



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FABIO BONIFACIO DE ANDRADE

**ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NA LESÃO
PULMONAR AGUDA CAUSADA POR PEÇONHA
ESCORPIÔNICA**

FABIO BONIFACIO DE ANDRADE

**ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NA LESÃO
PULMONAR AGUDA CAUSADA POR PEÇONHA
ESCORPIÔNICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Fábio H. Kwasniewski

Londrina
2020

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

AN553e Andrade, Fabio Bonifacio.

Envolvimento do óxido nítrico na lesão pulmonar aguda causada por peçonha escorpionica / Fabio Bonifacio Andrade. - Londrina, 2020.
59 f.

Orientador: Fábio Henrique Kwasniewski.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Escorpiões - Tese. 2. Edema pulmonar - Tese. 3. Óxido nítrico - Tese. 4. Leucócitos - Tese. I. Kwasniewski, Fábio Henrique. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

FABIO BONIFACIO DE ANDRADE

**ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NA LESÃO PULMONAR
AGUDA CAUSADA POR PEÇONHA ESCORPIÔNICA**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Andressa de Freitas Mendes Dionisio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 09 de março de 2020.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem
perder entusiasmo.”

Winston Churchill

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família pelo apoio e incentivo, principalmente no início do percurso acadêmico, na qual foi imprescindível para meu ingresso ao mestrado.

À todos professores que de alguma forma me ensinaram e auxiliaram meu desenvolvimento acadêmico.

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

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

À banca de qualificação, Camila Rodrigues Ferraz e Emerson José Venancio, e à banca de defesa, Andressa de Freitas Mendes Dionisio e Emerson José Venancio, por contribuírem para edificação deste trabalho

Em particular os colegas: Jackson Gabriel Miyamoto, Helena Tiemi Suzukawa, Rito Santo Pereira, Eduardo Coló Battocchio, Virginia Concanto pelo acolhimento e amparo durante as experimentações.

À todos os colegas de turma do programa de pós-graduação em patologia experimental, pela amizade e companheirismo.

À todos os meus amigos fora da universidade, em especial: Victor Augusto Gimenez, João Arthur Gimenez, Luís Filipe Negrão, Igor Moryama, Jônatas Fernando Cavalini e Thiago Meireles pela amizade e companheirismo desde antes do meu ingresso ao mestrado, sendo primordiais durante esse período.

Em particular os professores: Waldiceu Aparecido Verri Júnior e Phileno Pinge Filho, pela parceria com nosso laboratório, contribuindo de maneira imprescindível para realização desse trabalho

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

Andrade, Fabio Bonifacio. **Envolvimento do óxido nítrico na lesão pulmonar aguda causada por peçonha escorpiônica**. 2020. 59 f. Dissertação – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O escorpionismo é importante problema 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. O *Tityus serrulatus* (Ts) é a espécie mais relevante devido a capacidade de sua peçonha em induzir sintomas clinicamente importantes, especialmente em crianças. Nessas, a peçonha escorpiônica pode desencadear lesão pulmonar aguda (LPA), podendo culminar na morte da vítima. Assim, a maioria dos estudos é desenvolvida com sua peçonha, tendo sido demonstrado que desencadeia inflamação sistêmica e pulmonar, com edema, secreções hemorrágicas e influxo leucocitário para os pulmões. O *Tityus bahiensis* (Tb) é outra espécie capaz de gerar acidentes severos, mas com pouco relato de morte associada a seu envenenamento e com poucos dados na literatura acerca da fisiopatologia de seu envenenamento. O óxido nítrico (NO) é um mediador inflamatório gasoso e o aumento da sua produção se correlaciona positivamente com a severidade do envenenamento, porém, seu papel na lesão pulmonar aguda mediada por peçonha escorpiônica permanece desconhecido. No presente estudo, buscamos estudar o efeito da inibição farmacológica não-seletiva das enzimas produtoras do NO, através do pré-tratamento com o fármaco L-NAME (10 mg/kg), no escorpionismo experimental em ratos machos, induzido pela administração intravenosa (iv) das peçonhas de *T. serrulatus* e de *T. bahiensis* ambas a 200 µg/kg (pTs e pTb). Animais controles receberam NaCl 0,9% fisiológica 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 Lowry), no lavado bronco-alveolar (LBA, 1 e 4 horas), hemorragia pela quantificação da cianometahemoglobina (60 minutos), influxo de leucócitos (4 horas) para os pulmões pela atividade da mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG), produção de óxido nítrico (NO) nos pulmões pelo método de Griess modificado (1 e 4 horas), e o perfil de bandeamento proteico eletroforético dos LBAs. Como esperado, o potencial edematogênico das peçonhas foi confirmado após 30 minutos e em tempos mais prolongados (1 e 4 horas), sendo que a inibição da síntese de NO exacerbou o extravasamento proteico em 30 minutos em animais submetidos a pTs e 4 horas após o envenenamento por pTs ou pTb. A hemorragia aumentou nas vias aéreas inferiores de animais que receberam a pTs ou a pTb, e o pré-tratamento com L-NAME induziu potencialização desse efeito nas vias aéreas superiores no grupo envenenado pela pTb e redução nas vias aéreas inferiores no grupo submetido à pTs. A atividade da MPO se apresentou aumentada em animais envenenados e potencializada com a administração prévia de L-NAME, enquanto que a atividade da NAG foi aumentada somente quando houve uso do inibidor. Finalmente, a produção de NO no pulmão foi aumentada apenas 4 horas após o envenenamento, por ambas as peçonhas, e como esperado, esse efeito foi reduzido pela administração prévia

do L-NAME. Concluímos, portanto, que o NO exerce papel protetor na LPA induzida por peçonha escorpiónica.

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

Andrade, Fabio Bonifacio. **Nitric oxide involvement in acute lung injury caused by scorpion venom.** 2020. 59 p. Dissertação – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The scorpionism is a public health problem in Brazil and worldwide, 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. *Tityus serrulatus* (Ts) is the most important specie because its venom is able to induce signals and symptoms clinically relevants, mainly in children. In these, the scorpion venom can provoke acute lung injury (ALI) sometimes leading the victim's death. Therefore, the majority of studies are developed with its venom. It was demonstrated experimentally that Ts venom can trigger systemic and pulmonary inflammation, with pulmonary edema, hemorrhagic lesions and leukocyte migration to the lungs. *Tityus bahiensis* (Tb) is another scorpion capable to generate severe envenomation, additionally, unlike Ts, few are the relates of death related to Tb accident and little is known about the pathophysiology of its envenomation. Nitric Oxide (NO) is a gaseous inflammatory mediator and the increase of its production is directly related with the envenomation severity, however, its role in acute lung injury caused by scorpion venom is still unclear. In the present study, we investigated the effect of non-selective pharmacological inhibition of the enzymes related to NO synthesis, through the previous injection of L-NAME (10 mg/kg) in the experimental scorpionism induced in male rats by intravenous (iv) administration of *T. serrulatus* and *T. bahiensis* venom both 200 µg/kg (Tsv and Tbv). 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 Lowry method) in bronchoalveolar lavage (BAL, 1 and 4 hours), hemorrhage by cyanomethemoglobin quantification (60 minutes), leukocytes mobilization (4 hours) to the lungs through the activity of myeloperoxidase (MPO) and N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG), nitric oxide (NO) production in lung's parenchyma by modified Griess method (1 and 4 hours), and the eletroforetic proteic banding profile of the BALs. As expected, the edematogenic potential of both venoms was confirmed in the airways either in 30 min or in longer times (1 and 4 hours), and the inhibition of NO production exacerbated the proteic extravasation in 30 min in animals envenomated by Tsv; the same phenomenon occurred 4 hours after envenomation but for both Tsv and Tbv. The hemorrhage was increased in the lower airways of animals that receveid Tsv or Tbv, and the previous treatment with L-NAME induced a major increased in the upper airways of rats envenomated by Tbv and a reduction in the lower airways of rats envenomated by Tsv. The MPO activity was increased in animals envenomated and exacerbated when the NO production was inhibited, whereas the NAG activity was increase only with the previous administration of L-NAME. Finally, the NO content in the lung was increased only 4 hours after the envenomation for both venoms and as expected, the use of L-NAME provoked decreased in NO content also in 4 hours. We can conclude that NO exerts a protective role in acute lung injury caused by scorpion venom.

Key words: Scorpions. Pathophysiology. Pulmonary edema. Leukocytes. Nitric oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Registro fóssil de escorpião	14
Figura 2	– <i>Tityus serrulatus</i>	15
Figura 3	– <i>Tityus bahiensis</i>	15
Figura 4	– <i>Tityus stigmurus</i>	15
Figura 5	– <i>Tityus obscurus</i>	15
Figura 6	– Morfologia do escorpião	16
Figura 7	– Fisiopatologia da LPA	22
Figura 8	– Permeabilidade vascular nas vias aéreas	35
Figura 9	– Hemorragia nas vias aéreas	36
Figura 10	– Atividade da MPO e NAG em homogenatos pulmonares	37
Figura 11	– Concentração de NO ₂ ⁻ em homogenatos pulmonares	38
Figura 12	– Quantificação de proteínas no LBA	40
Figura 13	– Densidade proteica em gel SDS-PAGE dos LBAs	40
Figura 14	– Efeitos do envenenamento e envolvimento do L-NAME na LPA	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aE	azul de Evans
CK-MB	fosfocreatino quinase fração MB
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
GTP	guanosina trifosfato
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IgE	imunoglobulina E
IL-10	interleucina 10
IL-1R	receptor da interleucina 1
IL-1 α	interleucina 1 alfa
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
INF- γ	interferon gama
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
I.v.	intravenoso
LBA	lavado bronco-alveolar
LDH	lactato desidrogenase
L-NAME	hidrocloreto de N ^(ω) -nitro-L-arginina metil éster
LPA	lesão pulmonar aguda
MPO	mieloperoxidase
Myd88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
NAG	N-acetil- β -D-glicosaminidase
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NO	óxido nítrico
NOS	enzima óxido nítrico sintase
NOS1/nNOS	óxido nítrico sintase 1/neuronal
NOS2/ iNOS	óxido nítrico sintase 2/induzível
NOS3/eNOS	óxido nítrico sintase 2/endotelial
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PM	peso molecular
pTb	peçonha de <i>Tityus bahiensis</i>
pTs	peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>

SARA	síndrome da angústia respiratória aguda
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
SINAN	sistema de informação de agravos de notificação
TLR2	<i>toll-like receptor 2</i>
TLR4	<i>toll-like receptor 4</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
VAMPs	<i>venom-associated molecular patterns</i>
VCAM-I	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	ANATOMIA E MORFOLOGIA DO ESCORPIÃO	16
1.2	EPIDEMIOLOGIA DO ESCORPIONISMO NO BRASIL.....	17
1.3	COMPOSIÇÃO E AÇÃO DA PEÇONHA	18
1.4	FARMACOCINÉTICA DA PEÇONHA E QUADRO CLÍNICO DO ESCORPIONISMO	20
1.5	LESÃO PULMONAR AGUDA E INFLAMAÇÃO	22
1.6	ÓXIDO NÍTRICO E ESCORPIONISMO	25
1.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	30
3.2	PEÇONHA ESCORPIÔNICA.....	30
3.3	INDUÇÃO DO ESCORPIONISMO EXPERIMENTAL	30
3.4	AVALIAÇÃO DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR NAS VIAS AÉREAS	31
3.5	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	31
3.6	AVALIAÇÃO DA HEMORRAGIA NAS VIAS AÉREAS	32
3.7	MOBILIZAÇÃO DE LEUCÓCITOS PARA OS PULMÕES	32
3.8	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO NOS PULMÕES	33
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4	RESULTADOS	35
4.1	PERMEABILIDADE VASCULAR NAS VIAS AÉREAS	35
4.2	HEMORRAGIA NAS VIAS AÉREAS	35
4.3	MOBILIZAÇÃO DE LEUCÓCITOS PARA O PULMÃO	36
4.4	CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO TECIDO PULMONAR	37
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E SDS-PAGE	38

5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Os escorpiões representam os primeiros aracnídeos a dominarem o solo, com registros fósseis datados com cerca de 450 milhões de anos. Habitam praticamente todos os ecossistemas terrestres, desde desertos até florestas tropicais, com exceção de regiões glaciais. São pertencentes ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida e ordem Scorpiones. Existem aproximadamente 2.100 espécies desses animais no mundo, sendo 160 delas espalhadas pelo território brasileiro, destas, a família Buthidae chama a atenção por apresentar representantes do gênero *Tityus* que são de importância médica, ou seja, capazes de provocarem acidentes cujo desfecho pode ser representado por efeitos locais, sistêmicos, e ocasionalmente óbito, principalmente em crianças. (COSTA et.al., 2016; LOURENÇO, 2018).

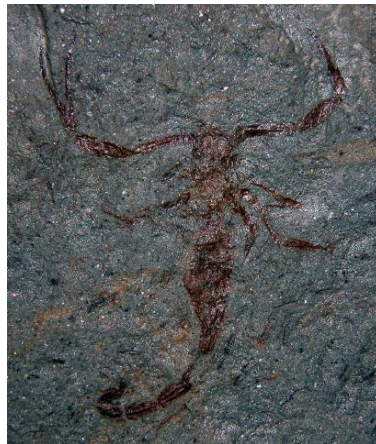


Figura 1: Registro fóssil de escorpião (*Protobuthus elegans*) há 250 milhões de anos. (LOURENÇO, 2018)

A rica escorpiofauna brasileira é composta por aproximadamente 23 gêneros e 4 famílias. Existem quatro espécies reconhecidas por provocarem acidentes clinicamente importantes: *Tityus serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus* e *T. obscurus*. O *Tityus serrulatus* (LUTZ & MELLO, 1922) possui uma das peçonhas mais potentes do mundo, medindo até 7 cm de comprimento, apresenta coloração amarelo-clara nas pernas e cauda e marrom escuro no tronco, por isso, é popularmente conhecido como escorpião amarelo; a denominação da espécie ocorre devido a presença de uma serrilha nos segmentos distais da cauda. O *Tityus bahiensis* (PERTY, 1933), também conhecido como escorpião marrom, possui

coloração marrom escura no tronco, apêndices com manchas escuras e cauda marrom-avermelhado. Não possui serrilha na cauda e também pode chegar até 7 cm de comprimento. O *T. stigmurus* (THORELL, 1877), também conhecido como escorpião amarelo do Nordeste, possui uma faixa escura longitudinal dorsal. Por fim, o *T. obscurus* (GERVAIS, 1843) ou escorpião preto da Amazônia, possui coloração escura quando adulto, podendo alcançar até 9 cm (BRASIL, 2009).

Dependendo da região do país, a espécie de escorpião predominante pode mudar, por exemplo, o *T. stigmurus* é predominante na região Nordeste, onde se apresenta como o principal causador de acidentes (LIRA-DASILVA et al., 2000; BARBOSA et al., 2003), enquanto que em São Paulo, o *T. bahiensis* é o prevalente (RIBEIRO; RODRIGUES; JORGE, 2001). Outros gêneros como *Bothriurus*, *Isometrus* e *Rhopalurus* também estão presentes no Brasil, porém, devido ao fato de suas peçonhas serem de baixa toxicidade eles são considerados de baixo interesse toxicológico (PUCCA et al., 2014).



Figura 2: *Tityus serrulatus* (BRASIL, 2009)



Figura 3: *Tityus bahiensis* (BRASIL, 2009)



Figura 4: *Tityus stigmurus* (BRASIL, 2009)

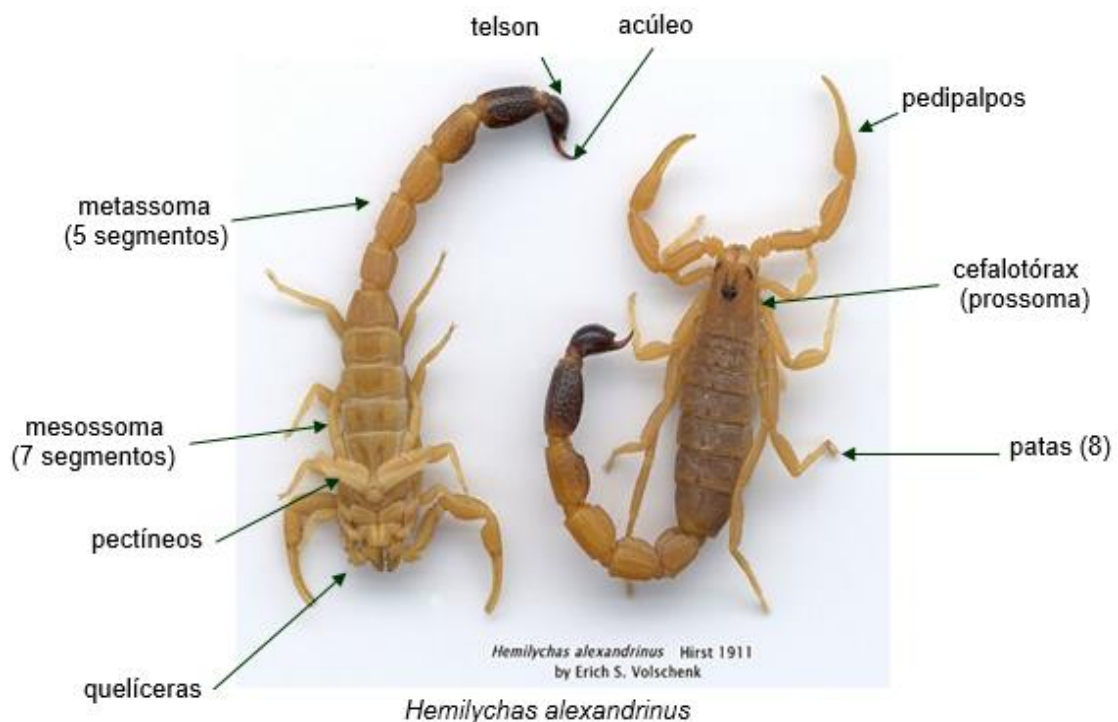


Figura 5: *Tityus obscurus* (BRASIL, 2009)

1.1 ANATOMIA E MORFOLOGIA DO ESCORPIÃO

Todos os artrópodes apresentam corpo segmentado, e a união de vários segmentos que determinam uma região corpórea específica é chamada de tagma. O comprimento do corpo do escorpião depende da espécie, mas em geral, os que vivem no território brasileiro possuem de 6 a 7 cm, sendo anatomicamente dividido em duas tagmas: cefalotórax (prossoma) e abdômen (mesossoma e metassoma) (figura 6). O prossoma é a carapaça onde está inserido um par de quelíceras (usado para triturar o alimento), um par de pedipalpos (pinças) e quatro pares de apêndices locomotores. O mesossoma é a parte do abdômen que apresenta espiráculos respiratórios e reprodutores, bem como apêndices sensoriais. Por último, o metassoma, é representado pela cauda que apresenta em sua extremidade um segmento modificado chamado télson contendo um par de glândulas produtoras de peçonha que desembocam em um aguilhão inoculador. (BRASIL, 2009; BRUSCA & BRUSCA, 2007).

Figura 6: Morfologia do escorpião.



Adaptado de: *The spiral burrow library*¹

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

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO ESCORPIONISMO NO BRASIL

Acidentes por escorpiões (escorpionismo) representam um problema de saúde pública negligenciado em diversos países (CHIPPAUX e GOYFFON, 2008). No Brasil, as espécies que são de interesse clínico estão majoritariamente contidas na família Buthidae e gênero *Tityus*, sendo o *Tityus serrulatus* considerada a espécie mais nociva por ser o principal envolvido na ocorrência de acidentes graves e fatais (PUCCA et al., 2014). Segundo dados fornecidos pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN), dentre os anos de 2007 e 2017, houve um aumento anual do número de acidentes por escorpião que foi maior quando comparado as médias de acidentes com aranha e serpentes (aproximadamente 13,4% para escorpionismo; 6,4% para araneísmo; 2,5% para ofidismo – dados coletados do SINAN em fevereiro/2020), além disso, vale salientar que em grupos mais vulneráveis, como em crianças/adolescentes de 1 a 14 anos, o número de acidentes representa cerca de 18% do número total de casos (BRASIL, 2019), o que deve ser visto como sinal de alerta, uma vez que nessa faixa etária, a chance de evolução para envenenamento moderado a severo é acentuada, quando comparada a indivíduos de maior idade (BRASIL, 2019). O aumento do número de acidentes pode ser explicado por fatores como o aumento do número de notificações compulsórias; o hábito sinantrópico dos escorpiões, caracterizado pela adaptação desses animais ao convívio humano; o rápido processo de urbanização; e a falta de cuidados domésticos. Já não bastasse isso, algumas espécies como o *T. serrulatus* são partenogenéticas, ou seja, a geração da prole é independente de acasalamento, favorecendo sua reprodução (PUCCA et al., 2015; RECKZIEGEL E PINTO, 2014). O escorpionismo deveria ser um constante objeto de ação pública, objetivando principalmente o fornecimento de informação e o estímulo a mudanças comportamentais (SANTOS et al., 2016). As medidas de controle da presença do escorpião são baseadas na remoção/coleta e modificação das condições ambientais para torná-las desfavoráveis à proliferação desses aracnídeos (TORREZ, 2019).

Nos anos de 2013 e 2014, o número de acidentes foi maior do que os provocados por serpentes, aranhas e abelhas somados (PUCCA et al., 2015), o que permenece desde então nos anos subsequentes. Ademais, ao longo dos anos, todas as regiões do território brasileiro vem apresentando aumento constante no número de casos de escorpionismo. Na região Sul do Brasil, por exemplo, o Paraná

é o maior contribuinte no número de acidentes. Minas Gerais e São Paulo juntos totalizam aproximadamente 50% das ocorrências de escorpionismo. Já a região Norte e Nordeste do Brasil vêm apresentando aumento importante nos relatos de acidentes (RECKZIEGEL e PINTO, 2014).

1.3 COMPOSIÇÃO E AÇÃO DA PEÇONHA ESCORPIÔNICA

Ao longo dos mais de 400 milhões de anos de evolução, os escorpiões desenvolveram peçonhas capazes de exercer atividades tóxicas em uma grande variedade de animais. Essa diversidade de toxinas foi potencializada a partir das lentas taxas de migração e estruturas divergentes de populações combinadas a sua longa história geológica (SUNAGAR, et al., 2013). A peçonha escorpiônica é composta por uma gama de substâncias como muco, sais inorgânicos, lipídeos, aminas, inibidores de calicreína e proteínas de baixo peso molecular (PUCCA et al., 2015). Diferentemente de algumas peçonhas de serpentes, que são ricas em toxinas enzimáticas, peçonhas de escorpião são dominados por neurotoxinas peptídicas com pontes de dissulfeto, representadas pelas proteínas de baixo peso molecular. (SUNAGAR et al., 2013).

A bioatividade das neurotoxinas também exhibe um alto grau de especificidade da vítima: algumas atuam especificamente em insetos, outras apenas em crustáceos e ainda há outras que atuam em mamíferos. Os principais alvos moleculares das neurotoxinas são os canais de sódio dependentes de voltagem, por isso, irão atuar principalmente em células excitáveis como neurônios e fibras musculares. Outras neurotoxinas atuam em canais de potássio dependentes de voltagem, de cálcio e de cloro, mas parecem ser menos importantes para o desencadamento dos efeitos patológicos no envenenamento humano (GWEE et al., 2002 e SUNUGAR et al., 2013). Quanto as neurotoxinas que atuam em canais de sódio, elas são agrupadas em neurotoxinas anti-insetos e anti-mamíferos, sendo que as específicas para mamíferos podem ser de dois tipos: α e β neurotoxinas. (ZHIJIAN et al., 2005).

As α -neurotoxinas não afetam a ativação dos canais de sódio, mas modulam o canal retardando sua rápida inativação, provocando prolongamento da despolarização e, conseqüentemente, da ativação neuronal. Já as β -neurotoxinas irão modular os canais de sódio permitindo com que sua ativação ocorra de maneira

mais facilitada, a partir da redução do limiar de ativação por voltagem do canal (GWEE et al., 2002 e ZIJHIAN et al., 2005). Quanto às neurotoxinas que modulam os canais de potássio, são caracterizadas como bloqueadoras, impedindo a condução de íons por oclusão do canal, sem afetar sua cinética de ativação, provocando prolongamento do potencial de ação. As neurotoxinas, portanto, medeiam ações sinérgicas que provocam intensa e duradoura despolarização de nervos autonômicos (tanto da divisão simpática quanto da parassimpática) tendo como consequência a liberação exacerbada de neurotransmissores, em especial catecolaminas, que são responsáveis por grande parte da sintomatologia dos acidentes (GWEE et al., 2002; SUNUGAR et al., 2013; DINIZ et al., 1974; FREIRE-MAIA., 1995; SILVEIRA et al., 1991). Apesar das neurotoxinas ganharem lugar de destaque na maioria dos estudos envolvendo peçonha de escorpiões, ainda são descritas toxinas com características de metaloproteases, serino proteases, hialuronidases, fosfolipases, peptídeos antimicrobianos, hipotensinas e potenciadores de bradicinina (PESSINI et al., 2001; ALVARENGA et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2015; DIEGO-GARCÍA; MILLE et al., 2014; NADERISOORKI et al., 2016).

Com o advento de novas metodologias que permitiram o avanço no estudo e caracterização de substâncias isoladas da peçonha, os esforços para a descoberta de componentes ativos bem como o desenvolvimento de similares sintéticos com finalidade farmacológica vêm se expandindo intensamente, destes se incluem componentes com atividade antimicrobiana, antimalárica, antitumoral e imunossupressores (POSSANI et al., 2014). Nesse contexto, a busca da compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e inflamatórios acerca do envenenamento escorpiónico deixou de ser entendida como prioridade, sobretudo após o desenvolvimento da soroterapia anti-peçonha.

Desde 1980, a terapia vigente para o tratamento de manifestações sistêmicas decorrentes do escorpionismo tem sido baseada em três abordagens: tratamento sintomático, suporte de condições vitais e soroterapia anti-peçonha (CUPO, 2015). Apesar do sucesso inquestionável da última abordagem, muitos pesquisadores ainda contestam sua eficácia para prevenir as manifestações cardiovasculares e até mesmo o óbito em quadros severos. Isso pode estar atrelado ao fato de que, por mais que o antiveneno seja capaz de neutralizar a peçonha circulante bem como a peçonha que ainda está sendo absorvida no local da picada,

reduzindo a liberação de mediadores responsáveis pela sintomatologia, a terapia não possui qualquer efeito sobre os sistemas que já sofreram ação das toxinas (CUPO, 2015)

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. O esclarecimento desses mecanismos é imprescindível para o advento de novas drogas para alvos farmacológicos mais bem direcionados bem como para explicar os efeitos terapêuticos de drogas já vigentes de forma mais atualizada.

1.4 FARMACOCINÉTICA DA PEÇONHA E QUADRO CLÍNICO DO ESCORPIONISMO

Estudos envolvendo envenenamento experimental demonstraram que a peçonha de *T. serrulatus* possui rápida absorção e distribuição após injeção subcutânea em ratos. Com apenas 5 minutos após a inoculação, já é possível detectar uma elevada concentração de antígenos da peçonha no plasma sanguíneo, tendo seu pico máximo de concentração em 60 minutos. A peçonha distribui-se amplamente, sendo detectada nos rins, pulmões, coração e fígado. Além disso, sua taxa de eliminação e redistribuição ocorre vagarosamente, o que revela uma alta afinidade da peçonha pelos tecidos (SANTANA et al., 1996). Por isso, o envenenamento por escorpião deve ser interpretado como situação de alerta, uma vez que os sintomas podem evoluir rapidamente, sendo que, a cada uma hora de atraso ao primeiro cuidado médico, há um aumento de 9% na probabilidade de evolução para óbito (CAMPOLINA et al., 2008).

A classificação clínica é atualmente baseada em um consenso internacional a respeito da história natural dos acidentes por escorpião e seus sinais clínicos e sintomas, desenvolvido por Khattabi et al (2011). Os casos de escorpionismo foram classificados em: picada seca (ausência de inoculação da peçonha) quando as vítimas não apresentam qualquer tipo de alteração; classe I quando apresentam sintomas locais (acidente leve); classe II quando apresentam alterações sistêmicas somadas as alterações locais (acidente moderado); e classe III quando os eventos evoluem para manifestações sistêmicas de alta intensidade, até o óbito (acidente severo). Dentre as alterações locais se destacam sudorese,

eritema, edema e principalmente dor, que pode irradiar para todo o membro e persistir por dias. Em acidentes moderados ocorrem manifestações sistêmicas de pouca intensidade como náuseas, salivação e lacrimação, podendo ocorrer desidratação, prostração, agitação, hipertensão ou hipotensão arterial, hiperglicemia, midríase, piloereção e taquicardia. Por fim, a sintomatologia em acidentes graves inclui sinais de insuficiência cardíaca, respiratória e neurológica; como insuficiência ventricular esquerda, edema pulmonar, e coma. Vale salientar ainda, que devido a liberação exacerbada de neurotransmissores antagônicos como catecolaminas e acetilcolina induzida pelas neurotoxinas da peçonha, não é raro observar pacientes envenenados apresentarem oscilações bruscas de intensidade na sintomatologia, que ocorre devido a ativação irregular de nervos do sistema autônomo simpático ou parassimpático (BUCARETCHI et al., 1995; BUCARETCHI et al., 2014; CUPO, 2015; FREIRE-MAIA et al., 1978; REZENDE et al., 1998)

Exames complementares de sangue e urina podem ser realizados em pacientes que apresentam um quadro clínico moderado ou grave, sendo que na maioria dos casos há resolução completa das alterações dentro da primeira semana. As primeiras modificações observadas no sangue são hiperglicemia, leucocitose e hipopotassemia. O aumento da amilase também está presente na maioria dos casos. Quando há envolvimento do sistema cardiovascular, o dano gerado pelas toxinas provoca aumento de enzimas cardíacas, como a fosfocreatina quinase (CK-MB), bem como da lactato desidrogenase (LDH), além de desordem no equilíbrio ácido base, provavelmente devido ao acometimento de canais iônicos de potássio, cálcio e cloro associado a ventilação pulmonar comprometida (CUPO, 2015; MAGALHÃES et al., 2000).

Grande parte dos óbitos provocados pelo escorpionismo ocorrem às custas do edema pulmonar, e no Brasil estão quase sempre relacionados a acidentes por *Tityus serrulatus*, por isso, a maioria das pesquisas envolvendo envenenamento experimental ou isolamento de frações proteicas, visando interesse farmacológico, são com a peçonha de *T. serrulatus*. Inusitadamente, em alguns estados, como ocorre em São Paulo, o *T. bahiensis* é o maior causador de acidentes, mesmo assim, estudos com peçonhas de outras espécies de escorpiões de nossa escorpiofauna são quase que inexistentes (BUCARETCHI et al., 1995; PUCCA et al., 2014; REZENDE et al., 1998).

1.5 LESÃO PULMONAR AGUDA E INFLAMAÇÃO

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma patologia multifatorial e é considerada uma ameaça à vida; fisiopatologicamente é caracterizada por aumento da permeabilidade da microvasculatura pulmonar em resposta a processos inflamatórios, gerando edema bilateral e morte de células epiteliais (CAPELOZZI, 2008). A síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) nada mais é do que a forma mais grave da LPA. A LPA/SARA pode ser desencadeada a partir de agressões diretas às células dos pulmões, como ocorre em resposta a infecções bacterianas, traumas ou a agentes tóxicos, ou pode ser secundária a alterações inflamatórias sistêmicas, como por exemplo, na sepse (REISS et al., 2012 e CAPELOZZI, 2008). Inicialmente, a LPA/SARA é caracterizada por um intenso processo inflamatório local, com infiltração de leucócitos e produção de mediadores solúveis em resposta a ativação de células como macrófagos residentes e células endoteliais (figura 7) (REISS et al., 2011). As alterações fisiopatológicas do sistema respiratório encontradas em pacientes que sofreram escorpionismo severo são semelhantes a alterações encontradas em pacientes com LPA/SARA, associado a isso, a peçonha de escorpião é reconhecidamente inflamatória, portanto, acredita-se que a lesão pulmonar decorrente de escorpionismo severo possa estar atrelado ao desenvolvimento de LPA/SARA.

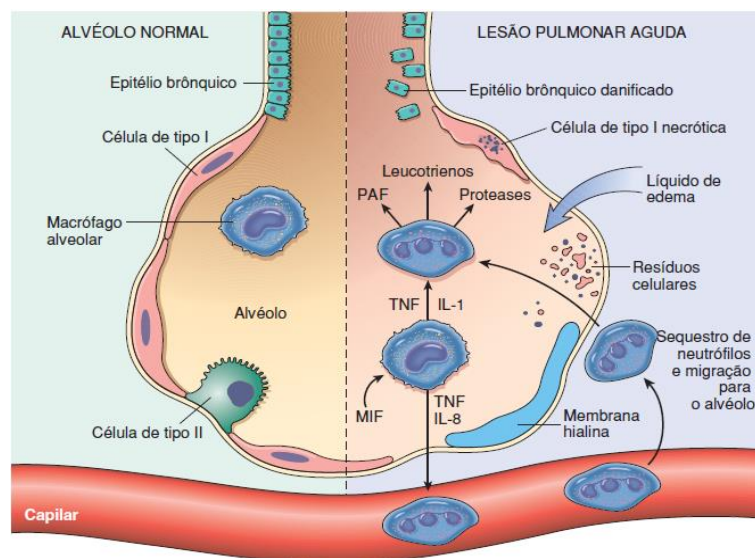


Figura 7: Fisiopatologia da LPA. Alvéolo normal (a esquerda) e alvéolo lesado na fase inicial da LPA (a direita).

Retirado de: Robbins e Cotran, 2016

Dentre as complicações sistêmicas decorrentes do escorpionismo severo, o edema pulmonar, caracterizado pelo acúmulo de líquido no interstício pulmonar, chama a atenção e deve ser entendido como sinal de emergência. Assume-se que o edema pulmonar pode apresentar duas etiologias distintas: uma de caráter cardiogênico e outra de caráter não-cardiogênico (WARE e MATTHAY, 2005). Quando se trata da etiologia cardiogênica, dois fatores devem ser levados em consideração. Primeiramente, devido a estimulação prolongada das terminações nervosas pós-ganglionares e das adrenais, há uma liberação massiva de catecolaminas, que culmina no aumento da pressão diastólica atrial e ventricular esquerda, gerando um aumento na pressão sanguínea das veias pulmonares, produzindo aumento da pressão hidrostática nas vênulas pós-capilares que perfundem o tecido pulmonar. O produto final dessa cascata de eventos é o aumento do extravasamento de plasma para o espaço alveolar, caracterizando o edema (WARE e MATTHAY, 2005; GEHLBACH e GEPPERT, 2004). Em segundo lugar, não deve ser descartada a possibilidade de ação direta das toxinas sobre o miocárdio, provocando uma condição conhecida como “miocardite escorpiônica”, caracterizada pela alteração da permeabilidade da membrana, bem como das propriedades elétricas das células do miocárdio (BAHLOUL et al., 2013).

Quanto a etiologia não-cardiogênica, assume-se que o edema é resultado do aumento da permeabilidade vascular na microvasculatura pulmonar em resposta a agressões diretas nas células pulmonares, levando ao extravasamento de fluido rico em proteínas que, em teoria, se inicia no interstício pulmonar e evolui paulatinamente para o espaço alveolar, porém, como o epitélio alveolar é frequentemente injuriado nessas condições, o inundamento do espaço alveolar pode ser considerado um evento precoce; vale salientar ainda que no edema não-cardiogênico também há aumento da pressão hidrostática vascular e elevado fluxo linfático (WARE e MATTHAY, 2005; MURRAY, 2011). Os fenômenos relacionados à fisiopatologia do edema não-cardiogênico já foram identificados em vítimas fatais do *T. serrulatus* (AMARAL et al., 1994) e experimentalmente (FREIRE-MAIA e MATOS 1993; COELHO et al., 2007; ZOCCAL et al., 2016). Ao longo dos últimos anos, diversos estudos têm mostrado cada vez mais a participação e até mesmo a dependência de mediadores inflamatórios no desenvolvimento do edema pulmonar de etiologia não-cardiogênica (BAHLOUL et al., 2013; WARE e MATTHAY, 2005; D'SUZE et al., 1999, DE MATOS et al., 1997).

Acredita-se que a LPA/SARA se desenvolve a partir da ação direta das toxinas da peçonha sobre células endoteliais e macrófagos residentes do pulmão, disparando vias de sinalização pró-inflamatórias que induzem a expressão de genes relacionados a citocinas como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10; TNF, IFN- γ e quimiocinas. De fato, diversos estudos com animais demonstraram o aumento sérico de citocinas pró-inflamatórias em consequência do envenenamento experimental pela peçonha de *T. serrulatus* (PETRICEVICH; PEÑA 2002; PESSINI et al., 2003; FIALHO et al., 2011); recentemente demonstramos que no pulmão de ratos envenenados pela pTs há aumento da produção de IL-1 β e IL-6 (MIYAMOTO et al., 2018).

Adicionalmente, a produção de mediadores inflamatórios na LPA/SARA observada no escorpionismo, a exemplo do que é encontrado em outros modelos de LPA/SARA, pode ser levada a cabo por outras células, como as epiteliais. Nesse sentido, foi demonstrado que a peçonha do *T. serrulatus* desencadeia rapidamente a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-8 por células epiteliais de bronquíolo humano (RIGONI et al., 2016).

A produção de citocinas pró-inflamatórias gera duas principais consequências que podem estar associadas ao desenvolvimento da lesão pulmonar aguda: primeiro, elas estimulam a ativação endotelial promovendo a produção de quimiocinas e de moléculas de adesão (selectinas e superfamília das imunoglobulinas), permitindo a diapedese de leucócitos circulantes; segundo, a própria ativação de neutrófilos, conduzindo-os para o espaço intersticial pulmonar onde podem produzir substâncias lesivas, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio bem como liberação de grânulos contendo enzimas líticas como lisozima, collagenase e elastase. Vale salientar ainda que a cinética dos neutrófilos presentes no leito capilar pulmonar difere dos demais tecidos. No pulmão há uma grande quantidade de neutrófilos já aderidos à superfície endotelial, o denominado “pool marginal”, potencializando os efeitos lesivos (KUEBLER, 2005; ROBBINS e COTRAN, 2016; MORAES; ZURAWSKA; DOWNEY, 2006).

Outros mediadores inflamatórios, como os eicosanoides, também ganham destaque na fisiopatologia da lesão pulmonar aguda causada pela peçonha de escorpião. Estudos pioneiros com ratos concluíram que o edema pulmonar provocado pela peçonha de *T. serrulatus* se dá em parte pela liberação de fatores inflamatórios que alteram a permeabilidade vascular, tais como prostaglandinas,

leucotrienos e o fator ativador plaquetário (PAF) (DE MATOS et al., 1997). Já foi demonstrado que macrófagos murinos estimulados pela peçonha de *T. serrulatus* foram capazes de produzir corpúsculos lipídicos, que nada mais são do que vesículas intracelulares contendo precursores da formação de eicosanoides (ZOCCAL et al., 2015). Além disso, estudos mais recentes realizados com animais submetidos ao envenenamento mostraram que o desenvolvimento da LPA parece depender do balanço entre a produção de prostaglandinas e leucotrienos, sendo a maior produção de prostaglandinas associada com o aumento da taxa de mortalidade decorrente da formação de edema e, em contrapartida, a maior produção de leucotrienos relacionou-se com melhor prognóstico, gerando redução da resposta inflamatória pulmonar e do edema (ZOCCAL et al., 2018).

Recentemente, a partir de estudos com a peçonha de *T. serrulatus*, foi demonstrada a presença de padrões moleculares associados ao veneno (VAMPs) que podem se ligar aos receptores de reconhecimento de antígeno *toll-like* 2 e 4 (TLR2 e 4), ativando-os e disparando vias pró-inflamatórias que são orquestradas principalmente pelos fatores de transcrição NF- κ B dependente de Myd-88 e IRFs (ZOCCAL et al., 2014). O envolvimento do TLR4 também já foi investigado em animais submetidos ao envenenamento por *Androctonus australis hector* (um escorpião encontrado principalmente no norte da África), foi demonstrado que o bloqueio do TLR4 modulou positivamente as respostas inflamatória e oxidativa, reforçando uma possível ação direta da peçonha sobre o TLR4 (KHEMILY et al., 2019). Adicionalmente, estudos *in vitro* demonstraram que tanto macrófagos de cultura primária como os de cultura permanente, quando incubados com a peçonha de *T. serrulatus*, foram capazes de produzir citocinas como TNF e IL-6 (PETRICEVICH, 2002; ZOCCAL et al., 2011).

1.6 ÓXIDO NÍTRICO E ESCORPIONISMO

O óxido nítrico (NO) foi descoberto em 1980 quando Furchgott e Zawadzki identificaram um mediador responsável pela vasodilatação induzida pela acetilcolina em preparações *in vitro* de vasos sanguíneos, inicialmente chamado de fator relaxante derivado do endotélio, apenas em 1987 foi identificado como o NO (IGNARRO et al., 1987 PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987; PALMER et al., 1988). Desde sua descoberta, o NO têm sido um mediador de grande interesse no

meio científico bem como no desenvolvimento farmacológico de drogas. O NO é uma molécula gasosa sinalizadora responsável pela regulação de diversos processos fisiológicos, sendo que nos mamíferos, atua principalmente como um agente relaxante vascular e inibidor da agregação plaquetária (KORHONEM et al., 2005; COLEMAN, 2001). O precursor para a síntese de NO é a L-arginina, que é oxidada enzimaticamente por um conjunto de sintases (NOS), gerando como produtos finais o NO e a L-citrulina. Três diferentes isoformas de NO sintase já foram caracterizadas: as isoformas neuronal (nNOS ou NOS1) e endotelial (eNOS ou NOS3), que são expressas de maneira constitutiva por neurônios e células endoteliais, respectivamente; e a induzível (iNOS ou NOS2), presente em vários tipos celulares porém sendo expressa somente a partir de estimulação inflamatória, como indução por citocinas ou produtos microbianos (GUZIK et al., 2003).

Quando se trata de resposta imunológica, o NO pode atuar de várias maneiras: como agente tóxico contra micro-organismos infecciosos; como indutor ou supressor de apoptose; ou como imunoregulador, sendo que nesse contexto, a iNOS é provavelmente a mais importante, uma vez que sua ativação está relacionada a uma grande produção de NO de maneira continuada, enquanto que o NO produzido pelas isoformas constitutivas possui ação curta e direta (GUZIK et al., 2003). Sua atividade antimicrobiana se dá a partir da produção de espécies reativas de nitrogênio através da iNOS, sendo o próprio NO capaz de interagir com outras espécies reativas como superóxido ou peróxido de hidrogênio para formar radicais de peroxinitrito altamente reativos que provocam oxidação de fosfolípidos e de proteínas microbianas. Em contrapartida, as espécies reativas de nitrogênio quando produzidas em grande quantidade acabam por lesionar o tecido próprio, contribuindo para a propagação da resposta inflamatória (GUZIK et al., 2003; COLEMAN, 2001)

Dentre as funções do NO como um agente regulador da resposta inflamatória, algumas merecem destaque. Primeiramente, o NO parece inibir a ativação dependente de IgE em mastócitos, impedindo a liberação de grânulos contendo importantes vasoativos como a histamina (MCCAULEY et al., 2005; EASTMOND e COLEMAN, 1997). Em segundo lugar, o NO possui participação ativa na regulação da diapedese de leucócitos, em especial dos neutrófilos, que representam cerca de 60-70% dos leucócitos periféricos e são os primeiros a chegarem no sítio da lesão/infecção. Já foi demonstrado em modelos experimentais *in vivo* que a inibição da produção de NO produziu aumento do recrutamento de

neutrófilos para o sítio de inflamação, por isso, o NO parece ser importante na *down-regulação* da diapedese dessas células (SECCO et al., 2004; SAINI e SINGHI, 2018). Adicionalmente, a inibição do NO foi associada com o aumento da expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-1, E-,P- e L-selectinas bem como o aumento da expressão do receptor de quimiocinas CXCR2 (LEFER e LEFER, 1996; SPEACKER et al., 1998; GAUTHIER et al., 1994; RIOS-SANTOS et al., 2007).

O NO parece ter participação na fisiopatologia do escorpionismo experimental, já foi demonstrado aumento sérico de NO em camundongos envenenados pela pTs e pela peçonha de *Androctonus australis hector*, bem como sua produção por macrófagos murinos estimulados pela pTs (PETRICEVICH e PEÑA, 2002; PETRICEVICH, 2002; SAIDI et al., 2018). Além disso, a inibição da síntese de NO, através do pré-tratamento com L-NAME, potencializou a formação de edema de pata provocada pela injeção da peçonha de *T. serrulatus* em camundongos (SEVERINO et al., 2008), sendo este o único trabalho publicado envolvendo modulação farmacológica do NO no modelo de escorpionismo experimental.

Já é bem estabelecido na literatura que, em diversos modelos experimentais, a intensa resposta inflamatória que caracteriza a LPA/SARA está associada ao aumento da expressão e atividade da iNOS, levando ao aumento da produção de NO (RAZAVI et al., 2005; KOIZUMI et al., 2004; BARON et al., 2004); inclusive, aumento da produção de NO no lavado bronco-alveolar e até mesmo na respiração exalada de animais submetidos à LPA/SARA pela injeção intraperitoneal ou intratraqueal de lipopolissacarídeo (MEHTA et al., 1999; WEICKER et al., 2001; ZEGDI et al., 2002). Apesar disso, o papel do NO em diferentes modelos de LPA/SARA é controverso, por exemplo, foi evidenciado que a inibição não-seletiva da NOS promove redução do edema e extravasamento de proteínas em diversos modelos de LPA/SARA, porém, nos mesmos modelos, não houve redução da infiltração de neutrófilos para o sítio da injúria (MULLIGAN et al., 1991; SEEKAMP et al., 1993). A contradição desses dados sugerem que o NO, na verdade, pode prevenir ou contribuir para o desenvolvimento da LPA/SARA, dependendo de fatores como tipo de lesão, a concentração de NO produzida, as condições fisicoquímicas locais e talvez as fontes celulares exatas do NO (MEHTA, 2005).

1.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria dos estudos envolvendo escorpionismo experimental são com a peçonha de *T. serrulatus*, uma vez que é a principal espécie associada a ocorrência de acidentes severos em nosso país. Mesmo que o número total de acidentes em alguns estados brasileiros seja devido a outras espécies que não o *T. serrulatus*, estudos envolvendo outras peçonhas são escassos. Além disso, o NO, por ser um importante mediador inflamatório envolvido em processos vasculares e no recrutamento de células inflamatórias, pode estar envolvido no desenvolvimento do edema pulmonar por peçonha escorpiônica. Por isso, esse estudo buscou investigar a influência do óxido nítrico na LPA/SARA em ratos submetidos ao envenenamento por *T. serrulatus* e por *T. bahiensis*. Adicionalmente, a partir do melhor entendimento acerca dos mecanismos que envolvem a LPA/SARA induzida por peçonha escorpiônica, novos alvos farmacológicos poderão ser estudados para a proposição de um possível tratamento, associado ou não à soroterapia, para pacientes envenenados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do óxido nítrico na fisiopatologia da lesão pulmonar aguda induzida pela peçonha de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a participação do óxido nítrico na(o):

2.2.1 Aumento de permeabilidade vascular nas vias aéreas;

2.2.2 Hemorragia nas vias aéreas;

2.2.3 Edema pulmonar;

2.2.4 Mobilização de leucócitos para o espaço aéreo;

2.2.5 Produção de óxido nítrico no tecido pulmonar;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar (200 a 250 g) obtidos do biotério da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 5 animais a uma temperatura de 25°C, com ração e água *ad libitum* e em ciclo claro/escuro de 12 horas. Os grupos experimentais foram compostos por no mínimo 5 e no máximo 10 animais. O estudo engloba projetos aprovados pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (n° 16583.2013.29/ n° 9266.2019.23).

3.2 PEÇONHA ESCORPIÔNICA

As peçonhas de *T. serrulatus* (pTs) e *T. bahiensis* (pTb) 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% estéril apirogênica.

3.3 INDUÇÃO DO ESCORPIONISMO EXPERIMENTAL

O escorpionismo experimental foi desencadeado pela administração por via intravenosa (iv) da pTs na dose de 200 µg/kg (dose subletal), provocando acidente moderado a grave, com acometimento respiratório e baixa mortalidade. 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 pTb utilizamos também a dose de 200 µg/kg (iv), uma vez que nosso grupo já demonstrou a capacidade edematogênica dessa dose em modelo experimental (MIYAMOTO et al., 2018). Para avaliar o papel do óxido nítrico, foram utilizados animais que receberam como pré-tratamento ao envenenamento (30 minutos), o hidrocloreto de N^(ω)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não seletivo da enzima NOS, na dose de 10 mg/kg (iv), a qual foi capaz por de produzir alterações na permeabilidade vascular na pata de camundongos envenenados pela pTs (SEVERINO et al., 2009). Como grupos controles, foram utilizados animais pré-

tratados com NaCl isotônica apirogênica (NaCl) ou L-NAME, seguido de uma nova injeção de NaCl 30 minutos depois, mimetizando o envenenamento.

3.4 AVALIAÇÃO DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR NAS VIAS AÉREAS

O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado após 30 minutos do envenenamento pelo extravasamento do corante azul de Evans (aE - Sigma). O corante diluído em NaCl isotônica apirogênica foi administrado iv (25 mg/kg) em conjunto com as peçonhas. Após 30 minutos os animais foram eutanasiados 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 inserida em uma curva padrão do corante previamente estabelecida e os valores obtidos expressos como µg de aE/g de peso seco de tecido.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para dosagem de proteínas, 1 e 4 horas após a administração das peçonhas foram seguidos os procedimentos de morte e perfusão como descrito acima, logo após foi realizado o lavado bronco-alveolar (LBA) com 5 mL de NaCl 0,9% por uma cânula inserida na traquéia. O volume recolhido foi centrifugado a 156 g à 4°C por 10 minutos e a concentração de proteínas determinada pelo método colorimétrico de Lowry (LOWRY et al., 1951) com filtro de 660 nm. Os resultados foram obtidos utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina e representadas como mg/mL.

Adicionalmente, as amostras de LBA (3 µL) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), 12,5%, a 120 V e 80 mA para o

gel de empacotamento, e 120 V e 150 mA para o gel de separação. Para obtenção das amostras, foram recolhidos 200 uL de cinco amostras de lavado do mesmo grupo e reunidos em um único microtúbulo (pool).

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado por impregnação por prata. Brevemente, o gel foi disposto em solução fixadora contendo 50% metanol e 0,5% formaldeído durante 10 minutos sob agitação, em seguida, o gel fixado foi colocado em solução de etanol 30% por 5 minutos sob agitação, e após, em solução NaS_2O_3 (tiosulfato de sódio) 0,02% por 2 minutos, a solução contendo AgNO_3 (nitrato de prata) a 0,2% foi aplicada durante 5 minutos sob agitação e, por fim, a solução reveladora contendo Na_2CO_3 (carbonato de sódio) a 6% foi aplicada até o aparecimento das bandas, sendo que a reação foi interrompida pela aplicação de solução contendo metanol a 50%.

3.6 AVALIAÇÃO DA HEMORRAGIA NAS VIAS AÉREAS

A hemorragia foi avaliada utilizando a concentração de hemoglobina tecidual como índice, dosada pelo método colorimétrico da cianometahemoglobina. Após 60 minutos 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 16,100 g 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.

3.7 MOBILIZAÇÃO DE LEUCÓCITOS PARA OS PULMÕES

Passadas 4 horas após o envenenamento foi avaliada a migração de leucócitos aos pulmões. A quantidade indireta 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 brometo de hexadecil trimetil amônio (HTAB) 13,72

mM, pH 6,0, na proporção 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, 16,100 g, a 4°C. A dosagem por reação colorimétrica cinética foi realizada em placas de 96 poços contendo os 10 µL dos sobrenadantes das amostras e 200 µL da solução de reação (52,64 mM de dihidroclorato de O-dianisidina, 0,05% de H₂O₂ 30%, 90 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0 e 10 mL de H₂O 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 de NAG, 10 µL 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 µL de tampão citrato-fosfato 0,04M. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL 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 µL 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.

3.8 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO NOS PULMÕES

A produção de NO foi avaliada indiretamente pelos níveis de NO₃⁻ e NO₂⁻ através do método de Griess adaptado (SUN et al., 2003). As amostras de pulmão 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, 16,100 g, a 4°C. O sobrenadante (60 µL) foi submetido a duas etapas de desproteinização e centrifugação 18,800 g, com ZnSO₄ 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 CuSO₄ 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.

3.9 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

4.1 PERMEABILIDADE VASCULAR NAS VIAS AÉREAS

As peçonhas induziram em 30 minutos o extravasamento do aE, com exceção da traqueia dos animais que receberam a pTb, nos brônquios externos, internos e pulmão (figura 8). Não foi observado qualquer efeito do L-NAME nos animais envenenados com a pTb (figura 8A), enquanto que nos animais envenenados pela pTs, o pré-tratamento com L-NAME potencializou o extravasamento nos brônquios internos e pulmão (figura 8B).

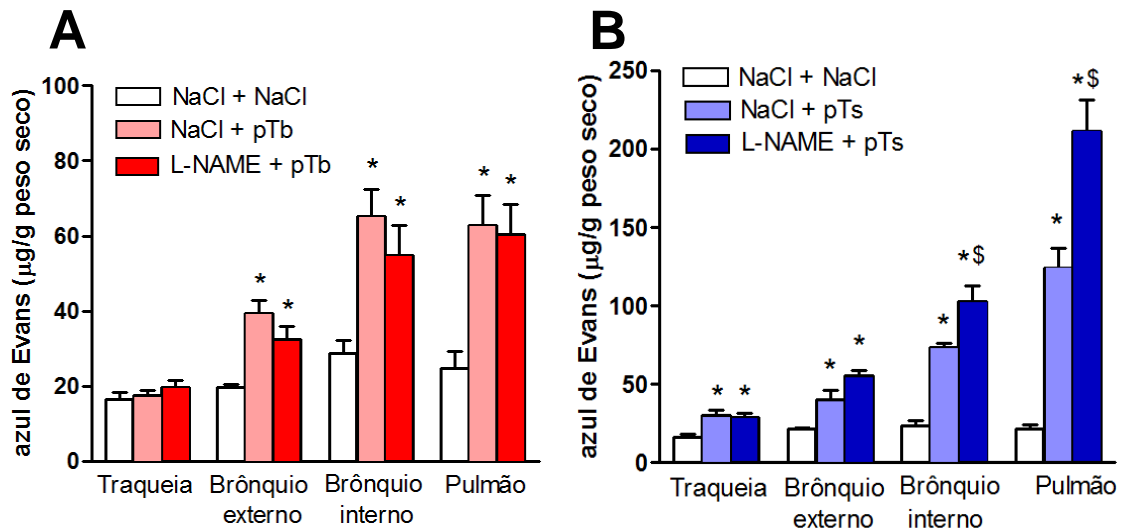


Figura 8 - Permeabilidade vascular nas vias aéreas 30 minutos após envenenamento pela peçonha de *T. bahiensis* (A) e *T. serrulatus* (B). 5 a 9 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado a NaCl + NaCl. § $p < 0,05$ comparado a NaCl + pTs.

4.2 HEMORRAGIA NAS VIAS AÉREAS

No envenenamento pela pTb, os níveis de hemoglobina se apresentaram aumentados apenas no brônquio interno e pulmão; após o pré-tratamento com L-NAME aumentaram os níveis de hemoglobina traqueia e no brônquio externo (figura 9A). Após 1 hora da administração da pTs os níveis de hemoglobina foram maiores no brônquio interno e no pulmão, sendo que o pré-tratamento com L-NAME atenuou esse efeito (figura 9B).

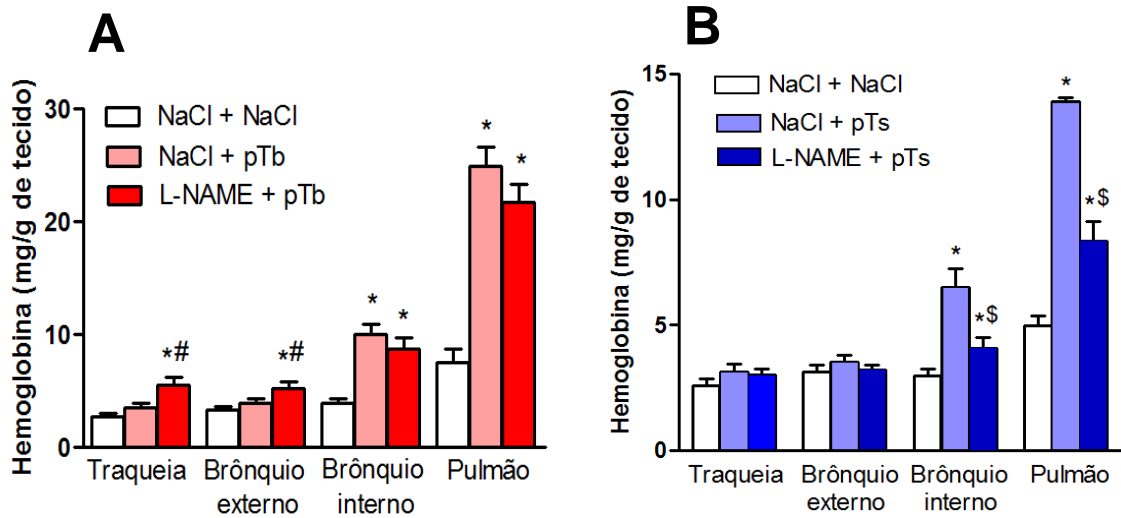


Figura 9 - Hemorragia nas vias aéreas 1 hora após envenenamento pela peçonha de *T. bahiensis* (A) e *T. serrulatus* (B). 5 a 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparada a NaCl + NaCl. \$ $p < 0,05$ comparada a NaCl + pTs. # $p < 0,05$ comparada a NaCl + pTb.

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. Após 4 horas, as peçonhas induziram o aumento da atividade da MPO, sendo esse efeito intensificado nos animais que receberam pré-tratamento com L-NAME (figura 10A e 10B). A atividade da NAG foi aumentada somente para os grupos que receberam a administração de L-NAME e foram envenenados após 30 minutos (figura 10C e 10D). Adicionalmente, o pré-tratamento com L-NAME e a posterior (30 minutos) injeção de NaCl (dilúente das peçonhas) não produziu qualquer tipo de efeito nos animais (dado não mostrado).

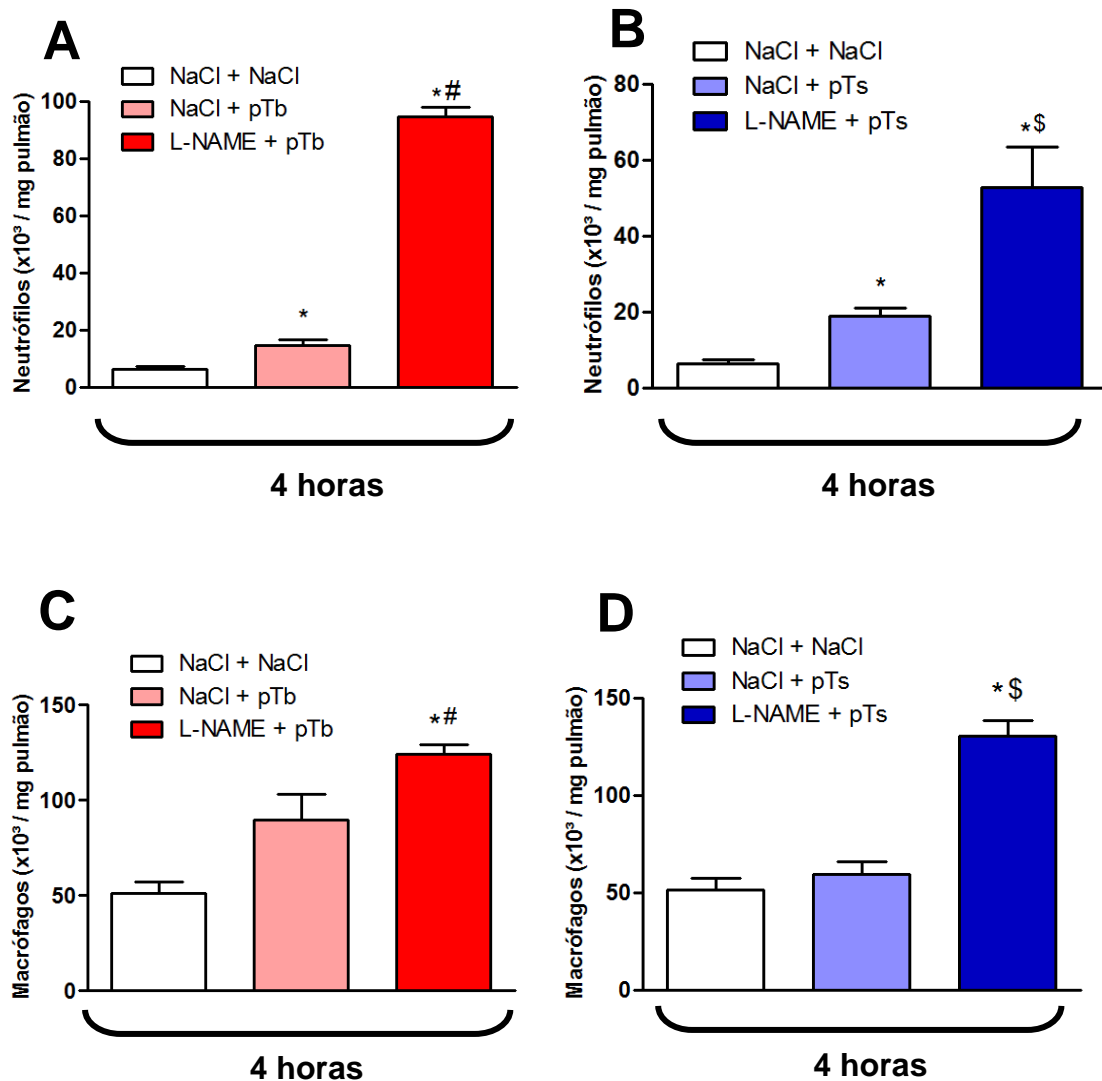


Figura 10 - Atividade da MPO (A e B) e NAG (C e D) em homogenatos pulmonares após envenenamento pela peçonha de *T. bahiensis* (A e C) e *T. serrulatus* (B e D) 5 a 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparada a NaCl + NaCl. \$ $p < 0,05$ comparada a NaCl + pTs. # $p < 0,05$ comparada a NaCl + pTb.

4.4 CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO TECIDO PULMONAR

Após 1 e 4 horas da administração das peçonhas as concentrações de NO_2^- como medida indireta da produção de NO foram mensurados no tecido pulmonar. Não detectamos produção de NO após 1 hora da administração das peçonhas bem como qualquer efeito da administração prévia do L-NAME (figura 11A e 11B), enquanto que 4 horas após o envenenamento, as peçonhas induziram a

produção de NO, efeito que foi amenizado pelo pré-tratamento com o L-NAME (figura 11C e 11D)

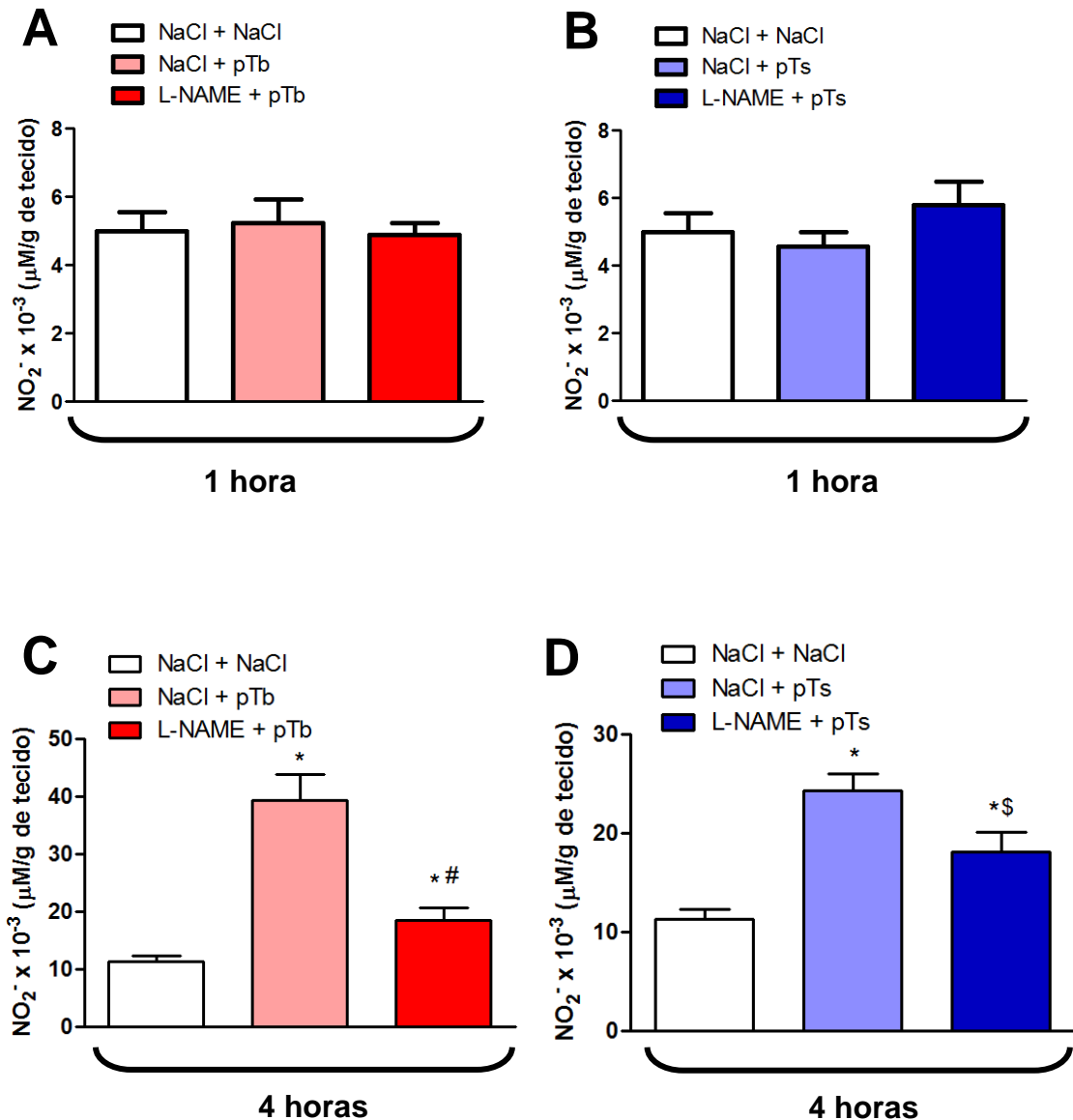


Figura 11 - Concentração de NO_2^- em homogenatos pulmonares 1 e 4 horas após envenenamento pela peçonha de *T. bahiensis* (A e C) e *T. serrulatus* (B e D). 5 a 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparada a NaCl + NaCl. \$ $p < 0,05$ comparada a NaCl + pTs. # $p < 0,05$ comparada a NaCl + pTb.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E SDS-PAGE

A concentração de proteínas totais no LBA aumentou tanto em animais que receberam a pTs quanto nos que receberam a pTb, efeito visto em ambos os tempos avaliados (1 e 4 horas) (figura 12). Enquanto o pré-tratamento

com L-NAME não teve efeito na primeira hora de envenenamento (figura 12A e 12B), potencializou o extravasamento proteico após a quarta hora para ambas as peçonhas (figura 12C e 12D). O pré-tratamento com L-NAME e a posterior (30 minutos) injeção de NaCl (diluyente das peçonhas) não produziu qualquer efeito nos animais (dado não mostrado). Esses resultados foram confirmados através da observação da densidade proteica dos LBAs em SDS-PAGE (figura 13).

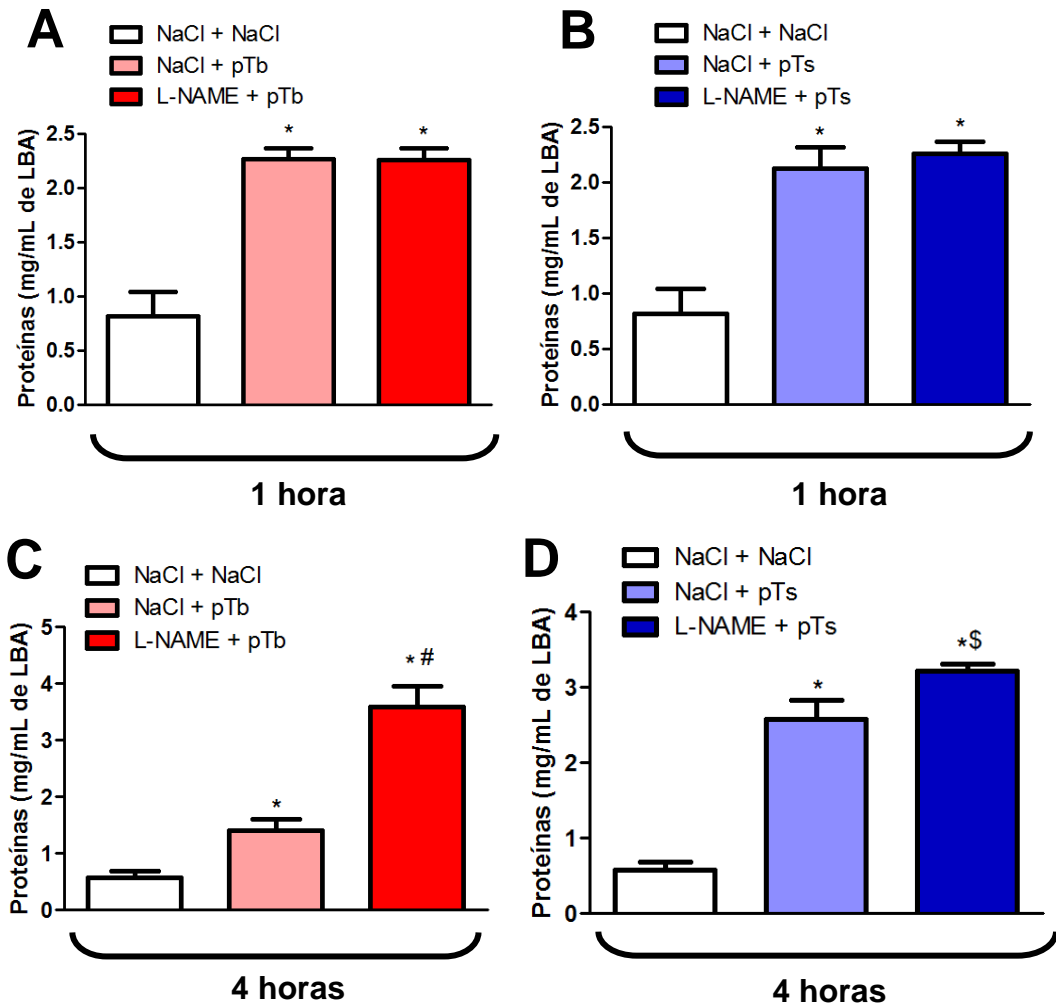


Figura 12: Quantificação de proteínas no LBA 1 e 4 horas após envenenamento pela peçonha de *T. bahiensis* (A e C) e *T. serrulatus* (B e D). 5 a 8 animais. * $p < 0,05$ comparada a NaCl + NaCl. \$ $p < 0,05$ comparada NaCl + pTs. # $p < 0,05$ comparada a NaCl + pTb.

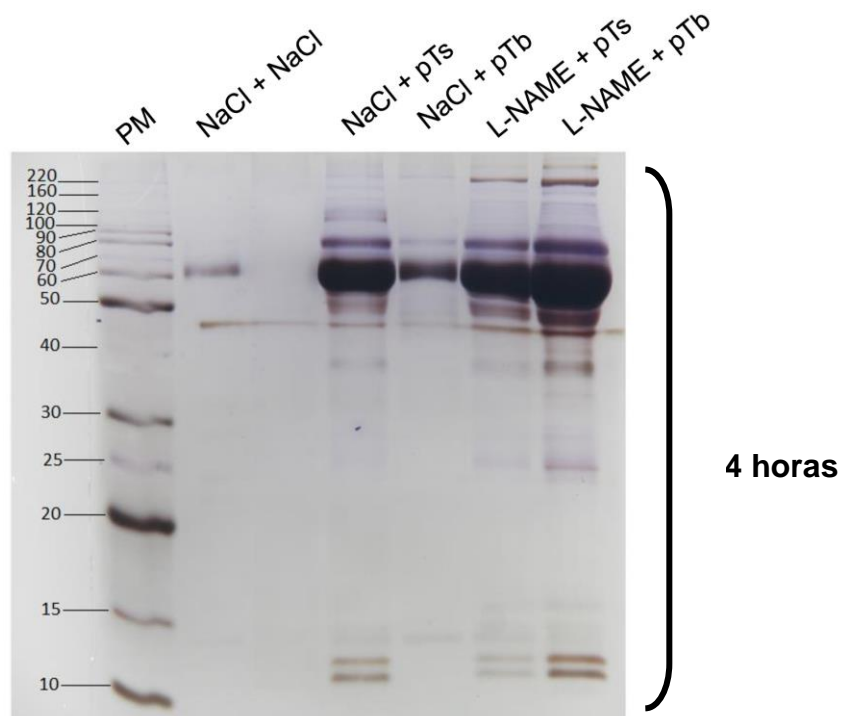
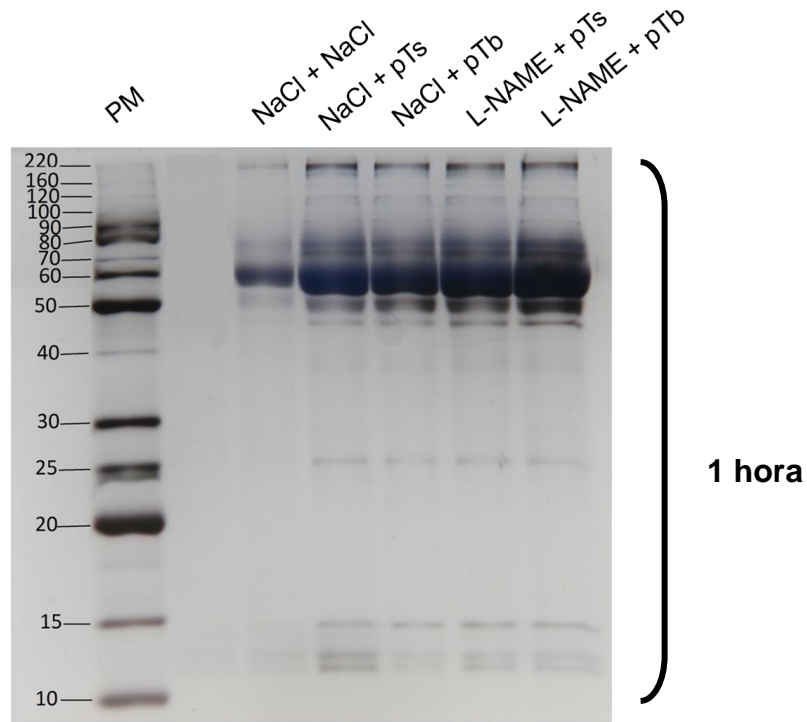


Figura 13: Densidade proteica em gel SDS-PAGE dos LBAs 1 e 4 horas após envenenamento pela peçonha de *T. bahiensis* e *T. serrulatus*. 5 a 8 animais (pool). PM: Padrão de peso molecular (kDa).

5 DISCUSSÃO

O escorpionismo representa um problema de saúde pública em diversos países, respondendo por grande número de acidentes com animais peçonhentos em muitos países subdesenvolvidos das regiões tropicais e subtropicais. A peçonha de escorpião induz sintomas clinicamente importantes, especialmente em crianças. Nessas, o envenenamento pode desencadear, com maior frequência do que em adultos, lesão pulmonar aguda (LPA), e resultar na morte do paciente. Nesse contexto, estudamos a participação do óxido nítrico, um mediador gasoso que regula diversos mecanismos homeostáticos bem como inflamatórios observados no trato respiratório de ratos envenenados pelas peçonhas do *T. serrulatus* e do *T. bahiensis*.

Como esperado, o efeito edematogênico da peçonha de *T. serrulatus* nas vias aéreas foi confirmado tanto para 30 minutos, diretamente nos tecidos avaliados, como em 1 e 4 horas após o envenenamento quando o acúmulo de proteínas já pode ser encontrado no lúmen das vias respiratórias. Esses resultados corroboram os achados pioneiros de Freire-Maia e Matos (1993) para o pulmão, e os posteriores de Zuliani et al. (2013) e Miyamoto et al (2018) para todo o aparelho respiratório; este último trabalho demonstrando que também a peçonha de *T. bahiensis* é edematogênica para o aparelho respiratório.

Nossos resultados demonstram que o pré-tratamento dos ratos com L-NAME exacerbou o aumento da permeabilidade vascular em 30 minutos induzido apenas pela pTs. Embora avaliado em outro tecido (na pata e em camundongos), foi demonstrado por Severino et al. (2009) que o uso da mesma concentração e do mesmo tempo de pré-tratamento de L-NAME também aumentou o extravasamento vascular induzido pela pTs, mas não pela pTb. Os resultados obtidos no presente estudo se apresentam de maneira semelhante com os dados publicados por Severino et al (2009). É importante notar que o PAF é sabidamente estimulador da produção de NO, através da ativação da isoforma constitutiva da NOS no endotélio (JEON et al., 2001; FILEP e FOLDES-FILEP 1993; RAMÍREZ et al., 1995), e este mediador lipídico participa do aumento da permeabilidade vascular no envenenamento de ratos por *T. serrulatus* logo aos 30 minutos (FREIRE-MAIA e DE MATOS, 1993; DE MATOS et al., 1997; MATOS et al., 1999). Severino et al (2009) também demonstraram que apenas no aumento da permeabilidade vascular

induzido pela pTs houve envolvimento do PAF em todos os tempos estudados incluindo os 30 minutos, o que não foi observado quando o envenenamento foi induzido pela pTb. Apesar dos animais envenenados pela pTs pré-tratados com L-NAME tenham apresentado extravasamento exacerbado de aE, não foi possível correlacionar esse dado com a detecção de nitrito (refletindo a produção de NO) no homogenato pulmonar, uma vez que não foi vista diferença entre os grupos 1 hora após o envenenamento por ambas as peçonhas. É plausível considerar que variações discretas na concentração de nitrito podem ter sido mascaradas pelo limite de detecção da metodologia de quantificação de nitrito utilizada, pela qual quantidades menores de 1 μM são indetectáveis.

Um fato relevante é que o aumento da concentração de nitrito no soro de camundongos submetidos a pTs foi observada logo na primeira hora de envenenamento, indicando uma precoce participação na fisiopatologia do envenenamento escorpiónico (PETRICEVICH e PEÑA, 2002). A partir disso, é possível especular que a inibição da síntese do NO através da administração prévia de L-NAME possa refletir em alterações precoces em parâmetros inflamatórios através da diminuição das concentrações de NO séricas, possivelmente pela inibição da eNOS. Acreditamos que a participação do NO sobre o extravasamento exacerbado de aE em animais envenenados pela pTs possa ser explicado através de dois fatores. Primeiramente, já é bem estabelecido que a inibição de NO acarreta em diminuição dos níveis intracelulares de GMP cíclico (GMPc) nas células endoteliais, culminando conseqüentemente em aumento da concentração intracelular de GTP (SURICHAMORN et al., 1990; STASI et al., 1992, KUROSE et al., 1993). Partindo do princípio que o GTP é um potente ativador da proteína fosfolipase A2 (MURAYAMA et al., 1990, KUROSE et al., 1993), é possível que a inibição da síntese de NO provoque o aumento da produção de mediadores lipídicos como o PAF, que é sabidamente um agente permeabilizador vascular, e que, como comentando anteriormente, parece ter participação primordial no edema de pata provocado pela pTs (SEVERINO et al., 2009). Um segundo fator pode se dar através da ação da inibição do NO sobre a contração de células endoteliais, também de maneira dependente da diminuição de GMPc. Já foi demonstrado que, em resposta a inibição de síntese de NO, expansão das junções entre as células endoteliais, promovendo aumento da permeabilidade da monocamada endotelial, possivelmente através de alterações no citoesqueleto dessas células (OLIVER, 1992; KUROSE et

al., 1993). De fato, Kurose et al. (1993) mostrou que o uso de faloidina, um estabilizador dos filamentos de actina do citoesqueleto das células, atenuou o extravasamento de plasma elicitado pela administração de L-NAME em vênulas pós-capilares de ratos.

Outro evento vascular avaliado aqui foi a hemorragia, refletida pelo extravasamento de hemácias para os tecidos do aparelho respiratório. A presença de secreções hemorrágicas no aparelho respiratório foi observada em um caso fatal de escorpionismo por *T. serrulatus* (AMARAL et al., 1994) e experimentalmente tem sido observada no trato respiratório por análise macroscópica ou histológica qualitativa com a pTs (bruta ou toxinas isoladas) (CORRÊA et al., 1997; FREIRE-MAIA et al., 1978) e peçonhas de outros escorpiões, como o *T. trivitatus* (DE ROODT et al., 2001), *T. confluens* (DE ROODT et al., 2009) e o *T. obscurus* (SANTOS-DA-SILVA et al., 2017), bem como escorpiões causadores de acidentes em outras regiões do planeta, como o *Hottentota gentili* (EL HIDAN et al., 2015) e o *M. tamulus* (AKELA et al., 2015).

Corroborando nossos dados anteriores (MIYAMOTO et al., 2018), a pTs e pTb desencadearam hemorragia nas vias respiratórias inferiores 1 hora após o envenenamento. É possível que isso tenha sido devido à liberação massiva de catecolaminas através da estimulação autonômica de terminações simpáticas e da adrenal, culminando em alterações hemodinâmicas no leito vascular pulmonar (FREIRE-MAIA et al., 1978). De fato, o aumento do débito cardíaco em resposta ao envenenamento é capaz de provocar aumento da pressão hidrostática vascular que se associa diretamente com o aumento da permeabilidade e consequente extravasamento de constituintes sanguíneos (WARE e MATTHAY, 2005). Além de um mecanismo puramente hemodinâmico, é possível que macrófagos alveolares ativados pelas peçonhas produzam substâncias que gerem dano direto ao endotélio vascular propiciando o extravasamento das hemácias. Demonstramos anteriormente que IL-1 β e IL-6 são produzidas em 1 hora (mesmo tempo da avaliação da hemorragia) nos pulmões de ratos envenenados pela pTs (MIYAMOTO et al., 2018), embora não tenhamos demonstrado a fonte dessas citocinas, elas são reconhecidamente produzidas em grandes quantidades por macrófagos. A hipótese de que macrófagos podem ter sido ativados pela pTs e participar do evento estudado encontra algum respaldo no artigo de Petricevich et al. (2008) que demonstrou que essas células expostas à pTs apresentam rapidamente (20 a 30

minutos) variações morfológicas e no influxo de cálcio indicando que foram estimuladas precocemente. Adicionalmente, Saidi et al (2018) demonstraram que uma linhagem de macrófagos alveolares murinos produz RNAm para IL-1 β após 1 hora de exposição à peçonha de *Androctonus australis hector*.

Quando pré-tratamos os animais com L-NAME notamos que nos ratos envenenados por pTs houve diminuição da hemorragia apenas nas vias aéreas inferiores (brônquios internos e pulmões), enquanto que naqueles envenenados por pTb houve aumento da hemorragia apenas nas vias superiores (traquéia e brônquios externos). Isso evidencia que, novamente a participação do NO é diferente nos distintos envenenamentos. De fato, é bem possível que o mecanismo hemorrágico desencadeado pela pTb seja diferente, uma vez que não detectamos anteriormente IL-1 β e IL-6 nos pulmões de ratos envenenados pela pTb (MIYAMOTO et al. 2018), demonstrando que, embora o envenenamento por peçonhas escorpiônicas distintas possa culminar em um evento comum (p. ex. aumento da permeabilidade e hemorragia), as vias para que se alcancem esse evento podem ser distintas e, portanto, sujeitas a diferentes modulações. Embora plausível, não podemos fazer o mesmo raciocínio sobre ativação de macrófagos alveolares ou outro tipo celular pela pTb, uma vez que infelizmente, não existem dados acerca disso na literatura. Por sua vez, a pTb contém mais metaloproteinases do que a pTs, conforme descrito por Venancio et al (2013); essas enzimas são semelhantes às encontradas em serpentes que, sabidamente, participam dos danos hemorrágicos observados em acidentes ofídicos (ALVARENGA et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2015). É possível levar em consideração que essa ação anti-hemorrágica provocada pela administração prévia de L-NAME ocorra através do aumento da adesão e agregação plaquetária. De fato, já é conhecida a atividade inibitória do NO sobre estes eventos hemostáticos (YAN et al., 1996; KUROSI et al., 1993). Partindo do princípio que o uso prévio de L-NAME possa ter provocado diminuição sérica de NO nos animais, possivelmente pela inibição da eNOS, é aceitável considerar a hipótese de que os eventos de adesão e agregação plaquetária possam ocorrer de maneira mais pronunciada em resposta as lesões hemorrágicas causadas por proteases da peçonha, o que explicaria a atenuação da hemorragia em resposta a pTs.

Como comentado anteriormente, a rápida presença de NO no soro de camundongos logo após 1 ou 3 horas do envenenamento por peçonhas

escorpiônicas tem sido demonstrada com a pTs (PETRICEVICH; PEÑA, 2002) e com peçonha do *Androctonus australis hector* (RAOURAOUA-BOUKARI et al., 2012; MEDJADBA et al., 2015; SAIDI et al., 2018), sendo que nesses últimos artigos também foi demonstrada sua produção no parênquima pulmonar após 3 horas de envenenamento. No presente estudo, demonstramos que a pTs e a pTb induziram produção de NO nos pulmões decorridas 4 horas do envenenamento. Como esperado, essa produção foi diminuída com o pré-tratamento dos animais com o inibidor não seletivo de NOS, L-NAME.

Nos mesmos tempos em que medimos a produção de NO nos pulmões (1 e 4 horas), também realizamos experimentos para detectar o edema das vias respiratórias através do lavado bronco-alveolar. No tempo de 1 hora, detectamos no lúmen das vias respiratórias aumento na quantidade de proteínas similar nos grupos envenenados, independentemente da peçonha utilizada e do pré-tratamento com L-NAME. O resultado de aumento de permeabilidade no lúmen das vias respiratórias induzido pelo envenenamento com pTs está em acordo com o relatado por Matos et al. (1999). A ausência de efeito do L-NAME está em aparente contradição com a exacerbação que esse fármaco provocou no aumento de permeabilidade vascular detectado por azul de Evans 30 minutos após a administração da pTs; entretanto, deve ser lembrado que o azul de Evans foi detectado diretamente nos tecidos selecionados, ou seja, no início do envenenamento o acúmulo de proteínas pode estar restrito ao interstício. Com o passar do tempo o aumento da permeabilidade passa a ocorrer não apenas nos vasos sanguíneos, mas também nas células epiteliais que compõem a barreira de mucosa, e o edema ganha o espaço alveolar; sendo assim, detectamos proteínas no lavado bronco-alveolar. Levando-se em conta esse raciocínio, no tempo de 1 hora o L-NAME não exerceu efeito sobre a permeabilidade epitelial da mucosa respiratória. Não sabemos se no escorpionismo experimental as células epiteliais da mucosa respiratória são afetadas, mas foi demonstrado que células epiteliais brônquicas humanas após 1 hora de incubação com a pTs produzem citocinas inflamatórias, evidenciando que a pTs exerce algum efeito sobre elas (RIGONI et al., 2016). O perfil de bandeamento eletroforético dos lavados bronco-alveolares dos diferentes grupos experimentais foi realizado com intuito de fornecer confirmação dos resultados obtidos com a quantificação de proteínas após o envenenamento.

Em 4 horas após o envenenamento o edema no lúmen das vias respiratórias foi exacerbado pelo L-NAME, independentemente da peçonha utilizada. A participação do NO no aumento da permeabilidade vascular nas vias respiratórias é controverso, parecendo estar na dependência do momento de atuação e da quantidade de NO produzida, em geral elevadas quantidades produzidas pela ativação da NOS induzida tendem a causar injúria, enquanto quantidades menores via NOS constitutivas podem atenuar os sintomas. Esse último caso parece se aplicar ao nosso modelo, embora não saibamos qual NOS está mais atuante na 4ª hora. Erjefält et al. (1994) demonstraram que a aplicação tópica de L-NAME na traquéia de porquinhos da Índia (e comentam que obtiveram os mesmos resultados em ratos) produz exsudação de plasma para o lúmen, mas não observaram o mesmo efeito quando o L-NAME foi administrado iv.

É possível que a potencialização do aumento do extravasamento de líquido e proteínas para o lúmen induzido pelo L-NAME nos grupos envenenados esteja ligado de alguma maneira ao número de neutrófilos e macrófagos, uma vez que nesse tempo o número dessas células também foi aumentado nos pulmões pelo L-NAME pré-administrado aos ratos envenenados. O envenenamento por pTs induz aumento do número de neutrófilos no pulmão de camundongos (COELHO et al., 2007; PERES et al., 2009; ZOCCAL et al., 2011) e ratos (MIYAMOTO et al., 2018) em cerca de 4 horas já havia sido documentado, mas desconhecemos resultados acerca da participação do NO nessa migração. Apesar disso, a participação do NO na migração de neutrófilos por outros estímulos é bem documentada, por exemplo, conforme demonstrado por SECCO et al (2004), foi constatado aumento da mobilização de neutrófilos para a cavidade peritoneal, em animais pré-tratados com inibidores da NOS, após 6 horas da administração de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

De fato, existem estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* demonstrando que o uso de inibidores da NOS aumentam a adesão e o rolamento neutrofílico, favorecendo a diapedese dessas células para os tecidos, enquanto que o uso de doadores de NO diminuem a adesão leucocitária em células endoteliais (KUBES et al., 1991; SUNDQVIST et al., 1994; LOPES-NEBLINA et al., 1996; HICKEY et al., 1997; KOSONEN et al., 1999). O mecanismo no qual o NO modula a mobilização de leucócitos se dá a partir da regulação da expressão de moléculas de adesão, como CD11b/CD18, L- P- E-selectinas, ICAM-I e VCAM-I nas células endoteliais. Essas

moléculas estão reguladas positivamente quando há inibição da síntese de NO e negativamente reguladas quando há a administração de doadores de NO. Adicionalmente, RIOS-SANTOS et al. (2007) demonstraram que a inibição da síntese de NO promove aumento da expressão de CXCR2, um receptor de quimiocina envolvido na migração de neutrófilos (LEFER et al., 1996; SPIECKER et al., 1998; GAUTHIER et al., 1994; ARMSTEAD et al., 1997; SATO et al., 1999).

Em contraste à documentada migração de neutrófilos no escorpionismo, a de macrófagos não é clara. Não existem estudos avaliando o efeito da pTb nesse quesito, mas em relação à pTs foi demonstrado por Peres et al. (2009) e Malaque et al. (2015) que macrófagos podem migrar precocemente, para os pulmões de camundongos (em 15 minutos a 3 horas) e ratos (1 hora) respectivamente. Ainda que o tempo avaliado por nós tenha sido um pouco diferente, nossos resultados não corroboram esses achados. Mas destacamos que o estudo realizado em rato, no qual a peçonha também foi administrada iv, o influxo de macrófagos foi avaliado através da detecção in situ de TLR-4 e de células positivas para CD68. Embora o aumento encontrado na expressão dessas moléculas possa refletir migração de macrófagos, podemos hipotetizar que a pTs possa ter induzido a expressão dessas moléculas em macrófagos residentes.

Diferente dos resultados obtidos nos animais envenenados sem tratamento, o uso do L-NAME antes do envenenamento promoveu aumento na quantidade de macrófagos. Assim como discutido anteriormente para neutrófilos, pode-se supor que o aumento na expressão de moléculas de adesão na falta de NO também tenha favorecido a migração de macrófagos. No entanto devemos observar esse resultado com cautela, pois do mesmo modo que o resultado de Malaque et al. (2015) pode ser atribuído ao aumento de expressão das moléculas avaliadas, e talvez não exatamente à migração, não temos como descartar que em nosso estudo as peçonhas tenham provocado aumento na produção da NAG e não da migração em si.

Sejam neutrófilos e/ou macrófagos, seu número aumentado nos pulmões, assim como em outras doenças pulmonares, pode resultar em maior lesão. Peçonhas escorpiônicas podem ativar neutrófilos como demonstrado por Borges et al. (2011) com a peçonha de *Tityus zuliaanus*; além disso, D'Suze et al. (2007) apresentaram resultados nos quais a inibição farmacológica da ativação de neutrófilos diminuiu a LPA desencadeada pela peçonha de *T. discrepans*. Quanto

aos macrófagos, sua ativação por peçonhas escorpiônicas é mais bem documentada. Estudos *in vitro* demonstraram que tanto macrófagos de cultura primária como os de cultura permanente produzem TNF e IL-6 quando estimulados com a peçonha de *T. serrulatus* (PETRICEVICH, 2002; ZOCCAL et al., 2011). Foi demonstrado por Zoccal et al. (2014) que a pTs ativa macrófagos através da ação sobre TLR4 e TLR2 culminando no disparo de vias que resultam na liberação de citocinas e metabólitos do ácido araquidônico. Ademais, como demonstrado em camundongos por Zoccal et al. (2016), a pTs induz células residentes pulmonares a produzirem IL-1 β que via IL-1R tem grande importância na permeabilidade vascular e formação de edema. Dessa forma, o acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar de ratos envenenados poderia estar associado ao aumento da produção de substâncias lesivas, como espécies reativas de oxigênio, culminando em amplificação da injúria pulmonar bem como em aumento da permeabilidade vascular e epitelial.

Finalmente, tendo o pré-tratamento com L-NAME culminado em geral na piora dos parâmetros avaliados, nossos dados sugerem que o NO desempenha papel protetor de destaque na fisiopatologia da LPA em ratos submetidos ao escorpionismo por peçonhas de *T. serrulatus* e de *T. bahiensis*.

6 CONCLUSÃO

Como esperado, o potencial edematogênico das peçonhas de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* foi confirmado, além da produção de NO nos pulmões, indicando a participação de células residentes na fisiopatologia do escorpionismo corroborando com os dados clínicos e experimentais acerca desta.

A inibição da síntese da produção do NO através do pré-tratamento com L-NAME se relaciona diretamente com potencialização dos parâmetros avaliados típicos de lesão pulmonar aguda, em especial edema e recrutamento de leucócitos. Nossos dados sugerem fortemente que o NO exerce um papel protetor na fisiopatologia da LPA causada por peçonha escorpiônica.

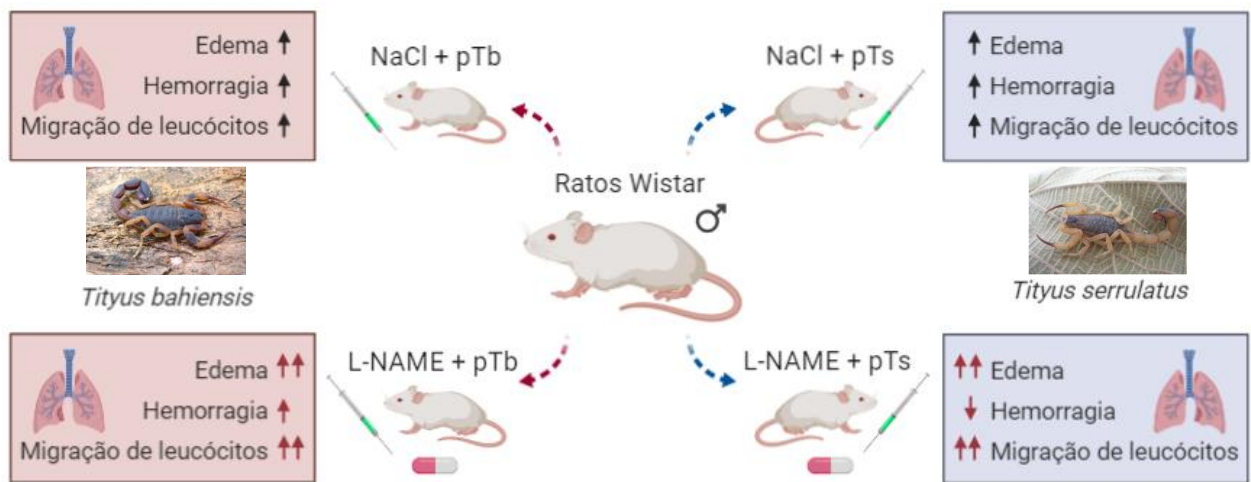


Figura 14: Efeitos do envenenamento e envolvimento do L-NAME na LPA.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. E. et al. Endocrinological and Biochemical Changes of Scorpionism in Children in Upper Egypt. **Therapeutic advances in endocrinology and metabolism**, v. 6, p. 210-216, 2015.
- AKELLA, A. et al. Mesobuthus tamulus Venom Induces Acute Respiratory Distress Syndrome in Rats Involving Additional Mechanisms as Compared to Oleic Acid Model. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 97, p. 15-22, 2015.
- ALVARENGA, E. R. et al. Transcriptome Analysis of the Tityus serrulatus Scorpion Venom Gland. **Open Journal of Genetics**, v. 2, p. 210–220, 2012.
- 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, p. 242-5, 1993
- 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, p. 999-1003, 1994.
- ARMSTEAD, V. E. et al. Regulation of P-selectin Expression in Human Endothelial Cells by Nitric Oxide, Am. **Journal of Physiology**, v. 273, p. 740–746, 1997.
- BAHLOUL, M. et al. Pulmonary Edema Following Scorpion Envenomation: Mechanisms, Clinical Manifestations, Diagnosis and Treatment. **International Journal of Cardiology**, v. 162, p.86-91, 2013.
- BARBOSA, M. G. R. et al. Aspectos Epidemiológicos dos Acidentes Escorpiônicos em Salvador, Bahia, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, p. 155-162, 2003.
- BORGES, A. et al. Specific Activation of Human Neutrophils by Scorpion Venom: A Flow Cytometry Assessment. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 358–367, 2011.
- 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.
- BRADLEY, P. P. et al. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de controle de escorpiões. Brasília, DF, 2009.
- BRUSCA, C & BRUSCA, G. Invertebrados. 2a edição. **Ganabara Koogan**, Rio de Janeiro. 1098 p, 2007.

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.

BUCARETCHI, F. et al. 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, 1995.

CAMPOLINA, D. et al. Escorpionismo. **Toxicologia na prática clínica**. Belo Horizonte: Folium, p. 295-319, 2013.

CAPELOZZI, V. L. What Have Anatomic and Pathologic Studies Taught us About Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome? **Current Opinion in Critical Care**, v. 14, p. 56–63, 2008.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Epidemiology of Scorpionism: a Global Appraisal. **Acta Tropica**, v.107, p. 71-79, 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, p. 420-427, 2007.

COLEMAN, J. W. Nitric Oxide in Immunity and Inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1397–1406, 2001.

COSTA, C. L. S. O et al. A Profile of Scorpionism, Including the Species of Scorpions Involved, in the State of Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 376-379, 2016.

CUPO, P. Clinical Update on Scorpion Envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 642-649, 2015.

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, p. 1116–1125, 2007.

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, p. 173-180, 1999.

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, p. 143–148, 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 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, p. 1-8, 2009.

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, p. 99-109, 2001.

DIEGO-GARCÍA, E. et al. The Mediterranean Scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): Transcriptome Analysis and Organization of the Genome Encoding Chlorotoxin-like Peptides. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1–16, 2014.

DINIZ, R. C. et al. Effect of Scorpion Venom from *Tityus serrulatus* (Tityustoxin) on the Acetylcholine Release and Fine Structure of the Nerve Terminals. **Experientia**, v. 30, p. 1304-1305, 1974.

EASTMUND, N. C.; COLEMAN, J. W. Nitric Oxide Inhibits IgE-mediated Degranulation of Mast Cells and Is the Principal Intermediate in IFN-gamma-induced Suppression of Exocytosis. **Journal of Immunology**, v. 159, p. 1444-1450, 1997.

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.

EL-HIDAN, M. A. et al. Behavioral, Histopathological and Biochemical Impairments Observed in Mice Envenomed by the Scorpion: *Hottentota gentili* (Pallary, 1924). **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 103, p. 19-29, 2015.

ERJEFALT, J. S. et al. Mucosal Nitric Oxide May Tonicly Suppress Airways Plasma Exudation. **The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 150, p. 227-232, 1994.

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, p.480-485, 2011.

FILEP, J. G. & FOLDES-FILEP, E. Modulation by Nitric Oxide of Platelet-activating Factor-induced Albumin Extravasation in the Conscious Rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 1347-1352, 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, p. 113-118, 1978.

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.; 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, p.1207-1210, 1993.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373–376, 1980.

GAUTHUIER, T. W.; DAVEMPECK, K. L.; LEFER, A. M. Nitric Oxide Attenuates Leukocyte–endothelial Interaction Via P-selectin in Splanchnic Ischemia–reperfusion. **The American Journal of Physiology**, v. 267, p. 562–568, 1994.

GEHLBACH, B. K.; GEPPERT, E. The Pulmonary Manifestations of Left Heart Failure. **Chest**, v. 125, p. 669-682, 2004.

GUZIK, T. J. et al. Nitric Oxide and Superoxide in Inflammation and Immune Regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, p. 469-487, 2003.

GWEE, M. C. E. et al. Autonomic Effects of Some Scorpion Venoms and Toxins. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, p. 795-801, 2002.

HICKEY, M. J.; KUBES, P. Role of Nitric Oxide in Regulation of Leukocyte–endothelial Cell Interactions. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 339–348, 1997.

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, p. 9265–9269, 1987.

KHATTABI, A. et al. Classification of Clinical Consequences of Scorpion Stings: Consensus Development. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 105, p. 364-369, 2011.

KHEMILI, D. et al. Involvement of Toll-like Receptor 4 in Neutrophil-Mediated Inflammation, Oxidative Stress and Tissue Damage Induced by Scorpion Venom. **Inflammation**, v.43, p.155-167, 2019.

KOIZUMI, T. et al. Effect of ONO1714, a Specific Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor, on Lung Lymph Filtration and Gas Exchange During Endotoxemia in Unanesthetized Sheep. **Anesthesiology**, v. 101, p. 59– 65, 2004.

KORHONEN, R. et al. Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, v. 4, p. 471-479, 2005.

KOSONEN, O. et al. Nitric Oxide-releasing Compounds Inhibit Neutrophil Adhesion to Endothelial Cells, Eur. J. **Pharmacology**, v. 382, p. 111–117, 1999.

KUBES, P. et al. Nitric Oxide: An Endogenous Modulator of Leukocyte Adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 88, p. 465–4655, 1991.

- KUEBLER, W. M. Inflammatory Pathways and Microvascular Responses in the Lung. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 196-205, 2005.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2016.
- KUROSE, I. et al. Inhibition of Nitric Oxide Production. Mechanisms of Vascular Albumin Leakage. **Circulation Research**, v. 73, p. 164-171, 1993.
- LEFER, A.M.; LEFER, D.J. The Role of Nitric Oxide and Cell Adhesion Molecules on the Microcirculation in Ischaemia-reperfusion. **Cardiovascular Research**, v. 32, p. 743-751, 1996.
- LIRA-DA-SILVA, R. M.; de AMORIN, 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.
- LOPEZ-NEBLINA, F. et al. Time Dependence of Na-nitroprusside Administration in the Prevention of Neutrophil Infiltration in the Rat Ischemic Kidney. **Transplantation**, v. 61, p. 179–183, 1996.
- 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, p. 1-12, 2018.
- LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAGALHÃES, M. M. et al. Acid-base Balance Following *Tityus serrulatus* Scorpion Envenoming in Anaesthetized Rats. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 38, p. 855-864, 2000.
- MALAQUE, C. M. S. A. et al. The role of Dexamethasone in Scorpion Venom-induced Deregulation of Sodium and Water Transport in Rat Lungs. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 3, p 1-14. , 2015.
- MATOS, I. M. et al. Effects of Tachykinin NK or PAF Receptor Blockade on the Lung Injury Induced by Scorpion Venom in Rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 376, p. 293–300, 1999.
- MCCAULEY, S. D. et al. Nitric Oxide: a Major Determinant of Mast Cell Phenotype and Function. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 11-14, 2005.
- MEDJADBA, W. et al. Involvement of Kallikrein-Kinin System on Cardiopulmonary Alterations and Inflammatory Response Induced by Purified Aah I Toxin from Scorpion Venom. **Inflammation**, v. 39, p. 290-302, 2016.
- MEHTA, S. The Effects of Nitric Oxide in Acute Lung Injury. **Vascular Pharmacology**, v. 43, p. 390–403, 2005.

- MEKI, A. R.; EL-DEAN, Z. M. 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, p. 1851-1859, 1998.
- 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, 2018.
- MORAES, T. J. et al. Neutrophil Granule Contents in the Pathogenesis of Lung Injury. **Current Opinion in Hematology**, v. 13, p. 21-27, 2006.
- MULLIGAN, M. S. et al. Tissue Injury Caused by Deposition of Immune Complexes is l-arginine Dependent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 6338– 6342, 1991.
- MURAYAMA, T. et al. Histamine-stimulated and GTP-binding Proteins-mediated Phospholipase A2 Activation in Rabbit Platelets. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 4290-4295, 1990.
- MURRAY, J. F. Pulmonary Edema: Pathophysiology and Diagnosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung disease**, v. 15, p. 155–160, 2011.
- 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.
- OLIVER, J. A. Endothelium-derived Relaxing Fator Contributes to the Regulation of Endothelial permeability. **Journal of Cellular Physiology**, v. 151, p. 506-511, 1992.
- PALMER, R. M. K. et al. Nitric Oxide Release Accounts of the Biological Activity of Endothelium-derived Relaxing Factor. **Nature**. v. 327, p. 524-526, 1987.
- PERES, A. C. P. Effects of Tityus Serrulatus Scorpion Venom on Lung Mechanics and Inflammation in Mice. **Toxicon: Official journal of the International Society on Toxinology**, v. 53, p. 779-785, 2009.
- 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, 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, p. 23-31, 2002.
- PETRICEVICH, V. L. et al. Macrophage Activation, Phagocytosis and Intracellular Calcium Oscillations Induced by Scorpion Toxins From Tityus Serrulatus. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 154, p. 415-423, 2008.

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, p. 173–180, 2002.

PUCCA, M. B. et al. Scorpionism and Dangerous Species of Brazil. **Toxinology**, p. 1-24, 2014.

PUCCA, M. B. et al. *Tityus serrulatus* Venom – A Lethal Cocktail. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 108, p. 272-284, 2015.

RAMÍRES, M. M., et al. Platelet Activating Factor Modulates Microvascular Permeability Through Nitric Oxide Synthesis. **Microvascular Research**, v. 50, p. 223-234, 2005.

RAOURAOUA-BOURAKI, R. et al. Immunomodulation of the Inflammatory Response Induced by *Androctonus australis* hector Neurotoxins: Biomarker Interactions. **Neuroimmunomodulation**, v. 19, p. 103-110, 2012.

RAZAVI, H. M. et al. Pulmonary Oxidant Stress in Murine Sepsis Is Due to Inflammatory Cell Nitric Oxide. **Critical Care Medicine**, v. 33, p. 1333-1339, 2005.

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.

REISS, L. K. et al. Models and Mechanisms of Acute Lung Injury Caused by Direct Insults. **European Journal of Cell Biology**, v. 91, p. 590– 601, 2012.

REZENDE, N. A. et al. Immunotherapy for Scorpion Envenoming in Brazil. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, vol. 36, p. 1507-1513, 1998.

RIBEIRO, A. L. et al. Aspectos Clínicos e Epidemiológicos do Envenenamento por Escorpiões em São Paulo e Municípios Próximos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 30, p. 83-92, 2001.

RIGONI, V. L. S. et al. Human Bronchial Epithelial Cells Injury and Cytokine Production Induced by *Tityus Serrulatus* Scorpion Venom: An in Vitro Study. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 120, p. 8-22, 2016.

RIOS-SANTOS, F. et al. Down-regulation of CXCR2 on Neutrophils in Severe Sepsis Is Mediated by Inducible Nitric Oxide Synthase–derived Nitric Oxide. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, p. 490-497, 2007.

SAIDI, H. et al. Involvement of Alveolar Macrophages and Neutrophils in Acute Lung Injury After Scorpion Envenomation: New Pharmacological Targets. **Inflammation**, v. 41, p. 773-783, 2018.

SAINI, R.; SINGI, S. Inducible Nitric Oxide Synthase: An Asset to Neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, p. 49-61, 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, p.1063-1066, 1996.

SANTOS, M. S. V. et al. Clinical and Epidemiological Aspects of Scorpionism in the World: A Systematic Review. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 27, p. 504–518, 2016.

SANTOS-DA-SILVA, A. P. 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, 2017.

SATO, Y. et al. Nitric Oxide Reduces the Sequestration of Polymorphonuclear Leukocytes in Lung by Changing Deformability and CD18 Expression. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, p. 1469–1476, 1999.

SEA-YUONG JEON, M.D. et al. Nitric Oxide Mediates Platelet Activating Factor-Induced Microvascular Leakage in Rats Airways. **The Annals of Otolaryngology and Laryngology**, v. 110, p. 83-86, 2001.

SECCO, D. D. et al. Neutrophil Migration in Inflammation: Nitric Oxide Inhibits Rolling, Adhesion and Induces Apoptosis. **Nitric Oxide, Biology and Chemistry**, v. 9, p. 153–164, 2004.

SEEKAMP, A. et al. Requirements for Neutrophil Products and L-arginine in ischemia–reperfusion Injury. **American Journal of Pathology**, v. 142, 1217–1226, 2020.

SILVEIRA, N. P. et al. Effects of Tityus serrulatus Scorpion Venom and One of its Purified Toxins (Toxin- γ) on the Isolated Guinea-pig Heart. **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 98, p. 329-336, 1991.

SPIECKER, M. et al. Differential Regulation of Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression by Nitric Oxide Donors and Antioxidants. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 63, p. 732-739, 1998.

STASI, M. et al. Activation of Phospholipase A2 and β -thromboglobulin Release in Human Platelets: Comparative Effects of Thrombin and Fluoroaluminate Stimulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1124, p. 279-287, 1992.

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

SUNAGAR, K. et al. Evolution Stings: The Origin and Diversification of Scorpion. Toxin Peptide Scaffolds. **Toxins**. v. 5, p. 2456-2487, 2013.

SUNDQVIST, T. et al. S-Nitroso- N-acetylpenicillamine reduces leukocyte adhesion to type I collagen, **Inflammation**, v. 18, p. 625–631, 1994.

SURICHAMORN, W. et al. Role of Intracellular Ca²⁺ Mobilization in Muscarinic and Histamine Receptor-Mediated Activation of Guanylate Cyclase in N1E-115 Neuroblastoma Cells: Assessment of the Arachidonic Acid Release Hypothesis. **Molecular Pharmacology**, v. 37, p. 860-869, 1990.

TORREZ, P. P. Q. et al. Scorpionism in Brazil: Exponential Growth of Accidents and Deaths From Scorpion Stings. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 52, p. 1-3, 2019.

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, p. 180–90, 2013.

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

WEICKER, S. et al. Non-invasive Measurement of Exhaled Nitric Oxide in a Spontaneously Breathing Mouse. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 163, p. 1113–1116, 2001.

YAN, Z. Q. et al. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibits Platelet Adhesion and Restores Blood Flow in the Injured Artery. **Circulation Research**, v. 79, p. 38-44, 1996.

ZEGDI, R. et al. Exhaled Nitric Oxide does not Reflect the Severity of Acute Lung Injury: An Experimental Study in a Rat Model of Extracorporeal Circulation. **Critical Care Medicine**, v. 30, p. 2096–2102, 2002.

ZHIJIAN, C. et al. Genetic Mechanisms of Scorpion Venom Peptide Diversification. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 47, p.348-355, 2006.

ZOCCAL, K. F. et al. CD36 Shunts Eicosanoid Metabolism to Repress CD14 Licensed Interleukin-1 β Release and Inflammation. **Frontiers of Immunology**, v. 9, p. 1-16, 2018.

ZOCCAL, K. F. et al. PPAR-g Activation by Tityus serrulatus Venom Regulates Lipid Body Formation and Lipid Mediator Production. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 93, p. 90-97, 2015.

ZOCCAL, K. F. et al. Tityus serrulatus Venom and Toxins Ts1, Ts2 and Ts6 Induce Macrophage Activation and Production of Immune Mediators. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 57, p. 1101–1108, 2011.

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, p. 1-12, 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.