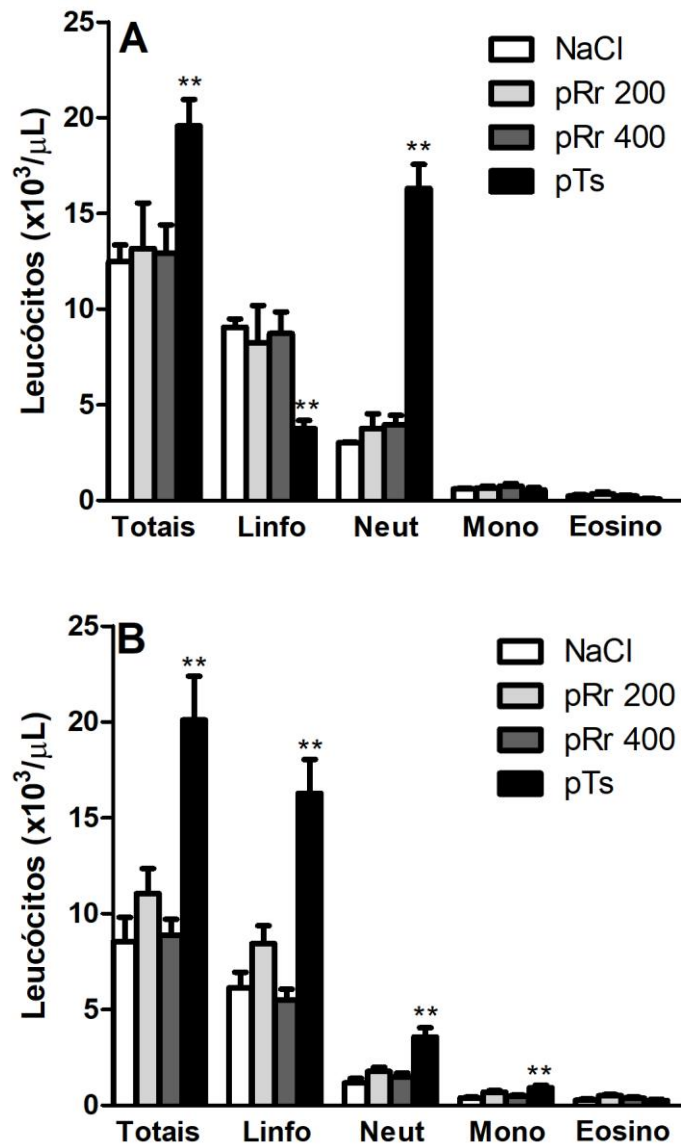


* $p < 0,05$ comparado a NaCl.

4.4 Mobilização de leucócitos para o sangue

Após 4 horas a pTs induziu leucocitose, neutrofilia e linfopenia nos animais envenenados (Figura 10A), encontrando-se adicionalmente linfocitose e monocitose após 24 horas do envenenamento (Figura 10B). Os grupos pRr permaneceram semelhantes ao grupo NaCl em todos os tempos analisados.

Figura 10 – Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos. Após 4 (A) ou 24 (B) horas, 5 a 21 animais por grupo. Linfo: Linfócitos; Neut: Neutrófilos; Mono: Monócitos; Eosino: Eosinófilos.



** p < 0,05 comparado a NaCl e aos grupos pRr.

4.5 Concentração de óxido nítrico no sistema cardiorespiratório

Após 4 e 24 horas da administração das peçonhas as concentrações de NO₂⁻ foi mensurada no tecido cardíaco e pulmonar. No coração de animais que receberam a pRr na dose de 400 μg/kg, houve redução quando comparado ao grupo NaCl e pTs em ambos os tempos analisados (Figura 11A). No pulmão a pTs aumentou a concentração de NO₂⁻ nos tempos avaliados (Figura 11B).

Figura 11 – Concentração de NO_2^- em homogenatos cardíacos e pulmonares. Homogenatos cardíacos (A) e pulmonares (B), 5 a 19 animais por grupo.

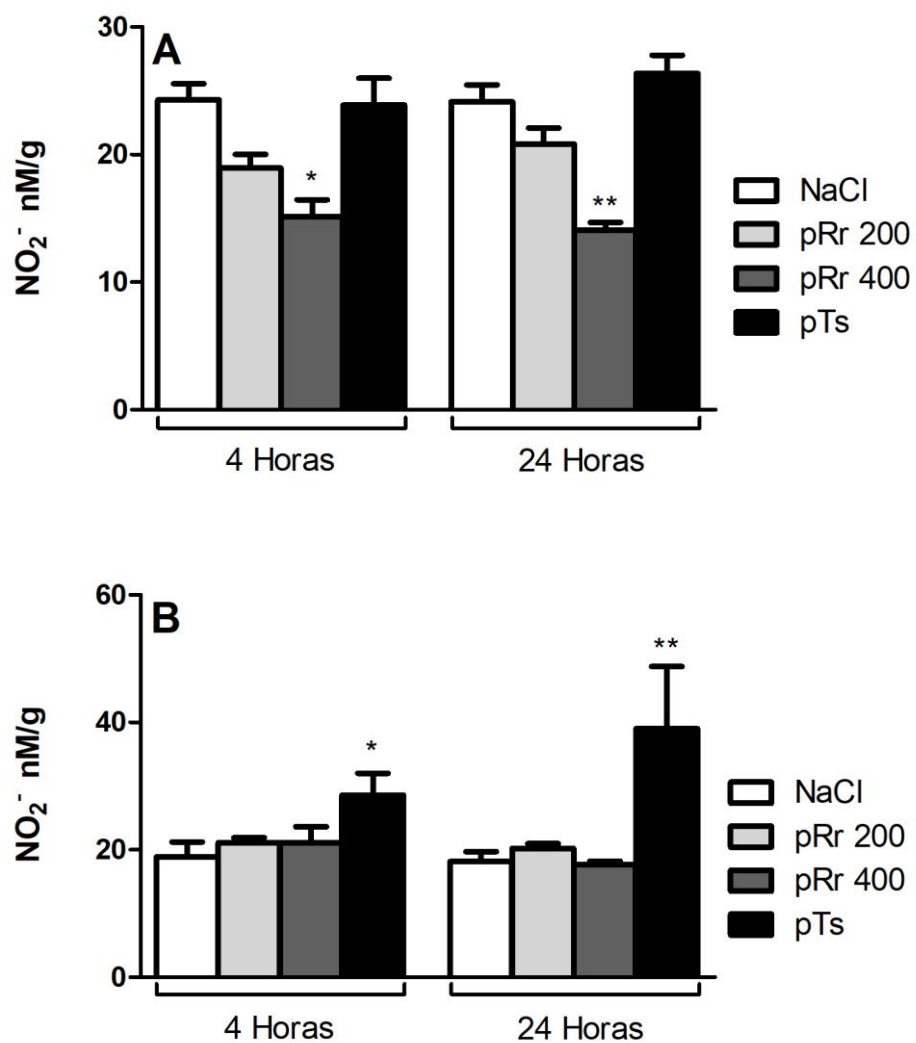


Figura A: * $p < 0,05$ comparada a NaCl e a pTs, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo pRr 200. Figura B: * $p < 0,05$ comparada a NaCl, ** $p < 0,05$ comparado a NaCl e aos grupos pRr.

5 DISCUSSÃO

O escorpionismo é um problema de saúde pública que atinge regiões tropicais e subtropicais, que compreendem grande parte dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. O avanço do conhecimento acerca dos constituintes das peçonhas, com intuito de bioprospecção de compostos ativos em humanos e do desenvolvimento de novos fármacos tem expandido, enquanto a busca pela compreensão dos mecanismos desencadeados pelo escorpionismo para uma abordagem terapêutica adequada e atual deixou de ser o foco após o desenvolvimento das terapias anti-peçonhas.

“As consequências da síndrome do envenenamento têm sido subestimadas, nunca projetada fielmente nas estatísticas de saúde e tratadas utilizando procedimentos obsoletos e na maioria das vezes inefetivos [...] Apesar de novas drogas serem utilizadas no manejo do escorpionismo [...] a seleção foi baseada principalmente em méritos dessas novas drogas, ao invés de compreender profundamente os mecanismos de ação do veneno de escorpião. [...] É óbvio que esforços são necessários para explicar a fisiopatologia da síndrome do envenenamento escorpiônico e os efeitos terapêuticos das drogas utilizadas nos protocolos de tratamento de forma mais atualizada e esclarecida.” (Ismail, 1995)

Devido ao amplo espectro de ação dos componentes das peçonhas escorpiônicas, estas exibem diversas atividades biológicas, produzindo variados sinais e sintomas clínico-laboratoriais, dentre estes, destacam-se aqueles que ameaçam a vida do paciente como o edema pulmonar e a disfunção cardíaca (KHATTABI et al., 2011). Desta forma o estudo buscou evidenciar possíveis alterações, com enfoque no sistema respiratório, desencadeados pela peçonha de *R. rochai*, uma vez que diversos representantes da família Buthidae ao redor do mundo são capazes de desencadear edema pulmonar, como é o caso dos *T. serratalus* (DE MATOS et al., 1997) e *T. bahiensis* (MIYAMOTO et al., 2018) no Brasil, *Androctonus australis* (ADI-BESSALEM; HAMMOUDI-TRIKI; LARABADJEBARI, 2008) e *Leiurus quinquestriatus* (FATANI et al., 2000) na África e Ásia, *Centruroides sculpturatus* na América do Norte (BERTKE; ATKINS, 1964), *Mesobuthus tamulus* na Ásia (PANDEY; DESHPANDE, 2004).

As manifestações clínico-laboratoriais desencadeadas pelo envenenamento podem ser explicadas pela ação das neurotoxinas em terminações nervosas, levando a despolarização das membranas excitáveis e consequente

liberação massiva de neurotransmissores, principalmente noradrenalina e acetilcolina; porém, mediadores não-adrenérgicos e não-colinérgicos poderiam também participar da fisiopatologia do escorpionismo. Dessa forma, foi observado por Tafuri et al. (1974) um decréscimo de vesículas contendo substância P (SP) no plexo de Auerbach de ratos após administração de pTs; não obstante, Matos et al. (1999a) demonstraram que a utilização de antagonistas do receptor NK_1 em conjunto com atropina inibiu completamente as ações contráteis intestinais induzido por pTs.

Semelhantemente, em estudo de Lundberg e Saria (1982), sugere-se que a SP regule o tônus muscular do trato respiratório; Murai et al. (1992) propõe a utilização de antagonistas dos receptores NK, uma vez que a SP é um potente agonista associado com edema de vias aéreas em ratos. Ademais, a utilização de agonistas sintéticos de NK_1 provoca o extravasamento de aE em todos segmentos das vias aéreas, porém esse fenômeno é notavelmente patente na traqueia, brônquios primários e segmentos proximais do que nos segmentos distais intrapulmonares (YIAMOUYIANNIS et al., 1995).

Dessa forma, e sabendo-se que da totalidade de axônios que inervam a traqueia de ratos, 90% são imunorreativos à SP (BALUK; NADEL; MCDONALD, 1992), analisando a capacidade aguda edematogênica das peçonhas, podemos especular se a origem do extravasamento de aE nas vias aéreas possa ser neurogênica, com a participação de neurocininas e seus receptores, especialmente nos animais envenenados com a pRr, nos quais houve aumento da permeabilidade vascular em 30 minutos apenas na traqueia e brônquios externos. Uma possível explicação para os resultados é encontrada em estudos de Ishikawa et al. (1996) e posteriormente Kageyama et al. (1997) que demonstraram o extravasamento de aE induzido por LTD_4 mediado por neurocininas na traqueia e brônquios primários, mas não nos segmentos intrapulmonares. De forma similar, Chaïr-Yousfi; Laraba-Djebari; Hammoudi-Triki (2015), evidenciaram aumento de aE no LBA após 1 hora do envenenamento pela peçonha de *A. australis*, sem aumento de extravasamento nos pulmões, possivelmente devido ao acometimento de outros segmentos respiratórios.

Uma vez que o extravasamento de aE foi similar nas vias respiratórias superiores de animais envenenados com pRr e pTs, é possível que neurocininas também participem do extravasamento desencadeado por pTs; de fato, a utilização de antagonistas de NK_1 no envenenamento por pTs inibe o

extravasamento de aE no parênquima pulmonar (MATOS et al., 1999b); porém como demonstrado pelos próprios autores, mediadores inflamatórios também participariam do aumento da permeabilidade vascular. Ainda que a pRr tenha tido atividade edematogênica branda na pata de camundongos (SEVERINO et al., 2009), não poderia ser inferido que o mesmo aconteceria no aparelho respiratório; nesse sentido, a peçonha de *T. obscurus*, tem atividade edematogênica semelhante à pTs na pata de camundongos, porém é incapaz de gerar o mesmo fenômeno no pulmão (DE PAULA SANTOS-DA-SILVA et al., 2017).

Quando analisamos a permeabilidade das vias aéreas tardiamente, o aumento da concentração de proteínas no LBA no grupo pTs as 4 horas progride e amplifica-se até 24 horas, enquanto este evento foi encontrado apenas após 24 horas nos grupos pRr. Considerando que o aumento se torna notável tardiamente, é plausível considerar que a detecção precoce no grupo pTs é possível devido ao acometimento de todos segmentos respiratórios, enquanto no grupo pRr apenas os segmentos proximais são impactados.

Hoje é consenso que o edema pulmonar desencadeado por peçonhas escorpiônicas tenha importante participação da resposta inflamatória. Existem dados que apontam para a participação do PAF no edema pulmonar e de pata desencadeados pela pTs (FREIRE-MAIA; MATOS, 1993; SEVERINO et al., 2009). Nossos dados recentes (MIYAMOTO et al., 2018) mostram que a pTs desencadeia produção de IL-1 β e IL-6 que podem estar envolvidas com o edema pulmonar; no entanto, a peçonha de *T. bahiensis* também induziu edema de vias respiratórias, mas não a produção dessas citocinas. Não podemos, portanto, descartar a participação cardiogênica, ou regulação negativa de canais de sódio e aquaporina, prejudicando o clearance de fluídos pulmonares (MALAQUE et al., 2015). Sendo assim, seria interessante acessar a produção de citocinas e/ou outros mediadores inflamatórios no pulmão de ratos envenenados pela pRr mesmo na ausência de edema nas vias respiratórias inferiores.

A hemorragia foi constatada exclusivamente em brônquios internos e pulmões após administração de pTs; de fato, hemorragia perivascular pulmonar e secreções hemorrágicas foram identificadas em paciente que foi a óbito após acidente com *T. serrulatus* (AMARAL et al., 1994). Experimentalmente, a peçonha ou toxinas de *T. serrulatus* (CORRÊA et al., 1997; FREIRE-MAIA et al., 1978) e peçonha de outros *Tityus*, como *Tityus confluens* (DE ROODT et al., 2009), *T.*

obscurus (DE PAULA SANTOS-DA-SILVA et al., 2017) e *Tityus trivitattus* (DE ROODT et al., 2001) em roedores provoca lesões hemorrágicas no sistema respiratório, porém todos estudos basearam-se em observações macroscópicas ou abordagem histopatológica, não sendo avaliada ou mensurada. A mensuração da hemorragia das vias aéreas foi avaliada, pela primeira vez por nosso grupo, permitindo análise comparativa da capacidade hemorrágica das peçonhas de diferentes escorpiões, revelando a capacidade hemorrágica em diferentes segmentos das vias respiratórias, das peçonhas de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* (MIYAMOTO et al., 2018).

O edema hemorrágico, produzido pela peçonha e toxinas purificadas, poderia ser decorrente de alterações hemodinâmicas geradas pela liberação massiva de catecolaminas pelo sistema simpático-adrenal e consequente injúria aguda pulmonar, culminando no aumento da permeabilidade capilar-vascular e consequente extravasamento de constituintes sanguíneos (AMARAL et al., 1994; FREIRE-MAIA et al., 1978). Porém, devemos considerar a atividade hemorrágica direta, devido a presença de metaloproteinases na pTs (ALVARENGA et al., 2012) e na peçonha de *T. bahiensis*, que assemelham-se estruturalmente as metaloproteinases presentes na peçonha de serpentes, envolvidas no quadro hemorrágico gerado por esses animais (DE OLIVEIRA et al., 2015). Adicionalmente, Venancio et al. (2013) sugerem que a atividade proteolítica das peçonhas de *T. serrulatus*, *T. stigmurus* e *T. bahiensis* sobre colágeno e laminina, constituintes da membrana basal endotelial e epitelial, contribuiriam para a degradação dos componentes da matriz extracelular e difusão da peçonha. Dessa forma, como constatado por Díaz-García et al. (2015), o baixo potencial tóxico da peçonha de *Rhopalurus junceus* se deve a baixa atividade enzimática; possivelmente a pRr também careceria de atividade proteolítica e hemorrágica.

O aumento da mobilização de leucócitos para a corrente sanguínea, aumento da permeabilidade alveolocapilar e consequente infiltrado celular são manifestações características em envenenamentos severos humanos, relacionados com a resposta inflamatória sistêmica (AMARAL et al., 1994; BUCARETCHI et al., 1995; BUCARETCHI et al., 2014). Experimentalmente foi demonstrado que a capacidade da peçonha de *T. serrulatus* na mobilização de leucócitos da medula óssea, após 3 horas, para a corrente sanguínea se dá por um mecanismo dependente de PAF, e a leucocitose pode ser explicada pela neutrofilia (BORGES et

al., 2000); do mesmo modo, a neutrofilia é presente após administração da peçonha de *T. bahiensis* após 4 e 24 horas (MIYAMOTO et al, 2018). Semelhantemente, a utilização da peçonha de *A. australis* leva ao aumento da densidade celular no sangue periférico, predominantemente representadas por monócitos e neutrófilos após 4 horas (ADI-BESSALEM; HAMMOUDI-TRIKI; LARABA-DJEBARI, 2008).

Deste modo, mediadores inflamatórios como PAF, IL-1 β e IL-6 poderiam desempenhar função central no recrutamento de leucócitos para a corrente sanguínea dos animais envenenados pela pTs, refletido pela leucocitose, oriunda de neutrofilia (4 horas) e linfocitose, neutrofilia e monocitose (24 horas). Contrariamente, a linfopenia pode ser notada após 4 horas, fenômeno também observável no envenenamento por *A. australis* e *Hadruroides lunatus* (ADI-BESSALEM; HAMMOUDI-TRIKI; LARABA-DJEBARI, 2008; COSTAL-OLIVEIRA, 2015) e correlacionado com pior prognóstico (ABOUMAÂD et al., 2014). Por sua vez, a pRr não alterou a quantidade de leucócitos presentes no sangue, seja em números absolutos ou relativos, sugerindo incapacidade da gerar resposta inflamatória sistêmica e recrutamento celular da medula óssea para o sangue periférico.

Como demonstrado por Zoccal et al. (2016) em camundongos a pTs induz as células residentes pulmonares a produzirem IL-1 β via ativação do inflamassoma NLRP3, e a sinalização via IL-1 β /IL-1R tem grande importância na permeabilidade vascular, formação de edema e recrutamento de neutrófilos para o pulmão, sendo responsável pela mortalidade induzida por pTs. No envenenamento em ratos, como descrito por nosso grupo (MIYAMOTO et al., 2018), citocinas produzidas no ambiente pulmonar (IL-1 β e IL-6), poderiam contribuir para o desenvolvimento do quadro severo, uma vez que ambas são capazes de provocar ativação endotelial e aumento da permeabilidade, edema e migração de neutrófilos para as vias aéreas de ratos. Da mesma forma, Saidi et al. (2018) ressaltam a contribuição de macrófagos alveolares na resposta inflamatória sistêmica, infiltrado celular e edema pulmonar no escorpionismo induzido pela peçonha de *A. australis*.

Ademais a IL-6 poderia contribuir para o recrutamento de neutrófilos da medula óssea e a IL-1 β conhecidamente com sua função de ativação endotelial, como expressão de integrinas, contribuiriam para a migração dessas células para as vias respiratórias. Assim, o aumento de neutrófilos circulantes, ativação e reorganização do citoesqueleto (diminuição da capacidade deformativa) e expressão de CD11/CD18, bem como a ativação endotelial (expressão de ICAM-1), e

possivelmente hipotensão mediada por NO produzido células residentes pulmonares, poderiam contribuir para o sequestro de neutrófilos nos capilares, levando a inflamação pulmonar, colaborando para a mortalidade (ABDOON; FATANI, 2009; AHMED et al., 2015; DOERSCHUK, 1992; WIZEMANN et al., 1994; WORTHEN et al., 1989).

Por conseguinte, o aumento da quantidade de células mononucleares e polimorfonucleares para o parênquima pulmonar pode ser notada após 15 minutos (COELHO et al., 2007), e o acúmulo de neutrófilos (atividade da mieloperoxidase) verificado após 2 horas da administração da pTs (PANEQUE PERES et al., 2009), fenômeno também observado após 3 horas da administração da peçonha de *A. australis* e *Androctonus amoreuxi* (SAIDI et al., 2013), sendo relacionado com aumento da permeabilidade vascular e inflamação perivascular pulmonar.

Esses dados são condizentes com os encontrados no presente estudo quando considerado os valores da atividade da MPO (aumentada em 4 e 24 horas) e celularidade no LBA (aumento de PMN em 4 horas, leucocitose e aumento de PMN em 24 horas) no grupo pTs; porém, a migração de células mononucleares (averiguada indiretamente pela atividade da NAG) para os pulmões, só foi verificada após 24 horas. A cinética de monócitos já é bem estabelecida, seu recrutamento para o sítio de infecção se perpetua por dias após o término do recrutamento de neutrófilos, talvez por isso, apenas após 24 horas os valores de NAG encontraram-se aumentados. Como descrito por Brieland; Kunkel; Fantone, (1987), após indução de injúria aguda pulmonar, o número máximo de macrófagos alveolares se dá após 24 horas, possivelmente pelo influxo de macrófagos derivados de monócitos para o parênquima; da mesma forma, a produção de NAG e superóxido no LBA tem seu pico após 12 e 24 horas respectivamente, contribuindo para gênese da injúria.

Contrariamente ao grupo pTs, os valores de MPO e NAG dos grupos pRr permaneceram semelhantes ao grupo NaCl, enquanto a celularidade no LBA no grupo pRr 400 em 4 horas exibe um aumento do número de leucócitos, representado pelo aumento de células mononucleares. Dados ainda não publicados mostram que, no entanto, na pata de camundongos a pRr induziu aumento da atividade de MPO e NAG igualmente a pTs. Interessantemente, De Roodt et al. (2009) demonstraram edema brando com infiltrado intra-alveolar caracteristicamente mononuclear induzido por *T. confluens*. Da mesma forma, verificou-se infiltrado

mononuclear caracterizado por linfócitos e monócitos após 4 horas no LBA utilizando frações tóxicas da peçonha de *A. australis* (CHAÏR-YOUSFI; LARABA-DJEBARI; HAMMOUDI-TRIKI, 2015); o fenômeno, do mesmo modo, cessou após 24 horas após o envenenamento (MEDJADBA; MARTIN-EAUCCLAIRE; LARABA-DJEBARI, 2016).

A produção de NO é uma característica de fagócitos como monócitos, macrófagos e neutrófilos por apresentar a expressão de iNOS regulada por citocinas após estímulos inflamatórios, gerando grandes quantidades desse mediador (BOGDAN, 2001). As altas concentrações séricas desse mediador encontradas em pacientes e em animais experimentais podem estar relacionadas aos distúrbios de microcirculação e hipoperfusão generalizada (falência circulatória/choque), uma vez que os efeitos hipotensivos no choque endotóxico pela produção de TNF e PAF são mediados pelo NO; e a utilização de inibidores de sua síntese revertem a resposta hipotensiva, enquanto L-arginina a restaura (KILBOURN et al., 1990a, 1990b).

No escorpionismo humano o NO é correlacionado positivamente com a severidade do envenenamento e seu aumento pode ser atribuído a ativação da iNOS secundariamente à liberação de citocinas, especialmente IL-1 β e IL-6, em células endoteliais; além da estimulação das isoformas constitutivas da NOS, pela liberação de acetilcolina e bradicinina, contribuindo com os altos níveis encontrados em casos severos hipotensivos (AHMED et al., 2015; EL-DEEK et al., 2017; MEKI; EL-DEAN, 1998). Além dos níveis séricos, níveis aumentados de NO podem ser verificados também no parênquima pulmonar, utilizando a peçonha de *A. australis* ou suas frações tóxicas (MEDJADBA; MARTIN-EAUCCLAIRE; LARABA-DJEBARI, 2015; RAOURAOUA-BOUKARI et al., 2012), possivelmente pela estimulação de macrófagos alveolares pelos componentes da peçonha (SAIDI et al., 2018), contribuindo para a instalação do edema e injúria mediada por estresse oxidativo.

A produção de NO por macrófagos murinos estimulados pela pTs, bem como nível aumentado de NO no plasma no escorpionismo experimental em camundongos foi demonstrada por Petricevich (2002) e Petricevich; Peña (2002) respectivamente. Embora ainda desconhecido, é possível que macrófagos pulmonares sejam ativados pela pTs e produzam NO, o que foi detectado nos homogenatos do tecido na 4^a e 24^a hora; por sua vez, a pRr foi incapaz de induzir sua produção nos pulmões. O NO pode estimular o aumento da permeabilidade

vascular das vias respiratórias no pulmão de ratos (LÁSZLÓ et al., 1995), e a inibição seletiva da iNOS previne o aumento do fluxo transvascular pulmonar (ARKOVITZ et al., 1996); por isso, especulamos que sua produção pulmonar desencadeada pela pTs possa participar do edema pulmonar, como igualmente destacado por Medjadba; Martin-Eauclaire; Laraba-Djebari (2016), no envenenamento por *A. australis*. Ainda que tenhamos demonstrado que a pRr induziu o aumento da concentração de proteínas no LBA, esta ocorreu apenas na 24ª hora e foi muito inferior ao desencadeado pela pTs, talvez parte dessa inabilidade possa ser explicada pela ausência da produção de NO.

Diversas interações entre sistema vascular (células endoteliais cardíacas, coronárias), células contráteis (cardiomiócitos) e células neurais intrínsecas (plexos ganglionares cardíacos) e extrínsecas (sistema nervoso autônomo e nervos sensoriais aferentes) controlam de forma complexa o sistema cardíaco. O NO atua controlando funções miocárdicas de forma benéfica ou maléfica, dependendo da sua fonte celular e enzimática e quantidade. Sua deficiência poderia claramente ter efeitos deletérios, como comprometimento circulatório provocado por disfunção ventricular esquerda (revisado por SHAH; MACCARTHY, 2000); complementarmente, a redução de sua biodisponibilidade por desacoplamento da atividade e expressão da NOS ou atividade da arginase tem sido relacionada com disfunção endotelial e conseqüentemente doenças cardiovasculares como aterosclerose e hipertensão (BERKOWITZ et al., 2003).

A cardiomiopatia desencadeada pelo escorpionismo apresenta propriedades bioquímicas características do infarto e disfunção miocárdica, e eletrocardiográficas características de isquemia miocárdica transitória (CUPO, 2015); possivelmente devido a superestimulação por catecolaminas, causando espasmos microvasculares coronários e comprometendo a perfusão miocárdica culminando na disfunção ventricular esquerda (CUPO et al., 2007). Apesar da concentração de NO apresentar-se aumentado em modelos de infarto agudo do miocárdio por isquemia (LECOUR et al., 2001), a pTs não teve efeito sobre a produção de NO no coração, enquanto a pRr 400 promoveu queda abaixo do nível obtido nos animais controle. A diminuição dos níveis de NO poderia estar relacionada ao aumento da atividade da arginase e conseqüente desacoplamento da eNOS em células endoteliais decorrente de altas concentrações de L-arginina (SCALERA et al., 2009; SOCHA; ROMERO; CALDWELL, 2006) e glicose (ROMERO et al., 2008) visto que as

peçonhas escorpiônicas são fontes ricas em peptídeos e aminoácidos livres, e hiperglicemia é um achado comum no envenenamento; ou ainda relacionado com a produção de TGF- β , um potente inibidor da produção de NO, causando inibição da produção desse mediador em cardiomiócitos (MALVEZI et al., 2014).

Dessa forma, a peçonha de *T. serrulatus* diretamente e/ou indiretamente, por ativação de células, produção de mediadores secundários, ou ainda pela migração e secreção de produtos efetores secundários a ativação de leucócitos (D'SUZE et al., 2007), poderia contribuir para o rompimento da homeostase vascular-endotelial, representado pelo aumento de permeabilidade vascular (aE e proteínas), hemorragia, e migração de células para o parênquima pulmonar e espaço alveolar, levando ao inundamento alveolar e redução da complacência pulmonar, prejudicando a produção e função do surfactante (WARE; MATTHAY, 2000).

Finalmente, considerando que os animais envenenados pela pRr não apresentaram sinais de envenenamento característicos, que as alterações pulmonares avaliadas, relacionadas a óbito, foram afetadas mais intensamente pela pTs e que os pouquíssimos acidentes com *Rhopalurus* apresentaram manifestações leves ou moderadas, podemos considerar a pRr como praticamente incapaz de ocasionar acidentes graves. Essa conclusão corrobora os achados obtidos por Ortiz (1985) e Nishikawa et al. (1994) e que, embora trabalhando com peçonhas de diferentes *Rhopalurus* (*R. laticauda* e *R. agamemnon*) demonstraram que as DL₅₀ dessas peçonhas são elevadas (30 mg/kg e 36,363 mg/kg respectivamente).

6 CONCLUSÃO

A peçonha dos *T. serrulatus* desencadeou lesão pulmonar aguda e inflamação sistêmica, além da produção de NO nos pulmões, indicando a participação de células residentes na fisiopatologia do escorpionismo, corroborando com os dados com os dados clínicos e experimentais acerca desta.

A peçonha dos *R. rochai* apesar de não inócua em ratos, provavelmente não induzirá acidentes potencialmente graves, podendo o tratamento ser focado na sintomatologia do paciente, possivelmente no controle da dor, a manifestação mais comum nos acidentes com escorpiões.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HALEEM, A.-H. A. et al. Serum levels of IL-6 and its soluble receptor, TNF- α and chemokine RANTES in scorpion envenomed children: Their relation to scorpion envenomation outcome. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 47, n. 4, p. 437–444, mar. 2006.
- ABDOON, N. A.; FATANI, A. J. Correlation between blood pressure, cytokines and nitric oxide conscious rabbits injected with *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* scorpion venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n. 4, p. 471-80, 2009.
- ABOUMAÂD, B.; LAHSSAINI M.; TIGER, A.; BENHASSAIN, S. M. Clinical comparison of scorpion envenomation by *Androctonus mauritanicus* and *Buthus occitanus* in children. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 90, p. 337-43, 2014.
- ABROUG, F. Et al. Cardiac dysfunction and pulmonary edema following scorpion envenomation. **Chest**, v. 100, n. 4, p. 1057-9, 1991.
- ADI-BESSALEM, S.; HAMMOUDI-TRIKI, D.; LARABA-DJEBARI, F. Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. **Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 60, n. 4–5, p. 373–380, 2008.
- AHMED, A. E. et al. Endocrinological and biochemical changes of scorpionism in children in Upper Egypt. **Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism**, v. 6, n. 5, p. 210-216, 2015.
- AMARAL, C.F.S. et al. Scorpion sting-induced pulmonary oedema: evidence of increased alveolocapillary membrane permeability. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 32, n. 8, p.999-1003, 1994.
- AMARAL, C. F.; DE REZENDE, N. A.; FREIRE-MAIA, L. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. **American Journal of Cardiology**, v. 71, n. 2, p. 242-5, 1993.
- AMITAI, Y. Clinical manifestations and management of scorpion envenomation. **Public Health Reviews**, v. 26, n. 3, p.257-263, 1998.
- ALVARENGA, E. R. et al. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **Open Journal of Genetics**, v. 2, n. 4, p. 210–220, 2012.
- ARKOVITZ, M. S. et al. Selective inhibition of the inducible isoform of nitric oxide synthase prevents pulmonary transvascular during acute endotoxemia. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 31, n. 8, p. 1009-15, 1996.

BAHLOUL, M. et al. Pulmonary edema induced by scorpion venom: evidence of cardiogenic nature. **International Journal of Cardiology**, v. 158, n. 2, p.292-3, 2012.

BAHLOUL, M. et al. Pulmonary edema following scorpion envenomation: mechanisms, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **International Journal of Cardiology**, v. 162, n. 2, p.86-91, 2013.

BALUK, P.; NADEL, J. A.; MCDONALD, D. M. Substance P-immunoreactive sensory axons in the rat respiratory tract: a quantitative study of their distribution and role in neurogenic inflammation. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 319, n. 4, p. 586–98, 22 maio 1992.

BARBOSA, M. G. R. et al. Aspectos epidemiológicos dos acidentes escorpiônicos em Salvador, Bahia, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, p. 155-162, 2003.

BAWASKAR, H.S.; BAWASKAR, P.H. Clinical profile of severe scorpion envenomation in children at rural setting. **Indian Pedriath**, v. 40, n. 11, p.361-367, 1994.

BERGERON, Z.L.; BINGHAM, J.P. Scorpion toxins specific for potassium (K+) channels: a historical overview of peptide bioengineering. **Toxins**, v. 4, p.1082-1119, 2012.

BERKOWITZ, D. E. et al. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. **Circulation**, v. 108, n. 16, p. 2000–6, 21 out. 2003

BERTKE, E. M.; ATKINS, J. H. Effect of *Centruroides sculpturatus* venom upon rat tissue: a histopathologic study. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 2, p. 205-9, 1964.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907–916, 2001.

BORGES, C. M. et al. Scorpion venom-induced neutrophilia is inhibited by a PAF receptor antagonist in the rat. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, n. 4, p. 515–9, 2000.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–670, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with na enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-9, mar. 1982.

BRANDÃO, R. A.; FRANÇOSO, R. D. Accident caused by *Rhopalurus agamemnon* (Koch, 1839) (Scorpiones, Buthidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 342–4, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde, Sistema de Vigilância em Saúde, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Acidentes por animais peçonhentos. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br>>. (Acesso em 19/01/2018).

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de controle de escorpiões. Brasília, DF, 2009.

BRIELAND, J. K.; KUNKEL, R. G.; FANTONE, J. C. Pulmonary alveolar macrophage function during acute inflammatory lung injury. **American Review of Respiratory Disease**, v. 135, n. 6, p. 1300-6, Jun 1987.

BUCARETCHI, F., BARACAT, E. C. E., NOGUEIRA, R. J. N., CHAVEZ, A., ZAMBRONE, F. A. D., FONSECA, M. R. C. C., TOURINHO, F. S., 1995. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São paulo, v. 37, p. 331-336.

BUCARETCHI, F. et al. Clinical consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* scorpion stings in the region of Campinas, southeastern Brazil. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 89, p.17-25, 2014.

CAMPOLINA, D. et al. Escorpionismo. In: ANDRADE FILHO, A., CAMPOLINA, D., DIAS, M.B. (Eds.). **Toxicologia na prática clínica**. Belo Horizonte: Folium, p. 295-319, 2013.

CARVALHO, L. S.; SANTOS, M. P.; DIAS, S. C. Scorpionism in the rural zone of Teresina, State of Piauí: relate of envenomation cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brazil, v. 40, p. 491, 2007.

CHAÏR-YOUSFI, I.; LARABA-DJEBARI, F.; HAMMOUDI-TRIKI, D. *Androctonus australis hector* venom contributes to the interaction between neuropeptides and mast cells in pulmonary hyperresponsiveness. **International immunopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 19-29, 2015.

CHIPPAUX, J. P. Emerging options for the management of scorpion stings. **Drug design, development and therapy**, v. 6, p. 165-173, 2012.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. **Acta tropica**, v.107, n. 2, p. 71-9, 2008.

COELHO, F.M. et al. Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 50, n. 3, p.420-427, 2007.

CORRÊA, M. M. et al. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. **Toxicon: Official journal of the International Society on Toxinology**, v. 35, n. 7, p. 1053–67, jul. 1997.

COSTAL-OLIVEIRA, F. Et al. Serological, biochemical and enzymatic alterations in rodents after experimental envenomation with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 103, p. 129-134, 2015.

CUPO, P. et al. Escorpionismo. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 198-208, 2003.

CUPO, P. et al. Acute left ventricular dysfunction of severe scorpion envenomation is related to myocardial perfusion disturbance. **International Journal of Cardiology**, v. 116, p. 98-106, 2007.

CUPO, P. Clinical update on scorpion envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 642-649, 2015.

CURRY, S.C. et al. Envenomation by the scorpion *Centruroides sculpturatus*. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**. v. 21, n. 4-5, p.417-449, 1984.

D'SUZE, G. et al. Effect of leukocyte inhibitors benzydamine and cyclophosphamide, on lung injury caused by *Tityus discrepans* scorpion venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 50, n. 8, p. 1116–1125, 2007.

DE MATOS, I. M. et al. Lung edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. Comparative biochemistry and physiology. Part C, **Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, v. 118, n. 2, p. 143–8, 1997.

DE OLIVEIRA, U. C. et al. The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 95, p. 52–61, 2015.

DE PAULA SANTOS-DA-SILVA, A. et al. Some pharmacological effects of *Tityus obscurus* venom in rats and mice. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 126, p. 51–58, fev. 2017.

DEHESA-DAVILA, M.; POSSANI, L.D. Scorpionism and serotherapy in Mexico. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 32, n. 9, p.1015-1018, 1994.

DE ROODT, A. R. et al. A study on the experimental envenomation in mice with the venom of *Tityus trivitattus* Kraepelin 1898 (Scorpiones, Buthidae) captured in Argentina. **Journal of natural toxins**, v. 10, n. 2, p. 99–109, maio 2001.

DE ROODT, A. R. et al. A new venomous scorpion responsible for severe envenomation in Argentina: *Tityus confluens*. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 53, n. 1, p. 1–8, jan. 2009.

DESHPANDE, S. B.; AKELLA, A. Non-cardiogenic mechanisms for the pulmonary edema induced by scorpion venom. **International journal of cardiology**, v. 157, n. 3, p. 426-7, 2012

DÍAZ-GARCÍA et al. Enzymatic analysis of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*. **Journal of Venom Research**, v. 6, p. 11-17, 2015

DIEGO-GARCÍA, E.; CALISKAN, F.; TYTGAT, J. The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): Transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2014.

DINIZ, C.R. et al. Effect of scorpion venom from *Tityus serrulatus* (Tityustoxin) on the acetylcholine release and fine structure of the nerve terminals. **Experientia**, v. 30, n. 11, p.1304-1305, 1974.

DOERSCHUK, C. M. The role of CD18-mediated adhesion in neutrophil sequestration induced by infusion of activated plasma in rabbits. **American journal of respiratory cell and mocular biology**, v. 7, n. 2, p. 140-8, 1992.

DOWNEY, G.P. et al. Regulation of neutrophil activation in acute lung injury. **Chest**, v. 116, suppl. 1, p.46S-54S, 1999.

D'SUZE, G. et al. *Tityus discrepans* venom produces a respiratory distress syndrome in rabbits through an indirect mechanism. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 37, n. 1, p.173-180, 1999.

EL-DEEK, S. E. M. et al. Role of some vasoactive mediators in scorpion envenomed children: Possible relation to envenoming outcome. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 127, p. 77–84, 2017.

FATANI, A. J. et al. The effects of lignocaine on actions of the venom from the yellow scorpion "*Leiurus quinquestriatus*" in vivo and in vitro. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 38, n. 12, p. 1787–1801, 2000.

FIALHO, E.M.S. et al. Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 58, n. 6-7, p.480-485, 2011.

FREIRE-MAIA, L. Peripheral effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Journal of Toxicology and Toxin Reviews**, v. 14, p.423-435, 1995.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.A.; AMARAL, C.F.S. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 32, n. 9, p.1009-1014, 1994.

FREIRE-MAIA, L.; MATOS, I.M. Heparin or a PAF antagonist (BN 52021) prevents the acute pulmonary edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 31, n. 9, p.1207-1210, 1993.

FREIRE-MAIA, L. et al. Mechanism of the pulmonary edema induced by intravenous injection of scorpion toxin in the rat. **Agents and Actions**, v. 8, n. 1-2, p. 113-8, 1978.

FUENTES-SILVA, D.; SANTOS-JR, A. P.; OLIVEIRA, J. Envenomation caused by *Rhopalurus amazonicus* Lourenço, 1986 (Scorpiones, Buthidae) in Pará State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 52, 2014.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–6, 27 nov. 1980.

GELLER, D. A; BILLIAR, T. R. Molecular biology of nitric oxide synthases. **Cancer metastasis reviews**, v. 17, n. 1, p. 7–23, 1998.

GOYFFON, M.; VACHON, M.; BROGLION, N. Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 20, n. 1, p.337-344, 1982.

GWEE, M.C.E. et al. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 9, p.795-801, 2002.

HASLETON, P.S.; ROBERTS, P.S. Adult respiratory distress syndrome – an update. **Histopathology**, v. 34, n. 4, p.285-294, 1999.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9265–9, dez. 1987.

ISMAIL, M.; GHAZAL A.; EL-FAKAHANY, E.E. Cardiovascular effects of the venom from the scorpion *Buthus occitanus*, Amoreux. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 18, n. 3, p. 327-37, 1980.

ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 33, n. 7, p. 825–858, 1995.

ISMAIL, M. et al. Cardiovascular and respiratory responses to the venom from the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. **East African Medical Journal**, v. 49, n. 4, p.273-281, 1972.

ISMAIL, M.; FATANI, A. J.; DABEES, T. T. Experimental treatment protocols for scorpion envenomation: a review of common therapies and an effect of kallikrein-

kinin inhibitors. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 30, n. 10, p. 1257-79, 1992.

KAGEYAMA, N. et al. Role of endogenous nitric oxide in airway microvascular leakage induced by inflammatory mediator. **The European Respiratory Journal**, v. 10, n. 1, p. 13-19, 1997.

KHATTABI, A. et al. Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 105, n. 7, p. 364-9, 2011.

KILBOURN, R. G. et al. NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 9, p. 3629–32, maio 1990a.

KILBOURN, R. G. et al. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 172, n. 3, p. 1132–8, 15 nov. 1990b.

KOLLEF, M. H.; SCHUSTER, D.P. The acute respiratory distress syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 1, p.27-37, 1995.

KUEBLER, W. M. Inflammatory pathways and microvascular responses in the lung. **Pharmacological Reports**, v. 57 Suppl, p. 196-205, 2005.

LÁSZLÓ, F. et al. Association of microvascular leakage with induction of nitric oxide synthase: effects of nitric oxide synthase inhibitors in various organs. **European Journal of Pharmacology**, v. 283, n. 1-3, p. 47-53, 1995.

LEABACK, D. H.; WALKER, P. G. Studies on glucosaminidase. 4. The fluorimetric assay of N-acetyl- β -glucosaminidase. **Biochemical Journal**, v. 78, n. 1, p. 151-156, 1961.

LECOUR, S. et al. Levels of nitric oxide in the heart after experimental myocardial ischemia. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 55–63, jan. 2001.

LIRA-DA-SILVA, R. M., de Amorim, A. M., Brazil, T. K. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) no Estado da Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 33, p. 239–245, 2000.

LORET, E.; HAMMOCK, B. Structure and neurotoxicity of venoms. In: BROWNELL, P., POLIS, G. (Eds.). **Scorpion biology and research**. New York: Oxford University Press, p. 204-233, 2001.

LOURENÇO, W. R. The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1, 2018.

LUNDBERG, J. M.; SARIA, A. Bronchial smooth muscle contraction induced by stimulation of capsaicin-sensitive sensory neurons. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 116, n. 4, p. 473–6, dez. 1982.

MAGALHÃES, M. M. et al. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon: Official journal of the International Society on Toxinology**, v. 37, n. 8, p. 1155–1164, 1999.

MALAQUE, C. M. S. et al. The role of dexamethasone in scorpion venom-induced deregulation of sodium and water transport in rat lungs. **Intensive Care Medicine**, v. 3, n. 1, p. 28, 2015.

MALVEZI, A. P. et al. Inhibition of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 Impairs *Trypanosoma cruzi* Entry into Cardiac Cells and Promotes Differential Modulation of the Inflammatory Response. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p.6157-64, 2014.

MATOS, I. M. et al. Pharmacological evidence that neuropeptides mediate part of the actions of scorpion venom on the guinea pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 368, n. 2–3, p. 231–236, 1999a.

MATOS, I. M. et al. Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 376, n. 3, p. 293-300, 1999b.

MATHY-HARTERT, M. et al. Nitrated proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients at risk of ventilator-associated bronchopneumonia. **The European Respiratory Journal**, v. 16, n. 2, p. 296–301, ago. 2000.

MEDJADBA, W.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; LARABA-DJEBARI, F. Involvement of Kallikrein-Kinin System on Cardiopulmonary Alterations and Inflammatory Response Induced by Purified Aah I Toxin from Scorpion Venom. **Inflammation**, v. 39, n.1, p.290-302, 2016.

MEKI, A. R.; MOHEY EL-DEAN, Z. M. Serum interleukin-1beta, interleukin-6, nitric oxide and alpha1-antitrypsin in scorpion envenomed children. **Toxicon: Official journal of the International Society on Toxinology**, v. 36, n. 12, p. 1851–9, dez. 1998.

MILLE, B. G. et al. Transcriptomic approach reveals the molecular diversity of *Hottentotta conspersus* (Buthidae) venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 99, p. 73–79, 2015.

MIYAMOTO, J. G. et al. A comparative study of pathophysiological alterations in scorpionism induced by *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* venoms. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 141, p. 25-33, jan. 2018.

- MORAES, T. J.; ZURAWSKA, J. H.; DOWNEY, G. P. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. **Current Opinion in Hematology**, v. 13, n. 1, p. 21-7, 2006.
- MURAI, M. et al. Effects of the tripeptide substance P antagonist, FR113680, on airway constriction and airway edema induced by neurokinins in guinea-pigs. **European journal of pharmacology**, v. 217, n. 1, p. 23–9, 24 jun. 1992.
- MUSTAFA, A. K.; GADALLA, M. M.; SNYDER, S. H. Signaling by Gasotransmitters. **Science Signaling**, v. 2, n. 68, p. re2-re2, 28 abr. 2009.
- NADERISOORKI, M. et al. First venom gland transcriptomic analysis of Iranian yellow scorpion “*Odonthubuthus doriae*” with some new findings. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 120, p. 69–77, 2016.
- NISHIKAWA, A. K. et al. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 32, n. 8, p. 989–98, ago. 1994.
- NUNAN, E.A. et al. Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Life Sciences**, v. 73, n. 3, p.319-325, 2003.
- ORTIZ, N. Actividad biológica del veneno de escorpión (*Rhopalurus laticauda*) em ratones. Determinación de la dosis letal cincuenta (DL₅₀). Disertación-Grado Médico Cirujano. Universidad de Oriente, Escuela de Medicina, Ciudad Bolívar. 1985.
- PALMER, R. M. K.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. v. 327, p. 524-526, 1987.
- PALMER, R. M. J. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 153, n. 3, p. 1251-6, 1988.
- PANEQUE PERES, A. C. et al. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 53, n. 7–8, p. 779–785, 2009.
- PANDEY, R.; DESHPANDE, S. B. Protective effects of aprotinin on respiratory and cardiac abnormalities induced by *Mesobuthus tamulus* venom in adult rats. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 44, n. 2, p. 201–205, 2004.
- PARDAL, P.P.O. et al. Aspectos epidemiológicos e clínicos do escorpionismo na região de Santarém, Estado do Pará, Brasil. Epidemiological and clinical aspects of scorpion envenomation in the region of Santarém, Pará, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p.349-353, 2003.
- PARDAL, P. P. O. et al. Envenenamento grave pelo escorpião *Tityus obscurus* Gervais, 1843. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 65-70, 2014.

- PESSINI, A.C. et al. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. **International Immunopharmacology**, v. 3 (5), p. 765–774, 2003.
- PETRICEVICH, V. L. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. **Mediators of inflammation**, v. 11, n. 1, p. 23-31, 2002.
- PETRICEVICH, V. L.; PENA, C. F. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 3, p. 173–180, 2002.
- PETRICEVICH, V. L.; LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators of Inflammation**, v. 2005, n. 1, p. 39–49, 2005.
- PORTO, T.J.; BRAZIL T.K.; LIRA-DA-SILVA R.M. Scorpions, state of Bahia, northeastern Brazil. **Journal of Species Lists and Distribution**. v. 6, n. 2, 2010
- PUCCA, M. B. Et al. *Tityus serrulatus* venom – A lethal cocktail. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxicology**, v. 108, p. 272-284, 2015.
- RAHAV, G.; WEISS, A. T. Scorpion sting-induced pulmonary edema. Scintigraphic evidence of cardiac dysfunction. **Chest**, v. 97, n. 6, p. 1478-80, 1990.
- RAOURAOUA-BOUKARI, R. et al. Immunomodulation of the inflammatory response induced by *Androctonus australis Hector* neurotoxins: biomarker interactions. **Neuroimmunomodulation**, v. 19, p. 103-110, 2012.
- RASSLER, B. et al. Catecholamine-induced pulmonary edema and pleural effusion in rats—alpha- and beta-adrenergic effects. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 135, n. 1, p. 25-37, 2003.
- RECKZIEGEL, G.C.; PINTO JR, V.L. Scorpionism in Brazil in the years 2000 to 2012. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, p.46-54, 2014.
- REVELO, M.P. et al. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxicology**, v. 34, n. 10, p.1119-1125, 1996.
- RIBEIRO, A. L.; RODRIGUES, L.; JORGE, M. T. Aspectos clínicos e epidemiológicos do envenenamento por escorpiões em São Paulo e municípios próximos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 30, p. 83-92, 2001.
- ROGERS, L. K.; CISMOWSKI, M. J. Oxidative stress in the lung – The essential paradox. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 37–43, 2018.

ROMERO, M. J. et al. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. **Circulation Research**, v. 102, n. 1, p. 95-102, 2008.

SAIDI, H. et al. Effects of atropine and propranolol on lung inflammation in experimental envenomation: comparison of two buthidae venoms. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. 8, 2013.

SAIDI, H. et al. Involvement of alveolar macrophages and neutrophils in acute lung injury after scorpion envenomation: new pharmacological targets. **Inflammation**, 2018.

SANTANA, G.C. et al. Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the rat. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 34, n. 9, p.1063-1066, 1996.

SANTHOSH, K. N.; PAVANA, D.; THIPPESWAMY, N. B. Impact of scorpion venom as an acute stressor on the neuroendocrine-immunological network. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 122, p. 113–118, 2016.

SCALERA, F. et al. Paradoxical effect of L-arginine: Acceleration of endothelial cell senescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 386, p. 650-655, 2009.

SEVERINO, D.N. et al. Edematogenic activity of scorpion venoms from the Buthidae family and the role of platelet-activating factor and nitric oxide in paw edema induced by *Tityus* venoms. **Inflammation**, v. 32, n. 1, p.57-64, 2009.

SHAH, A. M.; MACCARTHY, P. A. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 86, n. 1, p. 49–86, 2000.

SOCHA, H. M.; ROMERO, M. J.; CALDWELL, R. W. Oral citrulline administration enhances NO-dependent vasodilation. **The FASEB Journal**, v. 20, p. 1125, 2006.

SOFER, S.; GUERON, M. Respiratory failure in children following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus*: hemodynamic and neurological aspects. **Toxicon: Official journal of the International Society on Toxinology**, v. 26, n. 10, p. 931-9, 1988.

SOUZA, C. A. R. et al. On the *Tityus stigmurus* complex (Scorpiones, Buthidae). **Zootaxa** 1987, p. 1-38, 2009.

SUN, J. et al. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v. 3, n. 8, p. 276–284, 2003.

TAFURI, W. L. et al. Effect of the scorpion toxin on the granular vesicles in the Auerbach's plexus of the rat ileum. **Journal of neural transmission**, v. 35, n. 3, p. 233–40, 1974.

TEIXEIRA, A. L. et al. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. **Toxicon: Official journal of the International Society on Toxinology**, v. 39, n. 5, p. 703-9, 2001.

VENANCIO, E. J. et al. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. **Toxicon: Official journal of the International Society on Toxinology**, v. 69, n. January 2007, p. 180–90, jul. 2013.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The Acute Respiratory Distress Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 18, p. 1334–1349, 4 maio 2000.

WIZEMANN, T. M. et al. Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. **Journal of leukocyte biology**, v. 56, n. 6, p. 759-68, 1994.

WORTHEN, G. S. et al. Mechanics of stimulated neutrophils: cell stiffening induces retention in capillaries. **Science (New York, N.Y.)**, v. 245, n. 4914, p. 183-6, 1989.

YIAMOUIYIANNIS, C. A. et al. Pulmonary actions of the neurokinin1-specific agonist [Sar9, Met(O2)11]-substance P. **Neuropeptides**, v. 28, n.1, p.35-42, 1995.

ZHIJIAN, C. et al. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 47, n. 3, p.348-355, 2006.

ZOCCAL, K. F. et al. TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from *Tityus serrulatus* to induce macrophage-derived inflammatory mediators. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88174, 2014.

ZOCCAL, K.F. et al. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nature Communications** v. 7, p.1-13, 2016.

ZULIANI, J.P. et al. *Tityus serrulatus* venom increase vascular permeability in selected airway tissues in a mast cell-independent way. **Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 65, n. 3, p.229-234, 2011.

ANEXOS

ANEXO A

**A comparative study of pathophysiological alterations in scorpionism induced
by *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* venoms.**

Artigo publicado na revista *Toxicon* volume 141, páginas 25-33 em Janeiro de 2018.

Digital Object Identifier: 10.1016/j.toxicon.2017.11.005

ISSN: 0041-0101/Fator de Impacto 1.927/Qualis CAPES B1 (Medicina II 2013-2016)

Title: A comparative study of pathophysiological alterations in scorpionism induced by *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* venoms.

Jackson G. Miyamoto¹; Fabio B. Andrade¹; Camila R. Ferraz¹; Denise M. Cândido²; Irene Knysak²; Émerson J. Venâncio¹; Waldiceu A. Verri Jr¹; Maristella A. Landgraf³; Richardt G. Landgraf⁴; Fábio H. Kwasniewski¹.

¹Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil. ²Laboratório de Artrópodes, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil. ³Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. ⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil.

Corresponding author: Fábio H. Kwasniewski

Address for correspondence:

Departamento de Ciências Patológicas / Centro de Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Rod. Celso Garcia Cid Km 380 PR445, CEP 86057-970

Londrina, Paraná, Brazil

Phone and FAX number: 55-43-3371-4616

e-mail: fhkwas@uol.com.br



A comparative study of pathophysiological alterations in scorpionism induced by *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* venoms

Jackson G. Miyamoto^a, Fabio B. Andrade^a, Camila R. Ferraz^a, Denise M. Cândido^b, Irene Knysak^b, Emerson J. Venancio^a, Waldiceu A. Verri Jr.^a, Maristella A. Landgraf^c, Richardt G. Landgraf^d, Fábio H. Kwasniewski^{a,*}

^a Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

^b Laboratório de Artrópodes, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

^c Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^d Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2017

Received in revised form

31 October 2017

Accepted 18 November 2017

Available online 21 November 2017

Keywords:

Tityus

Scorpion venoms

Airways

Edema

Leukocytes

Cytokines

ABSTRACT

Scorpionism is a relevant public health problem in several countries in tropical and subtropical regions. In Brazil, *Tityus serrulatus* sting can induce acute lung injury in part as a consequence of inflammation. Despite the occurrence of other scorpions of *Tityus* genus in Brazilian scorpiofauna, the knowledge regarding pulmonary alterations is related to *T. serrulatus* venom (Tsv). Here we studied, comparatively, the pathophysiological changes in the rat airways envenomed by Tsv or *T. bahiensis* venom (Tbv), since both scorpions are involved in human accidents but with severe envenomations occurring when victims are stung by *T. serrulatus*. After intravenous injection of the venoms (200 µg/kg), both were able to induce Evans blue extravasation (in 30 min) into airways and increased protein extravasation into lungs at 4 and 24 h, but the magnitude of such events was higher in Tsv group. Hemorrhage (in 60 min) in the lungs was higher in Tbv group, while IL-1β (at 1 h) and IL-6 (at 1 and 4 h) in lung homogenates were detected only in Tsv group. Four and 24 h after envenomation, myeloperoxidase activity in lung was equally augmented in the envenomed groups, as well as an increased in polymorphonuclear cell numbers in bronchoalveolar lavage fluid. At 4 h blood leukogram showed increased leukocyte values with the highest neutrophilia in Tsv group. The numbers of leukocytes and neutrophils remained higher than control at 24 h in Tsv and Tbv groups, and it was accompanied by lympho (envenomed groups) and monocytosis (Tsv group). In conclusion, although Tbv was capable of inducing acute lung injury and blood leukocyte mobilization, most of the evaluated parameters were more affected by the Tsv. These results could help to explain the pathophysiology of the scorpionism and the clinical data arguing toward the greatest severity associated with *T. serrulatus* stings.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Scorpionism is a very important public health problem in several countries in tropical and subtropical regions (Chippaux and Goyffon, 2008). In Brazil, considering the number of cases per year, it is the main cause of accident involving venomous animals (Reckziegel and Pinto, 2014). The scorpions involved in accidents of

medical importance belong to the Buthidae family, which are represented in Brazilian scorpiofauna mainly by animals from *Tityus* genus and depending on the geographic region the species responsible for accidents may be different. *T. serrulatus* has a wide distribution and is involved in the majority of severe cases and fatal outcome especially when the victims are infants (reviewed by Cupo, 2015). Another clinically relevant specie, *T. bahiensis* is responsible for the majority of the scorpion sting in the state of São Paulo (von Eickstedt et al., 1996; Bucaretychi et al., 1995, 2014) the most populous Brazilian's state.

The clinical manifestations in severe envenomation may include pulmonary edema, cardiac and respiratory failure and shock, beyond local pain (a hallmark of scorpion sting) and systemic

* Corresponding author. Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rod. Celso Garcia Cid Km 380 PR445, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brazil.

E-mail address: fhkwas@uol.com.br (F.H. Kwasniewski).

alterations as nausea, vomiting, agitation, tachycardia, hyperglycemia and leukocytosis (reviewed by Cupo, 2015). Moreover, acute lung injury (ALI) with pulmonary edema is reported in fatal cases after *T. serrulatus* sting (Amaral et al., 1994; Bucarety et al., 1995, 2014). Inflammation is involved in the pathophysiology of scorpionism, in humans, IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8 and GM-CSF were found in blood of moderate to severely affected patients stung by scorpions of medical importance around the world (D'Suze et al., 2003; Meki et al., 2003; Abdel-Haleem et al., 2006), including *T. serrulatus* in Brazil (Magalhães et al., 1999; Fukuhara et al., 2003).

Experimental models of scorpionism developed to study the effect of *T. serrulatus* venom have shown inflammation as important feature in the pulmonary pathophysiological changes as edema, leukocyte infiltration, lipid mediators and cytokines production (Freire-Maia and Matos, 1993; Coelho et al., 2007; Zoccal et al., 2016). Besides the unquestionable importance of clinical and experimental data obtained with *T. serrulatus* venom, the knowledge about the effects of other venoms of scorpions of medical importance from Buthidae family found in Brazilian fauna and involved in the scorpionism, as *T. bahiensis*, is scarce. However, Nishikawa et al. (1994) grouped *T. serrulatus* and *T. bahiensis* venoms (Tsv and Tbv respectively) as highly toxic for mouse, with a high cross-reactivity based on the reaction with antiserum to *T. serrulatus*. Investigating mouse paw edema induced by Buthidae scorpions in Brazilian fauna, Severino et al. (2009) found a similar effect of Tsv and Tbv, but with different modulation by inflammatory mediators.

Therefore, considering the knowledge about Tsv-induced inflammation and the relative lack of these studies with Tbv, the present work aimed to study, comparatively, the pathophysiological aspects of ALI in a rat model of moderate to severe scorpionism triggered by Tsv and Tbv, focusing on vascular permeability, hemorrhage, IL-1 β and IL-6 content and leukocyte mobilization. Our work may provide a better understanding of the pathophysiology of the ALI induced by scorpion venoms, and since ALI is present in fatal cases of scorpionism, the results may give clues to explain why the severest clinical alterations with pulmonary involvement are seen in the victims stung by *T. serrulatus* when compared to *T. bahiensis* (Bucarety et al., 1995, 2014).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (200–250 g, 40 to 60 days old) obtained from the Central Bioterium from the Center of Biological Sciences, were housed at 22 ± 2 °C on a 12 h light/dark cycle, with food and water available *ad libitum*. The animal care and research protocols were in accordance with the principles and guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) with the approval of the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina (CEUA N° 16583.2013.29).

2.2. Venom and envenomation

Tityus serrulatus and *Tityus bahiensis* lyophilized crude venom (Tsv and Tbv respectively) supplied by Instituto Butantan (São Paulo, Brazil) were kept at -20 °C. To reproduce severe envenomation, the venoms diluted in sterile and apyrogenic isotonic saline were injected in rats (200 μ g/kg) by intravenous (i.v.) route into the tail vein. These dose and route was used in a previous study evaluating airways edema induced by Tsv (Zuliani et al., 2013). Control groups received sterile and apyrogenic isotonic saline only (Equiplex Pharmaceutical Industry, Aparecida de Goiânia-GO, Brazil; Reg. M.S: 1.1772.0001.009–3, Lot number 1630979). According to

the experimental procedure, animals were killed by CO₂ inhalation after 30 min, 1 h, 4 h or 24 h, exsanguinated and tissues were collected for further analysis.

2.3. Evaluation of vascular permeability and hemorrhage in airways

Increase in vascular permeability of airways was assessed using Evans blue (EB) dye extravasation method modified by Sirois et al. (1988). EB (Inlab, Brazil) was diluted in isotonic saline and injected (20 mg/kg) in conscious rats by intravenous (i.v.) route into the tail vein together with Tsv or Tbv or an equal volume of sterile and apyrogenic isotonic saline (control group). Thirty minutes later, the animals were killed and lung circulation was perfused with isotonic saline (50 mL, 25 mL/min) via a cannula inserted in the pulmonary artery, removing the intravascular dye. Trachea, upper and inner bronchi, and lungs were dissected and rinsed in isotonic saline, divided in two parts and weighed: one part was placed in formamide (4 mL/g) (Sigma Chemical Co., USA) to extract the dye, and the other part was left to dry at 60 °C for at least 48 h. The EB dye concentration in formamide was measured using a microplate spectrophotometer reader (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finland) at 620 nm and the optical density obtained was compared to EB dye standard curve. Values of dye extravasation in the tissues were expressed as micrograms of dye per gram of dry tissue.

To evaluate hemorrhage, hemoglobin was assessed in the tissue by a colorimetric assay based on the conversion of hemoglobin to cyanometahemoglobin using Drabkin's solution. One hour after envenomation the same procedure to obtain the airways segments as described above was performed and each segment was weighed and incubated with Drabkin solution (8 mL/g tissue; Sigma Chemical Co., USA). After 24 h tissues were removed and the solution centrifuged for 5 min at 16,100 g (Eppendorf 5415R, Eppendorf AG, Germany). The concentration of hemoglobin in the supernatant solution was measured in a microplate spectrophotometer reader at 540 nm. The optical density obtained was compared to a rat hemoglobin (Sigma Chemical Co., USA) standard curve, and the values of hemoglobin in the tissues were expressed as mg of hemoglobin/g wet weight of tissue.

2.4. Evaluation of protein content in the airways

The protein content in the airways was analyzed in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). After 4 or 24 h of envenomation the rats were killed, exsanguinated and the airways circulation was washed as described above. A cannula was inserted into the trachea, and BALF was done with 5 mL of isotonic saline and centrifuged at 156 g for 10 min at 4 °C. Supernatant was collected and protein content was determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

2.5. Total and differential count of blood and BALF leukocytes

After 4 or 24 h of envenomation the rats were killed, exsanguinated and the airways circulation was washed as described above. A 20 μ L of blood was diluted in Turk solution (1/20) and total leukocytes were determined by counting in a Neubauer chamber under light microscopy at 400 \times magnification. Blood smears were prepared and stained with the Instant-Prov kit (Newprov, Brazil) and examined under a light microscopy at 1000 \times magnification and the percentage of leukocyte subpopulations was calculated. For BALF cell determination, the bronchoalveolar lavage was performed with 10 mL of isotonic saline administered by a cannula inserted into the trachea. After, the lavage was centrifuged at 156 g

for 10 min at 4 °C (Centurion Scientific K241R, Centurion Scientific Ltd., UK) and the pellet was suspended in 1 mL of isotonic saline. Blood total count was performed as described above. Differential leukocyte counts were determined using the cytopspin system (Excelsa Flex 3400, Fanen, Brazil) at 100 g for 4 min, fixed, and stained with the Instant-Prov kit. After the identification of 200 cells under light microscopy at 1000× magnification, the percentage of mononuclear and polymorphonuclear cells was calculated.

2.6. Activity of myeloperoxidase (MPO)

Activity of MPO was used as index of neutrophil in the tissue as previously described by Goldblum et al. (1985), with modifications. Four and 24 h after the envenomation the animals were killed and lungs collected as described in the section of evaluation of vascular permeability and hemorrhage. The whole lungs were homogenized using a tissue tearor (Ultra-turrax, Ika T18, Germany) in ice-cold K₂HPO₄ buffer (50 mM, pH 6.0, 2 mL/g tissue) containing HTAB (0.5% weight/volume). The homogenized samples were sonicated (5 × 10 s at 40 Hz, Vibra Cell, Sonics & Materials INC., Connecticut, USA) and then centrifuged at 16,100 g for 2 min at 4 °C. Both assays were done in a 96-well plate and read with microplate spectrophotometer reader. To determine MPO activity, a 10 µL of the supernatants were mixed with 200 µL K₂HPO₄ buffer (50 mM, pH 6.0) containing *o*-dianisidine dihydrochloride (0.0167%, w/v) and hydrogen peroxide (0.015%, v/v). The absorbance was determined after 5 min at 450 nm and the MPO activity was expressed as the number of neutrophils per mg of tissue by using a standard curve of neutrophils.

2.7. Cytokine assay

Milliplex assay kits (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) were used to measure interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in the lung samples. The kits were used according to the manufacturer's instructions. The assays were read on the Bio-Plex suspension array system; the data were analyzed using Milliplex Analyst software version 5.1 (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Standard curves ranged from 1.95 to 32,000 pg/mL. The total protein in lung tissue samples was measured, and the results are indicated as pg of specific molecule/µg of total protein.

2.8. Statistical analysis

The obtained data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tuckey's post-hoc, or Kruskal-Wallis and Dunn's post-hoc, for parametric and non-parametric data respectively; *p* values lower than 5% were considered significant. All analysis was performed in the GraphPad Prism (5.0) software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Results were expressed as mean ± standard error of means (SEM).

3. Results

3.1. Tityus venoms induced increase in vascular permeability in rat airways

Our results show a significant EB dye extravasation in all airway segments (trachea, upper bronchi, inner bronchi, and lungs) 30 min after the injection of Tsv compared to control. Vascular permeability was also increased in upper bronchi, inner bronchi, and lungs of rats envenomed by Tbv. Our data also shows that values in Tsv envenomed rats were higher than their correlates in Tbv group

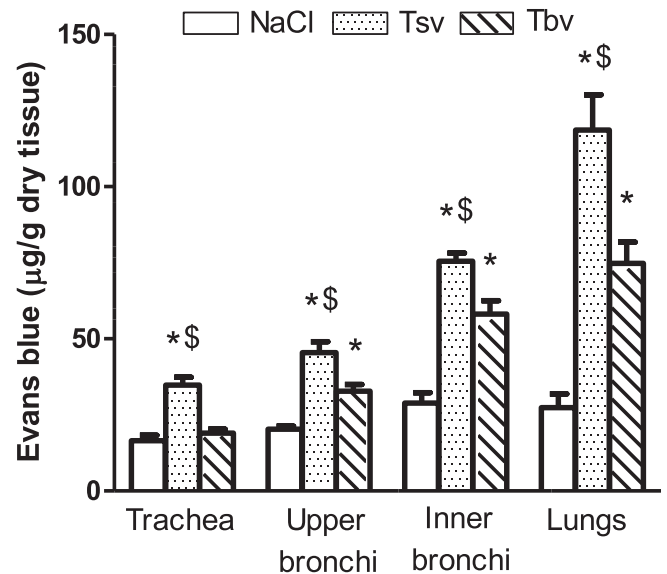


Fig. 1. Vascular permeability in the airways of envenomed rats. Evans blue dye was injected (i.v.) together with apyrogenic sterile isotonic saline (NaCl), *T. serrulatus* venom (Tsv) or *T. bahiensis* venom (Tbv). Thirty minutes later the animals were killed, airways were dissected and Evans blue dye concentration in formamide was measured spectrophotometrically at 630 nm. Data represent the mean ± SEM of dye concentration (9–12 animals per group). **P* < 0.05 compared to NaCl. ^{\$}*P* < 0.05 compared to Tbv.

(Fig. 1). Protein content in BALF, measured as indicative of airways edema, increased after 4 and 24 h after envenomation compared to control group. Besides, higher protein concentration was found in the BALF of rats envenomed by Tsv (Fig. 2).

3.2. Tityus venoms induced hemorrhage in rat airways

Hemoglobin levels in trachea and upper bronchi of envenomed rats did not differ from control group, in contrast to higher hemoglobin content found in inner bronchi and lungs. In the lungs, Tbv triggered hemorrhage with higher intensity compared to Tsv group (Fig. 3).

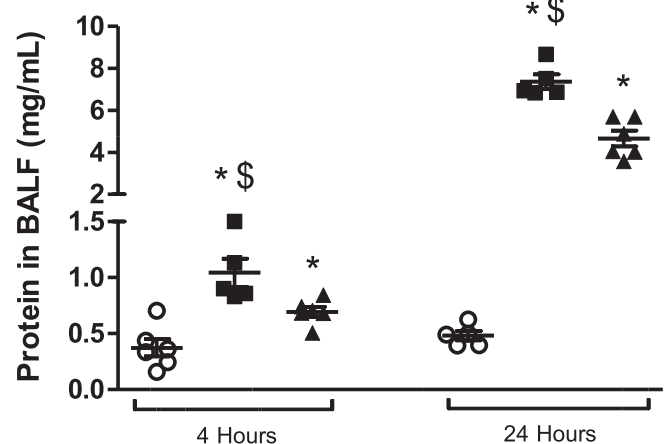


Fig. 2. Protein in BALF of envenomed rats. Rats were injected (i.v.) with apyrogenic sterile NaCl 0.9% (open circles), Tsv (closed squares) or Tbv (closed triangles). BALF was collected in the indicated times and the protein concentration was evaluated using Bradford analysis. The results are expressed as the mean ± SEM of 5–6 animals per group. **P* < 0.05 when compared to NaCl group; ^{\$}*P* < 0.05 compared to Tbv group.

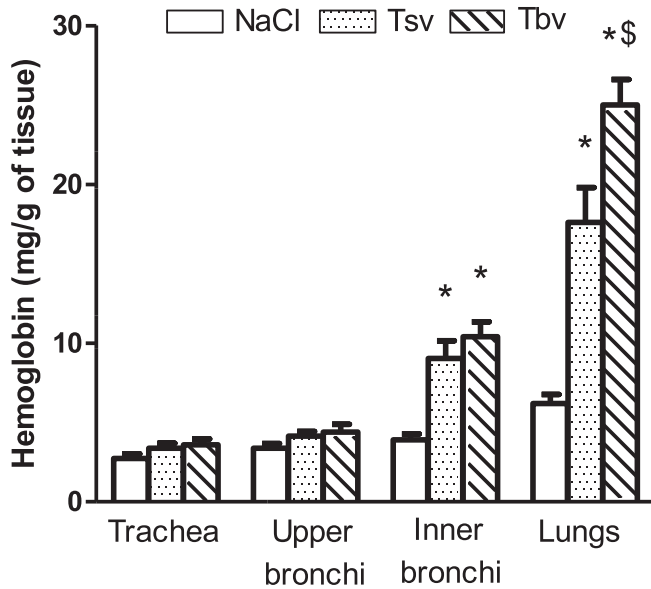


Fig. 3. Hemorrhagic lesions in the airways of envenomed rats. Groups of rats received (i.v.) apyrogenic and sterile isotonic saline (NaCl), *T. serrulatus* venom (Tsv) or *T. bahiensis* venom (Tbv); 1 h after the rats were killed, airways were collected and the cyanomethemoglobin concentration in Drabkin's solution was measured spectrophotometrically at 540 nm. Data represent the mean \pm SEM of hemoglobin concentration (10–13 animals per group). * $P < 0.05$ compared to NaCl. \$ $P < 0.05$ compared to Tsv.

3.3. IL-1 β and IL-6 were produced only in the lungs of Tsv envenomed rats

Following 1 h after the envenomation by Tsv the concentration of IL-1 β in the lungs was increased compared to control group; at 4 h there was no IL-1 β production. IL-6 concentration was increased in the lungs of Tsv envenomed rats at both 1 and 4 h. No difference was found in the cytokine content in the lungs of Tbv envenomed rats compared to the control group. No alterations in TNF- α levels were found (Fig. 4).

3.4. Tityus venoms induced leukocyte mobilization to lungs

The MPO activity was used as an indirect marker of neutrophils presence in the lungs. Tsv and Tbv similarly increased MPO activity compared to control group after 4 and 24 h of envenomation (Fig. 5). We also setted out experiments to explore the number of leukocytes reaching the lumen of the airways; to achieve such objective the bronchoalveolar lavage was performed (Fig. 6). Regarding to the venom used and time analyzed after the envenomation (4 or 24 h), both Tsv and Tbv induced PMN cells accumulation (almost 100% of neutrophils); moreover, at 24 h increased numbers of leukocytes were found in envenomed rats.

3.5. Tityus venoms induced leukocyte mobilization to blood

T. serrulatus venom increased the total leukocytes number after 4 h, a common finding in envenomed groups was lymphopenia and neutrophilia, and this was higher in Tsv group. Twenty four hours after the envenomation, although the number of total leukocytes was augmented in both envenomed groups, it was higher Tsv group (Fig. 7). This difference towards a high number of cells in Tsv group was also observed in lymphocytosis at 24 h of envenomation; Tsv also caused monocytosis. Neutrophilia was also present at 24 h and no difference was detected between envenomed groups; however,

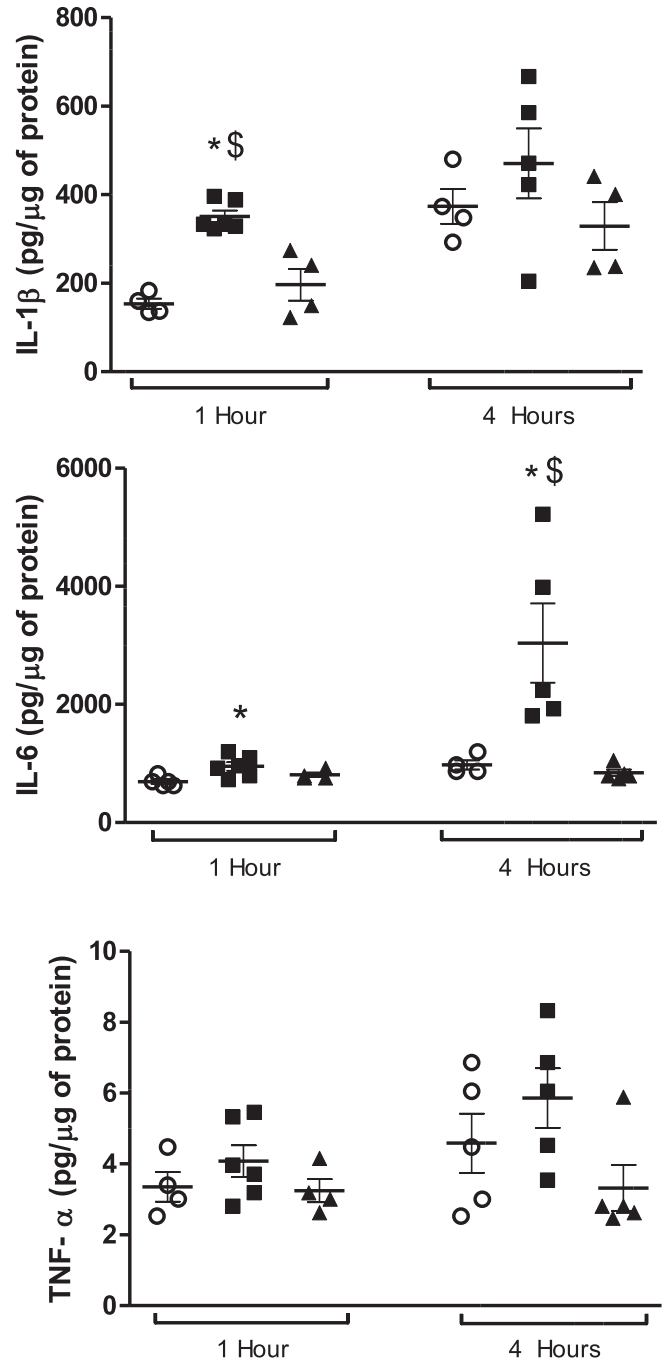


Fig. 4. Inflammatory cytokines in lung tissue of the envenomed rats. Rats were injected (i.v.) with apyrogenic sterile NaCl 0.9% (open circles), Tsv (closed squares) or Tbv (closed triangles). Lungs were collected in the indicated times and the cytokines levels were evaluated using Milliplex assay. The results are expressed as the mean \pm SEM of 4–5 animals per group. * $P < 0.05$ when compared to NaCl group; \$ $P < 0.05$ when compared to Tbv group.

at this time the neutrophil numbers decreased as compared to the respective envenomed group at 4 h.

4. Discussion

We examined the pathophysiological effects, with emphasis on airways, of two of the main Brazilian scorpions of medical importance, *T. serrulatus* and *T. bahiensis*. *T. serrulatus* is a well known

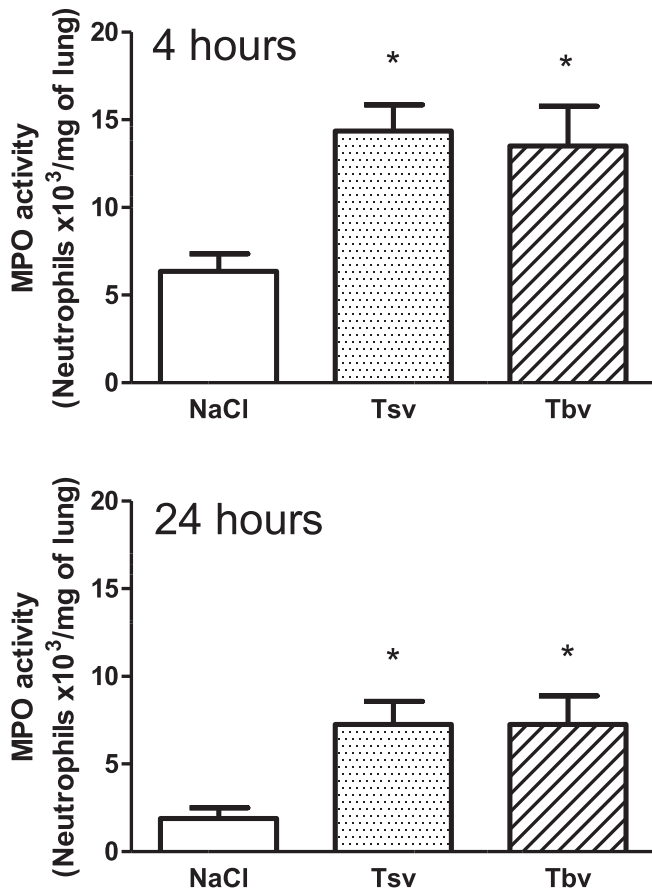


Fig. 5. MPO activity in the lung homogenates from envenomed rats. Groups of rats received (i.v.) apyrogenic and sterile isotonic saline (NaCl), *T. serrulatus* venom (Tsv) or *T. bahiensis* venom (Tbv). After 4 or 24 h the rats were killed, lungs were collected and prepared to the evaluation of MPO activity. The data represent the MPO activity as an index of neutrophil accumulation in the tissue and are expressed as the means \pm SEM (5–9 animals per group). * $P < 0.05$ compared to NaCl. ^s $P < 0.05$ compared to Tsv.

inducer of severe accidents in which pulmonary edema may lead to death (Bucaretschi et al., 1995, 2014). Inflammation is believed to account for pulmonary edema following Tsv injection (Freire-Maia and Matos, 1993), as well as by venoms from other sub-family Titynae scorpions found in Latin America such as *Tityus discrepans* (D'Suze et al., 1999), *Tityus trivitattus* and *Tityus confluens* (de Roodt et al., 2001, 2009), and also from Buthidae scorpions around the world, as *Mesobuthus tamulus* (Pandey and Deshpande, 2004), *Androctonus australis hector* (Adi-Bessalem et al., 2008) and *Leiurus quinquestriatus* (Fatani, 2010).

Our first finding shows that Tbv is edematogenic in the airways. Freire-Maia and Matos (1993) described previously that Tsv induces edema in the rat lungs, while Zuliani et al. (2013) extended this finding to all airways segments (trachea, upper and inner bronchi, and lungs). Here we confirmed this effect of Tsv and, comparing to Tbv data, we showed that Tsv-induced vasopermeability in airways surpasses that induced by Tbv. Extending the airways edema evaluation to longer times (4 and 24 h) we found a high protein content in BALF from rats envenomed with Tsv than Tbv. Taken together, the data prompt us to conclude that Tsv is more edematogenic than Tbv in the airways. We knew from a previous study (Severino et al., 2009) that Tbv had an edematogenic action with similar potency of Tsv when injected into mouse paw. Here, evaluating the systemic action since venoms were injected intravenously, the panorama has changed. Interestingly, Santos-da-Silva

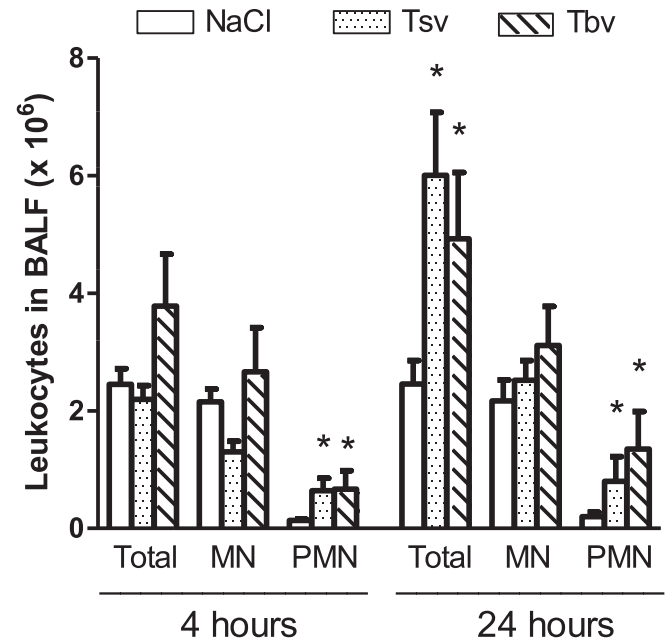


Fig. 6. Leukocyte accumulation into the airways of envenomed rats. Groups of rats received (i.v.) apyrogenic and sterile isotonic saline (NaCl), *T. serrulatus* venom (Tsv) or *T. bahiensis* venom (Tbv). After 4 or 24 h the rats were killed, BALF was collected and prepared to the evaluation of total and differential leukocyte counts. The results are expressed as the means \pm SEM (9–14 animals per group). MN: mononuclear cells; PMN: polymorphonuclear cells. * $P < 0.05$ compared to NaCl.

et al. (2017) described that *Tityus obscurus* venom induced paw edema in mice similarly to Tsv, but pulmonary edema was not observed in rats after intravenous administration of *T. obscurus* venom. Platelet activating factor (PAF) is believed to be important in rat and mouse lung edema induced by Tsv (Freire-Maia and Matos, 1993; Coelho et al., 2007) and Severino et al. (2009) showed that the antagonism of PAF inhibited the mouse paw edema induced by Tsv but not by Tbv. A possible explanation for different values of the Evans blue extravasation into airways described here (higher in Tsv) is that Tbv induces less (or even does not induce) PAF production than Tsv. At later times, assessed by protein content in BALF, IL-1 β and IL-6 (see below) may account for the higher protein concentration in the Tsv envenomed animals. Another mechanism probably involved in edema is operating in the lungs affected by Tsv, although data with Tbv are lacking, Malaque et al. (2015) described downregulation of epithelial sodium channel alpha subunit (α -ENaC) and aquaporin 5 (AQP5) and increased expression of the Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1), alterations that could impair the pulmonary fluid clearance.

Aside lung edema, hemorrhage was detected in the airways in a fatal case of sting by *T. serrulatus* reported by Amaral et al. (1994). Experimentally, using histological approach, Corrêa et al. (1997) and Pinto et al. (2010) observed lung hemorrhage in rats envenomed by Tsv, but it was neither evaluated nor measured. Some research groups have related macroscopic and microscopic evidences of lung hemorrhagic lesions in rodents by different scorpion venoms, as *T. trivitattus* (de Roodt et al., 2001), *T. confluens* (de Roodt et al., 2009), *A. australis hector* (Adi-Bessalem et al., 2008), *Hottentota gentili* (El Hidan et al., 2015), *M. tamulus* (Akella et al., 2015) and *T. obscurus* (Santos-da-Silva et al., 2017). Our results showed that Tsv and Tbv were able to induce hemorrhage that was restricted to inner bronchi and lungs; unlike the vascular permeability, lungs were more affected by Tbv. Oliveira et al. (2015) showed that the most abundant transcript from the venom gland

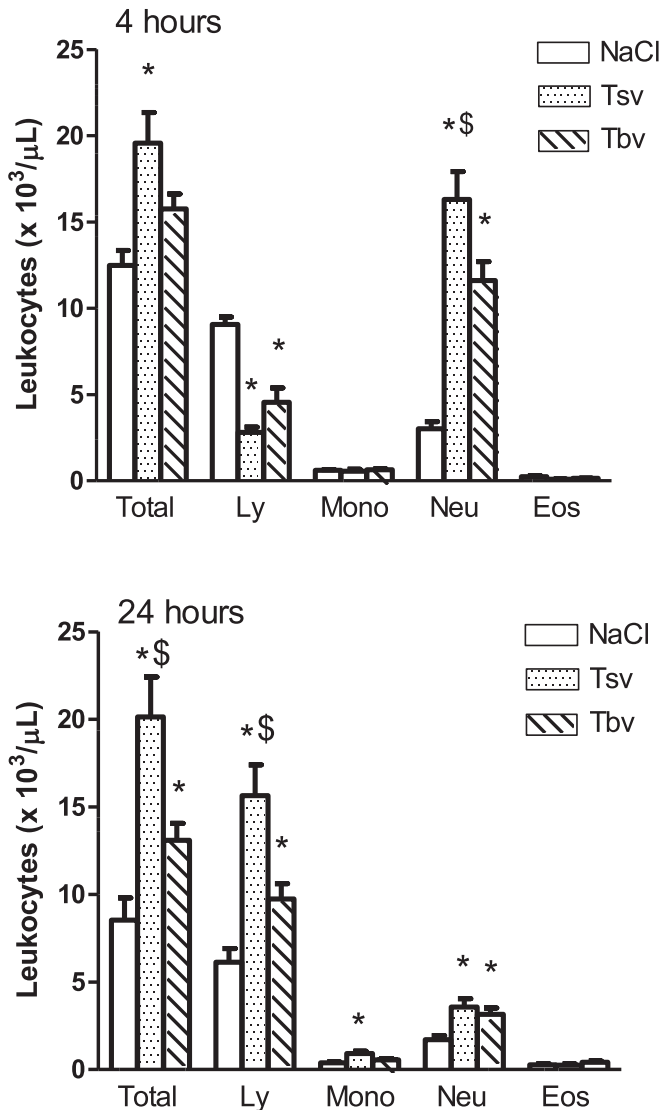


Fig. 7. Total and differential leukocyte counts in the blood of envenomed rats. Groups of rats received (i.v.) apyrogenic and sterile isotonic saline (NaCl), *T. serrulatus* venom (Tsv) or *T. bahiensis* venom (Tbv). After 4 or 24 h the rats were killed and blood samples were collected. The results are expressed as the means \pm SEM (9–14 animals per group). Ly: lymphocytes; Mono: monocytes; Neu: neutrophils; Eos: eosinophils. * $P < 0.05$ compared to NaCl. ^{\$} $P < 0.05$ compared to Tbv.

of *T. bahiensis* are metalloproteinases, far above than neurotoxins. Metalloproteinases in scorpion and snake venoms are structurally related and these are involved in hemorrhage. Although the authors pointed out the impossibility to assume that the high level expression of metalloproteinase correspond exactly to their quantity in the venom, we can hypothesize that if Tbv has more metalloproteinases, more hemorrhagic it could be. In this sense, Venancio et al. (2013) described that Tbv exhibited higher proteolytic activity than Tsv and such activity was completely inhibited by a metalloproteinase inhibitor.

Cytokines are mediators involved in several pathophysiological processes affecting the airways, modulating vasopermeability, influx and activation of leukocytes among others. Although produced in the human scorpionism as cited above, data on cytokine production in human lungs affected by scorpion venom are lacking. We recently published that human bronchial epithelial cells stimulated *in vitro* by *T. serrulatus* venom can produce IL-1 β , IL-6 and IL-

8 (Rigoni et al., 2016). In experimental scorpionism models, Coelho et al. (2007) showed the production of chemokine KC and Zoccal et al. (2016) of IL-1 β in mice lungs; in rats, mRNA expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α , among others, were found in the lungs after the injection of *T. serrulatus* gamma fraction toxin (Andrade et al., 2007). The induction of cytokine production by the venom or toxins from different scorpions has been also studied in the serum. Thus, elevated levels of IL-1 and IL-6 were found in mice injected with Tsv or its major toxin TsTx-I (Petricevich and Peña, 2002; Pessini et al., 2003), *A. australis hector* venom (Adi-Bessalem et al., 2008; Saidi et al., 2013) and *Mesobuthus eupeus* venom (Jalali et al., 2015). Moreover, *A. australis hector* venom is also able to trigger IL-1 β , IL-6 and TNF- α production in different tissues as adipose and skeletal muscle (Ait-Lounis and Laraba-Djebari, 2012). Taking into account this information we decided to evaluate and compare the concentration of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the lungs of rats envenomed with Tsv or Tbv. Our results with Tsv in rat lungs are consistent with (except by TNF- α) mRNA levels described by Andrade et al. (2007).

None of the measured cytokines were found in lung of Tbv envenomed rats. Interesting although not in the lungs, Tbv also did not induced the production of IL-1 β , IL-6 and TNF- α when injected in pregnant mice and evaluated in their fetuses (Dorce et al., 2015) but it elicited some behavioral and physical alterations in the neonates (Dorce et al., 2009). The source of the cytokines in the lungs in the scorpionism is not exactly known but epithelial cells (Rigoni et al., 2016) and macrophages may contribute. Macrophages are naturally in great numbers in the lungs and Malaque et al. (2015) showed an augmented number of macrophages in the lungs of rats 60 min after the evenomation with Tsv. In fact, mice macrophages produced IL-6 but not TNF when stimulated by Tsv (Petricevich, 2002). Studies aiming to investigate cytokine production by macrophage or even epithelial airways cells stimulated with Tbv could help to provide a better understanding of why cytokines were not found in the lungs of Tbv envenomed rats. We can not rule out the inhibitory action of toxins found in the venoms, Zoccal et al. (2011) showed toxins in Tsv inhibiting cytokine production. Additionally, Corzo and Espino-Solis (2017) showed that different toxins from *Centruroides suffusus suffusus* venom may or may not stimulate the cytokine production by human mononuclear cells; more than that, a mixture of toxins may have a synergistic or an inhibitory effect on the cytokine production. It could be speculated whether toxins in Tbv behave the same profile, with inhibitory activity, culminating in the absence of cytokines in our experiments.

TNF- α level remained equally low in all groups, independently of the venom employed which is in accordance with the results obtained with Tsv in mice by Coelho et al. (2007) and Costal-Oliveira et al. (2015) studying the evenomation by *Hadruroides lunatus*. In the serum of humans stung by *T. serrulatus* TNF- α may or not be detected (Magalhães et al., 1999; Fukuhara et al., 2003). In contrast, this cytokine was found in other tissues in experimental evenomation by *A. australis hector* (Ait-Lounis and Laraba-Djebari, 2012).

IL-1 β is a well known synthesis stimulator of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on endothelial cells thereby promoting the firm adhesion of neutrophils on endothelium. In rats envenomed by *A. australis hector* the production of IL-1 β and IL-6 (both found in the serum) occurred in parallel with high levels of ICAM-1 and MPO in pulmonary tissue (Raouraoua-Boukari et al., 2012). IL-1 instillation into rat airways increases lung leak and MPO, and neutrophil accumulation in BALF (Koh et al., 1996). Moreover, with the same experimental approach, Lee et al. (2000) obtained PAF production accompanied by neutrophil influx which was inhibited by PAF-antagonist. This link between IL-1 and PAF in

the lungs could be interesting in scorpionism induced by *T. serrulatus*, since it was suggested that PAF is a participant in this scenario (Freire-Maia and Matos, 1993; Coelho et al., 2007). Considering the early lung production of IL-1 β in our study, it is possible that such cytokine is involved in edema and leukocyte migration hours after Tsv administration. In fact, Zoccal et al. (2016) found that IL-1 knockout mice or treatment with IL-1 receptor antagonist decreased protein content in bronchoalveolar lavage and neutrophil infiltration into lungs.

As IL-1 β , IL-6 may contribute to the Tsv-induced pulmonary alterations described in this article. Instillation of IL-6 into rat airways results in lung neutrophil infiltration and edema; moreover, their bronchial and alveolar cells are capable of producing IL-6 (Hierholzer et al., 1998). IL-6 also accelerates the release of neutrophils from bone marrow into blood and turns these cells less deformable, being preferentially trapped in the lung microcirculation (Suwa et al., 2001). Although working with different tissues and venom (*A. australis hector*), recently Taibi-Djennah and Laraba-Djebari (2015) inhibited the MPO and EPO activity, markers of neutrophil and eosinophil accumulation respectively, in pancreas, liver, adipose tissue and skeletal muscle pretreating the rats with antibodies to IL-6 and TNF- α .

Similarly to our work, Saidi et al. (2013) developed previously a comparative study in mice envenomed with the most dangerous scorpions of Buthidae family in Algeria (*Androctonus australis hector* and *Androctonus amoreuxi*) and showed differences in the cytokines level (IL-1 β , IL-6 and IL-10) in the serum and also in the lung edema.

In the airways, neutrophils could be activated and cause tissue damage as seen in several models of acute lung injury, as well as that induced by scorpion venom. Supporting this hypothesis, D'Suze et al. (2007) presented a data in which pharmacological inhibition of neutrophils activation diminished acute lung injury induced by *T. discrepans* venom. It is possible that in humans neutrophils may contribute to the acute lung injury induced by scorpionism since they are activated by *Tityus zulianus* venom (Borges et al., 2011). Here, influx of total leukocytes into airways, PMN influx into lungs and their concentration in BALF was not different between envenomed groups. Our data with Tsv are in accordance with early published results (Coelho et al., 2007; Peres et al., 2009; Zoccal et al., 2011) and this is the first report showing that Tbv also have this capacity. Since Tbv did not induced the production of cytokines involved in leukocyte migration into lungs, further investigations may be necessary to assess this issue. It is possible that Tsv may drive leukocyte migration through complement activation and C5a formation (Bertazzi et al., 2005), an effect found with metalloproteinase isolated from snake venom (Farsky et al., 2000). At this point we can speculate whether the same phenomenon is operating in our study and, taking into account the higher metalloproteinase expression and activity found in Tbv, if this phenomenon is capable of providing similar leukocyte and neutrophil migration to lungs of the Tbv envenomed animals compared to Tsv.

Our last contribution was to demonstrate that both venoms induced leukocyte mobilization to blood. Leukocytosis and neutrophilia showed here are in accordance with earlier results in rats and mice after 3 to 6 h of envenomation by Tsv (Borges et al., 2000; Pessini et al., 2003; Fialho et al., 2011). IL-6 is a candidate to perform this action as described by Suwa et al. (2000, 2002) whose found that initially (2–6 h) this cytokine can mobilize PMNs from the marginated pool and lately (12–24 h) accelerates the release of PMN from bone marrow. In fact, scorpion venom peptides (from *Buthus martensii* Karsh) could recover the bone marrow leukocyte production in irradiated mice, in apparent dependence on the production of IL-1 and IL-6 (Dong et al., 2009). Here, it is possible that IL-1 β and IL-6 produced at lungs may have an endocrine action

contributing to leukocyte mobilization to blood; with no IL-1 β and IL-6 production, neutrophilia in Tbv group at 4 h was lower than Tsv group. Moreover, PAF is probably important in neutrophilia observed in Tsv envenomed rats since PAF-antagonist inhibited both, neutrophilia and the release of mature neutrophils from bone marrow (Borges et al., 2000). In Tbv envenomed animals IL-1 β and IL-6 are lacking, associated with the possible inability to stimulate PAF production (as discussed earlier), the leukocytosis and neutrophilia were higher in animals envenomed with Tsv than their counterparts with Tbv.

We showed for the first time the lymphopenia at 4 h after Tsv or Tbv injection in rats. Lymphopenia was previously shown in rats by Costal-Oliveira et al. (2015) with *H. lunatus* scorpion venom, and mice after the envenomation by *A. australis hector* (Adi-Bessalem et al., 2008). In humans stung by scorpions in Morocco, lymphopenia was associated with a worse prognosis (Aboumaad et al., 2014). At 24 h there was no difference in neutrophilia in the envenomed groups. We also described that Tsv induced a greater leukogram alteration, since total leukocytes, lymphocytosis and monocytosis were all present and in higher values when compared to Tbv group; it could be a late reflex of cytokines produced in the lungs of Tsv envenomed rats. In humans, the participation of lymphocytes and monocytes in the scorpionism is possible since cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells was detected with the use of Tsv (Casella-Martins et al., 2015) and *Centruroides suffusus suffusus* (Corzo and Espino-Solis, 2017).

To summarize, airways edema, a condition highly involved in human death due to scorpionism, and believed to be in part triggered by inflammation, was up-regulated by Tsv compared to Tbv. Moreover IL-1 β and IL-6, cytokines with important effects on inflammation, were detected only in the lungs of Tsv envenomed rats. However, Tbv was not innocuous considering its capacity to induce airways inflammation as showed here by the first time. One hypothesis to explain such differences between Tsv and Tbv in the airways is that distinct inflammatory mediators could be generated by the venoms and thus modulates the actions described here. These differences may be imposed by the toxins found in the venoms that may vary in constitution and expression, despite the high similarity at the amino acid and DNA levels among toxins in Tbv and Tsv (Becerril et al., 1997). The findings presented here help to explain and consolidate the pathophysiological mechanisms seen in severe scorpionism; moreover, the highest severity observed in ALI induced by Tsv may help to justify why pulmonary involvement is observed in humans stung by *T. serrulatus* but not by *T. bahiensis* as reported by Bucarety et al. (1995, 2014).

Acknowledgements

The work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Universal 457512/2014-8) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2012/51104-8 and 2017/02042-3). This study is part of a Master's thesis presented by JGM to the Postgraduate Program in Experimental Pathology of Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil. JGM received scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2017.11.005>.

References

Abdel-Haleem, A.-H.A., Meki, A.-R.M.A., Noaman, H.A., Mohamed, Z.T., 2006. Serum

- levels of IL-6 and its soluble receptor, TNF- α and chemokine RANTES in scorpion envenomed children: their relation to scorpion envenomation outcome. *Toxicon* 47, 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.12.008>.
- Aboumaad, B., Lahssaini, M., Tiger, A., Benhassain, S.M., 2014. Clinical comparison of scorpion envenomation by *Androctonus mauritanicus* and *Buthus occitanus* in children. *Toxicon* 90, 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.09.001>.
- Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., 2008. Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: tissue damages and inflammatory response. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.03.006>.
- Ait-Lounis, A., Laraba-Djebari, F., 2012. TNF- α involvement in insulin resistance induced by experimental scorpion envenomation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1740 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001740>.
- Akella, A., Tiwari, A.K., Patne, S.C.U., Deshpande, S.B., 2015. *Mesobuthus tamulus* venom induces acute respiratory distress syndrome in rats involving additional mechanisms as compared to oleic acid model. *Toxicon* 97, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.004>.
- Amaral, C.F.S., Barbosa, A.J.A., Leite, V.H.R., Tafuri, W.L., Rezende, N.A., 1994. Scorpion sting-induced pulmonary oedema: evidence of increased alveolocapillary membrane permeability. *Toxicon* 32, 999–1003.
- Andrade, M.V., Lisboa, F.A., Portugal, A.L., Arantes, R.M.E., Cunha-Melo, J.R., 2007. Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 146, 581–587. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.031>.
- Becerril, B., Marangoni, S., Possani, L.D., 1997. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon* 35, 821–835.
- Bertazzi, D.T., Assis-Pandochi, A.I., Talhaferro, V.L., Azzolini, A.E.C.S., Crott, L.S.P., Arantes, E.C., 2005. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Int. Immunopharmacol.* 5, 1077–1084. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.02.007>.
- Borges, A., Op den Camp, H.J.M., De Sanctis, J.B., 2011. Specific activation of human neutrophils by scorpion venom: a flow cytometry assessment. *Toxicol. Vitro* 25, 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.10.009>.
- Borges, C.M., Silveira, M.R., Beker, M.A.C.L., Freire-Maia, L., Teixeira, M.M., 2000. Scorpion venom-induced neutrophilia is inhibited by a PAF receptor antagonist in the rat. *J. Leukoc. Biol.* 67, 515–519.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bucaretychi, F., Baracat, E.C.E., Nogueira, R.J.N., Chavez, A., Zambrone, F.A.D., Fonseca, M.R.C.C., Tourinho, F.S., 1995. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 37, 331–336.
- Bucaretychi, F., Fernandes, L.C.R., Fernandes, C.B., Branco, M.M., Prado, C.C., Vieira, R.J., Capitani, E.M., Hyslop, S., 2014. Clinical consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* scorpion stings in the region of Campinas, southeastern Brazil. *Toxicon* 89, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.022>.
- Casella-Martins, A., Ayres, L.R., Burin, S.M., Morais, F.R., Pereira, J.C., Faccioli, L.H., Sampaio, S.V., Arantes, E.C., Castro, F.A., Pereira-Crott, L.S., 2015. Immunomodulatory activity of *Tityus serrulatus* scorpion venom on human T lymphocytes. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 21, 46. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0046-3>.
- Chippaux, J.-P., Goyffon, M., 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop.* 107, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.021>.
- Coelho, F., Pessini, A.C., Coelho, A.M., Pinho, V.S., Souza, D.G., Arantes, E.C., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2007. Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 50, 420–427. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.04.009>.
- Corrêa, M.M., Sampaio, S.V., Lopes, R.A., Mancuso, L.C., Cunha, O.A.B., Franco, J.J., Giglio, J.R., 1997. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin. *Toxicon* 35, 1053–1067.
- Corzo, G., Espino-Solis, G.P., 2017. Selected scorpion toxin exposures induce cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicon* 127, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.007>.
- Costal-Oliveira, F., Guerra-Duarte, C., Castro, K.L.P., Tintaya, B., Bonilla, C., Silva, W., Yarlequé, A., Fujiwara, R., Melo, M.M., Chávez-Olortegui, C., 2015. Serological, biochemical and enzymatic alterations in rodents after experimental envenomation with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. *Toxicon* 103, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.022>.
- Cupo, P., 2015. Clinical update on scorpion envenoming. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48, 642–649. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0237-2015>.
- de Roodt, A.R., Gimeno, E., Portiansky, E., Varni, L., Dolab, J.A., Segre, L., Litwin, S., Vidal, J.C., 2001. A study on the experimental envenomation in mice with the venom of *Tityus trivitatus* Kraepelin 1898 (Scorpiones, Buthidae) captured in Argentina. *J. Natl. Toxins* 10, 99–109.
- de Roodt, A.R., Lago, N.R., Salomón, O.D., Laskowicz, R.D., Román, L.E.N., López, R.A., Montero, T.E., Vega, V.V., 2009. A new venomous scorpion responsible for severe envenomation in Argentina: *Tityus confluens*. *Toxicon* 53, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.003>.
- Dong, W., Wang, L., Kong, T., He, Y., 2009. Scorpion venom peptides accelerate hematopoietic recovery of myelosuppression in irradiated mice. *Am. J. Chin. Med.* 37, 701–712.
- Dorce, A.L.C., Bellot, R.G., Dorce, V.A.C., Nencioni, A.L.A., 2009. Effects of prenatal exposure to *Tityus bahiensis* scorpion venom on rat offspring development. *Reprod. Toxicol.* 28, 365–370. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.04.008>.
- Dorce, A.L.C., Frare, E.O., Paulo, M.E.F.V., Dorce, V.A.C., Nencioni, A.L.A., 2015. *Tityus bahiensis* scorpion venom injected to dams during pregnancy. affects some cytokines of fetuses. *Toxicon* 103, 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.023>.
- D'Suze, G., Comellas, A., Pesce, L., Sevcik, C., Sanchez-de-León, R., 1999. *Tityus discrepans* venom produces a respiratory distress syndrome in rabbits through an indirect mechanism. *Toxicon* 37, 173–180.
- D'Suze, G., Díaz, P., Salazar, V., Sevcik, C., Brazón, J., 2007. Effect of leukocyte inhibitors benzydamine and cyclophosphamide, on lung injury caused by *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 50, 1116–1125. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.015>.
- D'Suze, G., Moncada, S., González, C., Sevcik, C., Aguilera, V., Alagón, A., 2003. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon* 41, 367–375.
- El Hidan, M.A., Touloun, O., El Hiba, O., Chait, A., Hafid, J.E., Boumezzough, A., 2015. Behavioral, histopathological and biochemical impairments observed in mice envenomed by the scorpion: *Hottentota gentili* (Pallary, 1924). *Toxicon* 103, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.013>.
- Farsky, S.H.P., Gonçalves, L.R.C., Gutiérrez, J.M., Correa, A.P., Rucavado, A., Gasque, P., Tambourgi, D.V., 2000. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leukocyte recruitment. *Mediat. Inflamm.* 9, 213–221. <https://doi.org/10.1080/09629350020025728>.
- Fatani, A.J., 2010. Comparative study between peripherally and centrally acting sublethal and lethal doses of *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom in rabbits: the usefulness of the sodium channel blocker lidocaine. *Saudi Pharm. J.* 18, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2010.05.007>.
- Fialho, E.M.S., Maciel, M.C.G., Silva, A.C.B., Reis, A.S., Assunção, A.K.M., Fortes, T.S., Silva, L.A., Guerra, R.N.M., Kwasniewski, F.H., Nascimento, F.R.F., 2011. Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 58, 480–485. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.08.006>.
- Freire-Maia, L., Matos, I.M., 1993. Heparin or a PAF antagonist (BN 52021) prevents the acute pulmonary edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. *Toxicon* 31, 1207–1210.
- Fukuhara, Y.D.M., Reis, M.L., Dellalibera-Joviliano, R., Cunha, F.Q.C., Donadi, E.A., 2003. Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 41, 49–55.
- Goldblum, S.E., Wu, K.M., Jay, M., 1985. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 59, 1978–1985.
- Hierholzer, C., Kalf, J.C., Omert, L., Tsukada, K., Loeffert, J.E., Watkins, S.C., Billiar, T.R., Tweardy, T.J., 1998. Interleukin-6 production in hemorrhagic shock is accompanied by neutrophil recruitment and lung injury. *Am. J. Physiol.* 275, L611–L621 (*Lung Cell. Mol. Physiol.*).
- Jalali, M.R., Jalali, M.T., Mapar, Z., 2015. Evaluation of plasma cytokine levels in *Mesobuthus eupeus* (Scorpionida: Buthidae) scorpion envenomation in rats treated with polyvalent antivenom. *Jundishapur J. Health Sci.* 7, e27159 <https://doi.org/10.5812/jjhs.27159>.
- Koh, Y., Hybertson, B.M., Jepson, E.K., Repine, J.E., 1996. Tumor necrosis factor induced acute lung leak in rats: less than with interleukin-1. *Inflammation* 20, 461–469.
- Lee, H.M., Hybertson, B.M., Cho, H.G., Terada, L.S., Cho, O., Repine, A.J., Repine, J.E., 2000. Platelet-activating factor contributes to acute lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279, L75–L80.
- Magalhães, M.M., Pereira, M.E.S., Amaral, C.F.S., Rezende, N.A., Campolina, D., Bucaretychi, F., Gazzinelli, R.T., Cunha-Melo, J.R., 1999. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 37, 1155–1164.
- Malague, C.M.S., Bragança, A.C., Sanches, T.R., Volpini, R.A., Shimizu, M.H., Hiyane, M.I., Câmara, N.O.S., Seguro, A.C., Andrade, L., 2015. The role of dexamethasone in scorpion venom-induced deregulation of sodium and water transport in rat lungs. *Intensive Care Med.* Exp. 3, 28. <https://doi.org/10.1186/s40635-015-0063-0>.
- Meki, A.-R.A.M., Mohamed, Z.M.M., El-deen, H.M.M., 2003. Significance of assessment of serum cardiac troponin I and interleukin-8 in scorpion envenomed children. *Toxicon* 41, 129–137.
- Nishikawa, A.K., Caricati, C.P., Lima, M.L., Santos, M.C., Kipnis, T.L., Eickstedt, V.R., Knysak, I., Silva, M.H., Higashi, H.G., Silva, W.D., 1994. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon* 32, 989–998.
- Oliveira, U.C., Candido, D.M., Dorce, V.A.C., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., 2015. The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. *Toxicon* 95, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.12.013>.
- Pandey, R., Deshpande, S.B., 2004. Protective effects of aprotinin on respiratory and cardiac abnormalities induced by *Mesobuthus tamulus* venom in adult rats. *Toxicon* 44, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.025>.
- Peres, A.C.P., Nonaka, P.N., Carvalho, P.T.C., Toyama, M.H., Silva, C.A.M., Vieira, R.P., Dolnikoff, M., Zamuner, S.R., Oliveira, L.V.F., 2009. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. *Toxicon* 53, 779–785. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.002>.
- Pessini, A.C., Souza, A.M., Faccioli, L.H., Gregório, Z.M.O., Arantes, E.C., 2003. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and T β TX-I

- in mice. *Int. Immunopharmacol.* 3, 765–774. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(03\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(03)00078-X).
- Petricevich, V.L., 2002. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. *Mediat. Inflamm.* 11, 23–31.
- Petricevich, V.L., Peña, C.F., 2002. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Mediat. Inflamm.* 11, 173–180. <https://doi.org/10.1080/09622935020138811>.
- Pinto, M.C.L., Melo, M.B., Cruz, M.L., Verçosa Junior, D., Melo, M.M., 2010. Cardio-respiratory evaluation of juvenile rats experimentally envenomed with *Tityus serrulatus* venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 16, 253–267.
- Raouraoua-Boukari, R., Sami-Merah, S., Hammoudi-Triki, D., Martin-Eauclaire, M., Laraba-Djebari, F., 2012. Immunomodulation of the inflammatory response induced by *Androctonus australis hector* neurotoxins: biomarker interactions. *Neuroimmunomodulation* 19, 103–110. <https://doi.org/10.1159/000330241>.
- Reckziegel, G.C., Pinto Jr., V.L., 2014. Scorpionism in Brazil in the years 2000 to 2012. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 20, 46. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-46>.
- Rigoni, V.L.S., Kwasniewski, F.H., Vieira, R.P., Linhares, I.S., Silva, J.L.V., Nogueira-Pedro, A., Zamuner, S.R., 2016. Human bronchial epithelial cells injury and cytokine production induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom: an in vitro study. *Toxicon* 120, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.07.013>.
- Saidi, H., Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., 2013. Effects of atropine and propranolol on lung inflammation in experimental envenomation: comparison of two buthidae venoms. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 19, 8. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-19-8>.
- Santos-da-Silva, A.P., Candido, D.M., Nencioni, A.L.A., Kimura, L.F., Prezotto-Neto, J.P., Bárbaro, K.C., Chalkidis, H.M., Dorce, V.A.C., 2017. Some pharmacological effects of *Tityus obscurus* venom in rats and mice. *Toxicon* 126, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.12.008>.
- Severino, D.N., Pereira, R.L., Knysak, I., Cândido, D.M., Kwasniewski, F.H., 2009. Edematogenic activity of scorpion venoms from the Buthidae family and the role of platelet-activating factor and nitric oxide in paw edema induced by *Tityus* venoms. *Inflammation* 32, 57–64. <https://doi.org/10.1007/s10753-008-9102-2>.
- Sirois, M.G., Jancar, S., Braquet, P., Plante, G.E., Sirois, P., 1988. PAF increases vascular permeability in selected tissue: effect of BN-52021 and L-655,240. *Prostaglandins* 36, 631–644.
- Suwa, T., Hogg, J.C., English, D., Eeden, S.F., 2000. Interleukin-6 induces demargination of intravascular neutrophils and shortens their transit in marrow. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H2954–H2960.
- Suwa, T., Hogg, J.C., Klut, M.E., Hards, J., Eeden, S.F., 2001. Interleukin-6 changes deformability of neutrophils and induces their sequestration in the lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 970–976.
- Suwa, T., Hogg, J.C., Quinlan, K.B., Eeden, S.F., 2002. The effect of interleukin-6 on L-selectin levels on polymorphonuclear leukocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H879–H884.
- Taibi-Djennah, Z., Laraba-Djebari, F., 2015. Effect of cytokine antibodies in the immunomodulation of inflammatory response and metabolic disorders induced by scorpion venom. *Int. Immunopharmacol.* 27, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.05.002>.
- Venancio, E.J., Portaro, F.C.V., Kuniyoshi, A.K., Carvalho, D.C., Pidade-Queiroz, G., Tambourgi, D.V., 2013. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical anti-venoms. *Toxicon* 69, 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.012>.
- von Eickstedt, V.R.D., Ribeiro, L.A., Candido, D.M., Albuquerque, M.J., Jorge, M.T., 1996. Evolution of scorpionism by *Tityus bahiensis* (perly) and *Tityus serrulatus* Lutz and Mello and geographical distribution of the two species in the state of São Paulo, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins* 2, 92–105.
- Zoccal, K.F., Bitencourt, C.S., Secatto, A., Sorgi, C.A., Bordon, K.C.F., Sampaio, S.V., Arantes, E.C., Faccioli, L.H., 2011. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. *Toxicon* 57, 1101–1108. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.04.017>.
- Zoccal, K.F., Sorgi, C.A., Hori, J.I., Paula-Silva, F.W.G., Arantes, E.C., Serezani, C.H., Zamboni, D.S., Faccioli, L.H., 2016. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. *Nat. Comm.* 7, 10760. <https://doi.org/10.1038/ncomms10760>.
- Zuliani, J.P., Freitas, T.A., Conceição, I.M., Kwasniewski, F.H., 2013. *Tityus serrulatus* venom increase vascular permeability in selected airway tissues in a mast cell-independent way. *Exp. Toxicol. Pathol.* 65, 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.08.010>.