



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JESSICA DAYANA GALÍNDEZ CERÓN

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS EM RATOS GERADAS PELAS
PEÇONHAS DOS ESCORPIÕES *Centruroides margaritatus*, *Centruroides limpidus* E
*Centruroides noxius***

FORTALEZA-CEARÁ

2018

JESSICA DAYANA GALÍNDEZ CERÓN

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS EM RATOS GERADAS PELAS
PEÇONHAS DOS ESCORPIÕES *Centruroides margaritatus*, *Centruroides limpidus* E
*Centruroides noxius***

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Co-orientador: Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento

FORTALEZA-CEARÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G156a Galíndez Cerón, Jessica Dayana.
Análise das alterações hemodinâmicas em ratos geradas pelas peçonhas dos escorpiões *Centruroides margaritatus*, *Centruroides limpidus* e *Centruroides noxius* / Jessica Dayana Galíndez Cerón. – 2018.
95 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.
Coorientação: Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento .
1. *Centruroides* sp.. 2. Hemodinâmica. 3. Coração. 4. Peçonha. I. Título.

CDD 615.1

JESSICA DAYANA GALÍNDEZ CERÓN

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS EM RATOS GERADAS PELAS
PEÇONHAS DOS ESCORPIÕES *Centruroides margaritatus*, *Centruroides limpidus* E
*Centruroides noxius***

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 24 / Julho / 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará – UECE (Co-orientador)

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Bruno Andrade Cardi
Universidade Estadual do Ceará – UECE

*A Deus e a Virgem Maria,
e meus amados pais:
Aldemar Galíndez Daza e
Milena Cerón Bolaños.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, María Santísima e toda a Corte Celeste pelo amor, proteção e luz na minha vida.

Aos meus amados pais Aldemar e Milena que são meu melhor exemplo de vida e sempre me deram o incentivo e suporte para que eu pudesse sonhar e realizar.

Ao meu irmão Camilo e Nathalia Garzón por nosso amado Thiago. E ao meu irmão Santiago, pelos certeros conselhos e por me motivar para ir à frente e ser feliz na vida.

A minha Bisavó Florentina Madroñero, por cuidar de nós desde o céu.

A minha avó Dolores Bolaños, meu tio Ferney e tia Honey Cerón pela entrega, cuidados e amor incondicional, sempre dispostos durante a vida toda.

A toda a minha família, amigos e vizinhos pelas orações e força.

A meu caro Orientador Alexandre Havt Bindá pelos ensinamentos transmitidos com tanta dedicação, pela constante busca de alternativas e superação, pelos conselhos de vida e sua entrega com todos os seus alunos.

Obrigada ao meu caro Co-orientador Nilberto Robson Falcão do Nascimento, pelos ensinamentos, apoio e disposição no dia a dia. Obrigada pela amizade, confiança e cada oportunidade.

Ao Professor Lourival Possani do Instituto de Biotecnologia da Universidade Nacional Autônoma do México, pela doação das peçonhas dos escorpiões *C. limpidus* e *C. noxius*.

Ao Grupo de Investigações Herpetológicas e Toxinológicas e ao Centro de Investigações Médicas da Universidad del Cauca, pelos ensinamentos e as instalações para obter a peçonha do escorpião *C. margaritatus*.

Aos meus caros professores da Universidad del Cauca, Jimmy Alexander Guerrero Vargas, José Beltrán Vidal e Luz Estella Hoyos pela amizade e apoio constante desde a graduação.

Meu sincero respeito e agradecimento aos ratos e escorpiões, por eles foi possível esta pesquisa. Obrigada à Natureza!

A minha cara amiga Laura Lícia Costa e sua maravilhosa família pela incrível ajuda durante minha estadia em Fortaleza. Por me adotarem e fazer me sentir como em casa. Deus lhes abençoe sempre.

Aos professores do exame de qualificação e os presentes no exame de defesa, por terem gentilmente aceito o convite para participar desta etapa da minha formação e pelas certas contribuições.

Aos professores do curso de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, em especial, Prof. Dr. Pedro Magalhães, Prof^a Dra. Flávia Almeida Santos, Prof^o. Dr. Alberto Melo Soares, Prof^o. Dr. Manassés Fonteles, Prof^o. Dr. Aldo Moreira Lima e Prof^a Dra. Helena Serra Azul Monteiro, pelos ensinamentos, confiança e oportunidades. Muito obrigada.

Aos meus amigos de luta: Erlânia Alves e Renan Santos, que desde o começo tivemos o mesmo sonho, estudamos para a seleção e Deu Certo! Obrigada pelas risadas, companhia e apoio nos estudos.

Aos meus caros amigos da UECE: à Prof^a Dra. Cláudia Ferreira dos Santos, pela atenção tão especial e ensinamentos. E aos estudantes: Gustavo, Angélica, Renata, Júlia e Alana, pela amizade, o carinhoso acolhimento no laboratório e acompanhamento nos experimentos, bons “gambiaras”.

Obrigada ao meu Caro grupo de pesquisa do Laboratório de Toxinologia Molecular (LTM): Advane, Rafaela, Alejandra, João, Klingem, Helena, Pedro Mateus, Cléber e Thiago Freitas pela amizade, apoio e ser parte da minha caminhada em Fortaleza. A Jeanine e Elana pela amizade especial.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Farmacologia, Venenos e Toxinas (LAFAVET), que desde 2012 me apoiaram e tem presenciado cada conquista acadêmica e pessoal, gratidão: Natacha, Rosa, Andrezza, Alison, Rafael e Pedro. E Danilo pela disposição e ajuda nos estudos.

Sou grata pela linda amizade, apoio e ensinamentos de minhas amigas Roberta Jean Bezerra Jorge e Aline Diogo Marinho, e as consideráveis contribuições na elaboração deste documento.

Obrigada aos meninos do LDI: Herlice, Samilly, Karol, Mara, Mariana, Rafaella, Marília, Pedro Henrique, Daniel, Júlio e Jefferson, pela amizade e ensinamentos.

Ao Seu Arthur, pela disposição para ajudar, obrigada pelo bom coração.

A Aline Silva e Alba, pelo convívio no dia a dia, pelo apoio, carinho e amizade que vai ficar sempre no meu coração.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas, Terezinha, Conceição, José, Charles, Kátia, Charliene, Luciana e Jefferson, pela inteira disposição de ajudar, pelos ensinamentos e sorrisos que melhoravam o dia, muito obrigada.

Ao Professor Mário Rogério Lima Mota do Laboratório de Patologia Bucal e à Técnica Débora Rejane Alves Calvante, pelo tempo, ensinamentos e processamento das amostras para histologia.

Aos meus amigos de vida: Laura Natahalie, César Barrios, Laura Márquez, Fermin, Mighay Lovera, Lilia Saldarriaga, José Francisco, Angélica, Victor Avilés, Roxana, Cyntia Carlos, Diego, Mario, Arlym Cárcamo, Alejandra Vargas, Andrea Rey e Ivo, por terem sido tão especiais, pelas risadas, “comilonas” e apoio, com vocês tudo ficou mais lindo e feliz.

Aos meus grandes amigos da Colômbia, pelo incentivo, conforto e companhia mesmo na distância: Julián Troches, Miyer Cerón, Dilberney Solarte, Mario Chávez, Vanessa Calero, Jael Claros, Catherine Ortega, Karen Caldas, Katherine Gomez, Lina Rueda, Mary Bueno, Salomé Zuluaga e Karen Ángel.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: Laura, Célia, Rômulo, Seu Adalto e Gabriela pela ajuda e disposição com cada necessidade.

A CNPq pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho e minha estadia no Brasil.

À Universidade Federal do Ceará, por minha formação e pela qualidade e cuidados com todos seus estudantes.

*O coração do homem planeja o seu caminho,
mas o Senhor lhe dirige os passos.*

Provérbios 16:9

RESUMO

Análise das alterações hemodinâmicas em ratos geradas pelas peçonhas dos escorpiões *Centruroides margaritatus*, *Centruroides limpidus* e *Centruroides noxius*

Os escorpiões do gênero *Centruroides* apresentam grande importância médica, devido ao alto grau de escorpionismo e aos efeitos cardiovasculares após o envenenamento, associados à falha ventricular esquerda. Deste modo, dada sua importância clínica e farmacológica, o objetivo principal desta pesquisa foi determinar as alterações funcionais cardiovasculares, das peçonhas dos escorpiões *Centruroides margaritatus* (Cm), *Centruroides limpidus* (Cl) e *Centruroides noxius* (Cn), com utilização da técnica de hemodinâmica sistêmica. As doses utilizadas foram de 10, 30, 100 e 300 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) para Cm e Cl; para Cn foram estudadas doses mais baixas devido à toxicidade (1 e 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$). As substâncias foram administradas por via intravenosa (n=6) em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) (310-350 g). Foram analisados índices sistólicos - fração de ejeção (FE), trabalho cardíaco (TC) e pressão máxima com respeito ao tempo (dP/dt máximo) - e diastólicos - dP/dt mínimo e a constante de relaxamento ventricular (Tau). Além disso, foram também considerados a pressão arterial média (PAM), o débito cardíaco (DC), a elastância arterial (Ea), a pressão venosa central (PVC), a resistência periférica total (RPT), o volume ventricular esquerdo, a frequência cardíaca (FC) e o eletrocardiograma. Foram observados os efeitos de envenenamento, como cianose, piloereção e secreção de fluídos, para as três peçonhas. Constatou-se que a peçonha de Cm, na dose de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, gerou diminuição da Ea ($3,2\pm 0,4$) e aumento do TC (2666 ± 334) e o dp/dt máx (13884 ± 834). A peçonha de Cl gerou diminuição nas doses de 100b e 300b $\mu\text{g}/\text{kg}$, em parâmetros como PAM, ($79,17\pm 5,48$ e $66,80\pm 9,45$), na FC ($229,6\pm 54$ e $195,3\pm 35,6$) e no DC. Por outro lado, houve aumento do dP/dt máx, do dP/dt mínimo e na PVC. Na avaliação da peçonha de Cn, a PAM diminuiu nas doses de 10 a 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, da mesma forma que a RPT. Já a FC diminuiu nas doses de 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, assim como o DC, FE, dP/dt máx e o TC, que também foi alterado a partir da dose de 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O dP/dt min aumentou a partir da dose de 60 até 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Para Cn, a análise do tecido cardíaco evidenciou preservação da arquitetura cardíaca, embora no pulmão encontrou-se formação de edema pulmonar. As três peçonhas induziram despolarização ventricular precoce de forma dose-dependente, com maior frequência para Cl e Cn. Portanto, *C. margaritatus* gerou cardiotoxicidade leve, enquanto os efeitos da *C. limpidus* foram moderados e a *C. noxius* foi a mais tóxica, gerando uma possível insuficiência ventricular esquerda.

Palavras chave: peçonha; *Centruroides sp.*; coração; hemodinâmica.

ABSTRACT

Analysis of the hemodynamic alterations in rats induced by scorpions venoms *Centruroides margaritatus*, *Centruroides limpidus* and *Centruroides noxius*

The scorpions from the *Centruroides* genus present great medical importance due to the high extent of scorpionism and their cardiovascular effects after poisoning. Thus, given the clinical and pharmacological importance of these scorpion venoms, the main objective of this investigation was to determine systemic functional alterations, specifically the cardiovascular ones, for the venoms from *Centruroides margaritatus* (Cm), *Centruroides limpidus* (Cl) and *Centruroides noxius* (Cn) scorpions, using systemic hemodynamic techniques. For this purpose, doses of Cm and Cl at 10, 30, 60, 100 and 300 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) and doses of Cn at 1 and 60 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) – because of its high toxicity - were administered intravenously (n=6) using Wistar rats as the experimental model (*Rattus norvegicus*) (310-350 g). We evaluated systolic parameters such as: ejection fraction (EF), stroke work (SW) and maximal slope of the systolic pressure increment (+dP/dt); and diastolic parameters such as dP/dt min and the time constant for isovolumic relaxation (Tau). Additionally, we also evaluated mean arterial pressure (MAP), cardiac output (CO), arterial elastance (AE), central venous pressure (CVP), total peripheral resistance (TPR), left ventricular volume (LVV), heart rate (HR) and electrocardiogram. We evaluated effects of poisoning such as cyanosis, piloerection and fluid secretion, for the three poisons. It was found that Cm venom caused a decrease in the dose of 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of Ea ($3,2\pm 0,4$) and increased the TC (2666 ± 334) and dp/dt máx (13884 ± 834). The *C. limpidus* venom caused a decrease in the dose of 100b and 300b $\mu\text{g}/\text{kg}$ in parameters like MAP, ($79,17\pm 5,48$ and $66,80\pm 9,45$), HR ($229,6\pm 54$ and $195,3\pm 35,6$) and CO. On the other hand, there was an increase in dP/dt máx, dP/dt min and CVP. For the *C. noxius* venom evaluation, MAP was decreased in the dose of 10 up to 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, in the same way that TPR. Parameters such as HR decreased in the dose of 100 and 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, as well as CO, EF, dP/dt máx and SW, which was also altered in the dose of 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The parameter dP/dt min increased from the dose of 60 to 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cn venom treated group showed preservation of cardiac architecture regarding heart tissue analysis, although presence of formation of pulmonary edema. The three venoms induced premature ventricular depolarization with all doses evaluated, more often for venoms from Cl and Cn. Therefore, *C. margaritatus* generate mild cardiotoxicity, unlike *C. limpidus* which did it moderately and *C. noxius* was the most toxic with possible left ventricular insufficiency.

Keywords: venom; *Centruroides sp.*; heart; hemodynamics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 Toxinas animais	20
2.2 Biologia dos escorpiões	22
2.3 Composição e alvos moleculares das neurotoxinas escorpiônicas	22
2.4 Escorpionismo e suas manifestações clínicas	24
2.5 Gênero <i>Centruroides</i> (MARX, 1889)	26
2.6 Escorpião <i>Centruroides margaritatus</i>	27
2.7 Escorpião <i>Centruroides limpidus</i>	28
2.8 Escorpião <i>Centruroides noxius</i>	29
2.9 Sistema cardiovascular	30
2.10 Hemodinâmica sistêmica e os feitos cardiovasculares gerados pela peçonha de escorpião	34
3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	38
4 OBJETIVOS	39
4.1 Geral	39
4.2 Específicos	39
5 MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 Obtenção das peçonhas	40
5.2 Animais experimentais	40
5.3 Modelos experimentais	41
5.3.1 Hemodinâmica sistêmica	41
5.3.2 Eletrocardiograma (ECG)	44
5.3.3. Análise estatística	44
6 RESULTADOS	46

6.1 Registro da hemodinâmica sistêmica	46
6.1.1 Parâmetros avaliados com a peçonha de <i>C. margaritatus</i>	46
6.1.2 Parâmetros avaliados com a peçonha de <i>C. limpidus</i>	46
6.1.3 Parâmetros avaliados com a peçonha de <i>C. noxius</i>	47
6.2 Efeitos gerados por <i>C. margaritatus</i> , <i>C. limpidus</i> e <i>C. noxius</i> no envenenamento	48
6.3 Efeitos promovidos pela PCm, PCI e PCn na curva pressão-volume e no PRSW	49
6.4 Avaliação da hemodinâmica sistêmica com a PCm, PCI e PCn	55
6.4.1 Pressão arterial	55
6.4.2 Frequência cardíaca	57
6.4.3 Volume ventricular esquerdo	58
6.4.4 Débito cardíaco	59
6.4.5 Elastância arterial	61
6.4.6 Pressão venosa central	62
6.4.7 Resistência periférica total	63
6.4.8 Índices diastólicos	65
6.4.9 Índices Sistólicos	67
6.4.10 Eletrocardiograma	71
6.5 Avaliação histopatológica	75
7 DISCUSSÃO	77
8 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Incidência do escorpionismo a nível mundial.	25
Figura 2- Escorpiões estudados com sua distribuição geográfica.	30
Figura 3- Atividade elétrica do coração.	32
Figura 4 - Ciclo pressão volume ventricular.	33
Figura 5 - Desenho experimental, grupo <i>C. margaritatus</i> e <i>C. limpidus</i> .	42
Figura 6 - Desenho experimental, grupo <i>C. noxius</i> .	42
Figura 7- Representação da PVE durante o procedimento cirúrgico.	43
Figura 8 - Registro representativo da hemodinâmica sistêmica para <i>C. margaritatus</i> .	46
Figura 9 - Registro representativo da hemodinâmica sistêmica para <i>C. limpidus</i> .	47
Figura 10 - Registro representativo da hemodinâmica sistêmica para <i>C. noxius</i> .	48
Figura 11 – Efeito da peçonha de <i>C. margaritatus</i> sobre a curva pressão-volume da hemodinâmica sistêmica.	49
Figura 12 – Efeito da peçonha de <i>C. margaritatus</i> sobre o PRSW da hemodinâmica sistêmica.	50
Figura 13 - Efeito da peçonha de <i>C. limpidus</i> sobre a curva pressão-volume da hemodinâmica sistêmica.	51
Figura 14 - Efeito da peçonha de <i>C. limpidus</i> sobre o PRSW da hemodinâmica sistêmica.	52
Figura 15 - Efeito da peçonha de <i>C. noxius</i> sobre a curva pressão-volume da hemodinâmica sistêmica.	53
Figura 16 - Efeito da peçonha de <i>C. noxius</i> sobre o PRSW da hemodinâmica sistêmica.	54
Figura 17 – Efeitos da PCm, PCl e PCn na pressão arterial média.	56
Figura 18 – Efeitos da PCm, PCl e PCn na frequência cardíaca.	57
Figura 19 – Efeitos da PCm, PCl e PCn no volume ventricular esquerdo.	58
Figura 20 – Efeitos da PCm, PCl e PCn no débito cardíaco.	60
Figura 21 – Efeitos da PCm, PCl e PCn na elastância arterial.	61
Figura 22 – Efeitos da PCm, PCl e PCn na pressão venosa central.	62
Figura 23 – Efeitos da PCm, PCl e PCn na resistência periférica total.	64
Figura 24 – Efeitos da PCm, PCl e PCn na constante de relaxamento isovolumétrico.	65
Figura 25 – Efeitos da PCm, PCl e PCn no dP/dt min.	66
Figura 26- Efeitos da PCm, PCl e PCn no trabalho cardíaco.	68
Figura 27 – Efeitos da PCm, PCl e PCn na fração de ejeção.	69
Figura 28 – Efeitos da PCm, PCl e PCn no dP/dt max.	70

Figura 29 – Efeito da peçonha de <i>C. margaritatus</i> no eletrocardiograma.	72
Figura 30 - Registro ampliado da hemodinâmica sistêmica para PCI.	72
Figura 31 – Efeitos da peçonha de <i>C. limpidus</i> no eletrocardiograma.	73
Figura 32 – Alterações no registro da hemodinâmica sistêmica de PCn.	73
Figura 33 – Efeitos da peçonha de <i>C. noxius</i> no eletrocardiograma.	74
Figura 34 - Avaliação histopatológica do coração e pulmão na hemodinâmica sistêmica da PCn.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Toxinas animais no desenvolvimento de fármacos.	21
Tabela 2 - Sinais e sintomas no envenenamento escorpiônico.	26
Tabela 3 - Parâmetros hemodinâmicos avaliados.	45
Tabela 4 - Resultados dos efeitos sintomáticos de envenenamento gerados pela peçonhas de <i>C. margaritatus</i> (Cm), <i>C. limpidus</i> (Cl) e <i>C. noxius</i> (Cn).	48
Tabela 5 - Registros de <i>C. margaritatus</i> nos parâmetros do ECG.	74
Tabela 6 - Registros de <i>C. limpidus</i> nos parâmetros do ECG.	75
Tabela 7 – Registros de <i>C. noxius</i> nos parâmetros do ECG.	75
Tabela 8 - Resumos dos resultados da Hemodinâmica sistêmica encontrados na pesquisa.	84
Tabela 9 - Resumos dos resultados do electrocardiograma encontrados na pesquisa.	84

ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
b.p.m	Batimentos por minuto
DC	Débito cardíaco
DL₅₀	Dose Letal para 50% dos animais
dP/dt	Primeira derivada da pressão
Ea	Elastância arterial
ECG	Eletrocardiograma
EPM	Erro Padrão da Média
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de ejeção
i.p	Intraperitoneal
MgTx	Margatoxina 1
PAM	Pressão Arterial Média
PCm	Peçonha de <i>Centruroides margaritatus</i>
PCI	Peçonha de <i>Centruroides limpidus</i>
PCn	Peçonha de <i>Centruroides noxius</i>
PVC	Pressão venosa central
PVE	Pressão Ventricular Esquerda
RPT	Resistência periférica total
Tau	Constante de relaxamento ventricular
TC	Trabalho cardíaco
Ved	Volume diastólico final
Ves	Volume sistólico final
VS	Volume sistólico

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que 1,2 milhão de picadas de escorpiões sejam registradas no mundo a cada ano, apesar de que apenas cerca de 30 espécies de escorpiões conhecidas sejam perigosas para os seres humanos, cerca de 3000 acidentes por ano são fatais (CHIPPAUX, 2012). O escorpionismo tornou-se um problema de saúde pública em alguns países de América Latina, com mais de 100 casos reportados por cada 100.000 habitantes, entre as quais estão incluídos no continente Americano, o México, o Norte da América do Sul (incluindo Colômbia, Venezuela e Guiana), Brasil e o Norte da Argentina. A incidência em países como o México é de 200.000 a 250.000 casos/ano, a maioria do gênero *Centruroides* e no Brasil de 8000 a 21.000 casos/ano especialmente envolvendo espécies do gênero *Tityus* (CHIPPAUX & GOYFFON, 2008; GÓMEZ *et al.*, 2010; ISBISTER & BAWASKAR, 2014).

O gênero *Centruroides* é encontrado na América do Norte, México e também distribuído na América Central (BORGES, 2011). Na Colômbia, *Centruroides* têm sido amplamente estudado ao nível epidemiológico, fisiológico e molecular, sendo a espécie *C. margaritatus* potencialmente perigosa no país (GUERRERO-VARGAS *et al.*, 2014), distribuindo-se pelo Valle del Cauca, Cauca e Nariño (ARMAS *et al.*, 2012) e associado principalmente aos acidentes escorpiônicos no Valle del Patía (Cauca).

Santibáñez-López *et al.*, (2016) indicaram que México apresenta 281 espécies descritas, que representam mais do 12% da diversidade mundial, sendo o gênero *Centruroides* o mais diverso, com 42 espécies. Considerado como o país com maior incidência de escorpionismo no mundo, a alta toxicidade destas espécies constituem um problema de saúde pública importante, e dentre elas destacam-se *C. limpidus* e *C. noxius* (LOURENÇO, 2016).

Alguns autores relatam o efeito nocivo da peçonha no sistema cardiovascular e sabe-se da correlação entre os sintomas clínicos da neurotoxicidade central e periférica, cardiotoxicidade e alterações metabólicas presentes nos pacientes envenenados (OSNAYA-ROMERO *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2010). Estudos clínicos relatam manifestações como miocardite tóxica (com dano miocárdico), alterações hemodinâmicas, eletrocardiográficas e ecocardiográficas, que são causadas principalmente pelas catecolaminas e por um possível efeito tóxico direto (CUPO *et al.*, 2007; ISMAIL *et al.*, 2016; DOKUR, DOGAN, e YAGMUR, 2017). Dados da literatura com biomodelos mostraram aumento da frequência cardíaca, assim como deficiência de insulina

relativa ou absoluta, que pode estar envolvida no metabolismo do coração e ser parcialmente responsável pelo desenvolvimento de arritmias e insuficiência cardíaca (KRISHNA-MURTHY, 2000).

A avaliação da toxicidade das peçonhas mediante o estudo hemodinâmico permite caracterizar os efeitos sistêmicos e possibilita conhecer a ação das toxinas para identificarmos potenciais agentes terapêuticos. Dada a importância clínica e farmacológica da peçonha de escorpião e a falta de estudos da sua toxicodinâmica, o objetivo principal desta pesquisa foi identificar as alterações sistêmicas e cardiovasculares *in vivo* induzidas pelos escorpiões *C. margaritatus*, *C. limpidus* e *C. noxius*. Os estudos *in-vivo* são uma ferramenta importante para identificar a toxicodinâmica da peçonha total e poder continuar com os estudos *in-vitro* e os moleculares, com a finalidade de obter fontes emergentes de terapias baseadas em peptídeos (PEIGNEUR e TYTGAT, 2018).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Toxinas animais

Uma das primeiras inquietações no percurso desta pesquisa é: por que estudar toxinas animais? A partir deste questionamento buscamos desenvolver o início deste estudo. Desde o século XVIII, as toxinas animais são consideradas importantes ferramentas de pesquisa farmacológica, na terapêutica clínica. A alta especificidade e potência para alvos moleculares têm permitido o uso de toxinas como sondas moleculares para decifrar as funções fisiológicas e os mecanismos de doenças (GOUDET, CHI, e TYTGAT, 2002). Diferentes aplicações dos componentes da peçonha de escorpião poderiam eventualmente ser potenciais candidatos a produtos farmacêuticos, estes incluem atividades antimicrobianas, antimaláricas, imunossupressoras e anticancerígenas (ORTIZ *et al.*, 2015). Numerosos medicamentos aprovados nas últimas décadas foram baseados em toxinas ou seus compostos, sendo opções terapêuticas novas e eficientes. Inicialmente, os peptídeos foram avaliados em estudos fisiológicos e posteriormente aprofundados e identificadas as toxinas específicas com atividade farmacológica, usadas amplamente em estudos para identificação do mecanismo de ação. Atualmente, a iberiotoxina e a caribdotoxina são exemplos destes achados, usadas amplamente em estudos com o intuito de esclarecer a fisiopatologia de doenças (**Tabela 1**) (SOLEGLAD e FET, 2003; SOUZA *et al.*, 2018). Destacamos que essas descobertas foram possíveis pelos avanços tecnológicos, que contribuíram para a extração de grandes quantidades destas substâncias e permitiram estudos precisos sobre estrutura química e ação farmacológica destes compostos (SUNAGAR *et al.*, 2013; JIMÉNEZ-VARGAS *et al.*, 2017).

Os escorpiões são animais peçonhentos, e apresentam órgão secretório ou glândulas conectadas ao dispositivo de injeção, sendo capazes de produzir seu próprio veneno, que é uma mistura de proteínas e toxinas peptídicas, codificadas geneticamente; já os animais venenosos, não apresentam aparelho inoculador e geram substâncias tóxicas a partir de tecidos ou de outros animais, plantas ou micro-organismos. Deste modo, considerando o estudo dos escorpiões, no presente trabalho será referido o termo peçonha (MEBS, 2002).

Tabela 1 Toxinas animais no desenvolvimento de fármacos.

Toxina/substância	Espécie de origem	Efeito	Fármaco	Referência
Conotoxina	Molusco marinho <i>Conus magus</i>	Tratamento da dor crônica grave. Bloqueia os canais de cálcio dependentes de voltagem	Prialt® (ziconotide)	(MCGIVERN, 2007)
Fator potenciador de bradicinina	Serpente <i>Bothrops jararaca</i>	Inibidores da enzima conversora de angiotensina I (drogas anti-hipertensivas)	Captopril	(CUSHMAN e ONDETTI, 1980)
Echistatin	Serpente <i>Echis carinatus</i>	Inibidor da agregação plaquetária	Aggrastat® tirobifan	(GARSKY <i>et al.</i> , 1989)
Eptifibatida	Cascavel <i>Sistrurus miliarius barbouri</i>	Droga anticoagulante Bloqueio dos receptores GP IIb / IIIa	Integrilin® (Eptifibatide)	(HASHEMZADEH <i>et al.</i> , 2008)
hormônio exendina-4	Monstro de Gila <i>Heloderma suspectum</i>	Diabetes tipo II	Byetta® (Exenatide®)	(TRIPLITT E CHIQUETTE, 2006)
Adrucalcin	Escorpião <i>Hadrurus gertschi</i>	Doença arritmogênica (ativador dos receptores de rianodina)	Em estudo	(XIAO <i>et al.</i> , 2016)
Chlorotoxin	Escorpião <i>Leiurus quinquestriatus</i>	Glioma	Estudos clínicos	(MRUGALA <i>et al.</i> , 2012)
Iberiotoxina	Escorpião <i>Buthus tamulus</i>	Inibidor de canais de K ⁺ ativados pelo Ca ²⁺	Estudos pré-clínicos	(CANDIA, GARCIA, e LATORRE, 1992)
Caribdotoxina	Escorpião <i>Leiurus quinquestriatus</i>	Bloqueia canais de K ⁺ ativados pelo Ca ²⁺	Estudos pré-clínicos	(MILLER <i>et al.</i> , 1985)

2.2 Biologia dos escorpiões

Os escorpiões pertencem ao reino Animalia, filo Arthropoda, sub-filo Chelicerata, classe Arachnida e ordem Scorpiones (BRUSCA e BRUSCA, 2003). Este grupo de invertebrados está amplamente distribuído em todos os continentes e regiões do mundo, especialmente nas áreas tropicais e subtropicais (POLIS, 1990), com exceção das áreas do norte da região Antártica e Nova Zelândia. É possível encontrá-los a partir do nível do mar à 5.000 metros (m), e frequentemente o maior número de espécies são encontradas entre 0 e 2000 m (FLÓREZ, 2001). Utilizando-se características morfológicas e moleculares, até o momento os pesquisadores já classificaram 2408 espécies de escorpiões (<https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/buthidae.php>).

Os escorpiões são animais cuja peçonha apresenta uma mistura complexa, com anos de evolução, e são considerados os artrópodes mais antigos (450 milhões de anos), que conservam sua morfologia inicial (BROWNELL e POLIS, 2001). Esses animais são importantes nas pesquisas desenvolvidas na área da farmacologia, devida a variedade de toxinas presentes na sua peçonha. A fisiopatologia do escorpionismo envolve uma série complexa de eventos que são dependentes de uma ação combinada de compostos ativos tais como proteínas, sais orgânicos, aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos, além de compostos ainda desconhecidos. Queiroz e colaboradores (2015) descreveram os principais efeitos causados pelas peçonhas dos escorpiões como danos miocárdicos, arritmias cardíacas e choque, possivelmente pela liberação de mediadores do sistema nervoso autônomo.

2.3 Composição e alvos moleculares das neurotoxinas escorpiônicas

As toxinas animais apresentam forte atividade (ação em pmol/L e nmol/L), alta especificidade (efetiva nos subtipos de receptores e canais iônicos) e enorme diversidade molecular (famílias de cópias de múltiplos genes) (ZHANG, 2015). As peçonhas de escorpiões são compostos complexos que consistem em proteínas básicas neurotóxicas, substâncias orgânicas como lipídeos, carboidratos, nucleosídeos, nucleotídeos, aminoácidos livres, enzimas (algumas espécies) e substâncias inorgânicas como íons, que podem induzir a secreção de mediadores inflamatórios e que contribuem como resposta à dor após a picada (MARCUSI *et al.*, 2011). Estas substâncias são produzidas para predação, digestão e proteção, e têm como alvo

canais iônicos específicos, tendo ação em mamíferos, insetos ou moluscos, sendo possível encontrar toxinas com afinidade para diferentes tipos celulares (SITPRIJA e SITPRIJA, 2012). As toxinas apresentam diferentes propriedades biológicas, dentre elas, está o potencial anticancerígeno (DING *et al.*, 2014), atividade antinociceptiva ou analgésica (GOUDET *et al.*, 2002), assim como importantes ferramentas para estudos do sistema nervoso central (NENCIONI *et al.*, 2018).

Existem aproximadamente 300.000 compostos diferentes nas peçonhas dos escorpiões, no entanto, referências assinalam que se conhece menos do 1% do número total dos componentes. Levando em consideração as características estruturais e efeitos fisiológicos, os peptídeos de escorpiões são classificados atualmente em quatro famílias de acordo com os canais iônicos de membrana aos quais se ligam (QUINTERO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

- I. Toxinas com afinidade pelos canais de sódio: compreendem 60 a 76 resíduos de aminoácidos, estabilizados por quatro pontes dissulfeto e são divididos em dois grupos: α -neurotoxinas e β -neurotoxinas (STEVENS, PEIGNEUR, e TYTGAT, 2011).
- II. Toxinas com afinidade pelos canais de potássio: apresentam 29 a 41 resíduos de aminoácidos, com três a quatro pontes dissulfeto, são classificados em quatro famílias, α , β e γ (CORONA *et al.*, 2002).
- III. Toxinas com afinidade pelos canais de cloro: também apresentam peptídeos de cadeia curta, com até 40 resíduos de aminoácidos e possuem pontes dissulfeto (POSSANI *et al.*, 1999).
- IV. Toxinas com afinidade pelos canais de cálcio: Possuem um número variado de peptídeos, desde 28 até 66 aminoácidos. Os canais estão classificados em várias subfamílias, incluindo: canais controlados por voltagem, canais independentes de voltagem e canais ativados por ligantes. Os canais ativados por ligante, por sua vez, incluem os receptores de rianodina (RyRs). Os primeiros peptídeos conhecidos por terem atividade sobre este receptor foram encontrados no veneno do escorpião *Buthotus hottentota* (QUINTERO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

As peçonhas de 30 espécies de escorpiões têm sido estudadas em detalhes e ainda apresentam compostos biologicamente ativos ainda inexplorados, devido à diversidade de substâncias (KING, 2011). De todos os compostos presentes na peçonha, as toxinas α são de importância médica e consistem em 60 a 76 polipeptídeos, se ligam a um local específico do Na^+

(canal de sódio voltagem dependente) e inibem a inativação do canal, o que resulta em despolarização prolongada e, portanto, em excitação neuronal. Outras toxinas agem nos canais de potássio e cálcio, mas estas parecem ser menos importantes no envenenamento humano (QUINTERO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Entretanto, os peptídeos sem pontes dissulfeto das peçonhas de escorpião incluem propriedades farmacológicas como atividades antimicrobiana, citolítica, antiviral, antimalárica, antifúngica, potenciadora de bradicinina e imunomoduladora (ALMAAYTAH e ALBALAS, 2014).

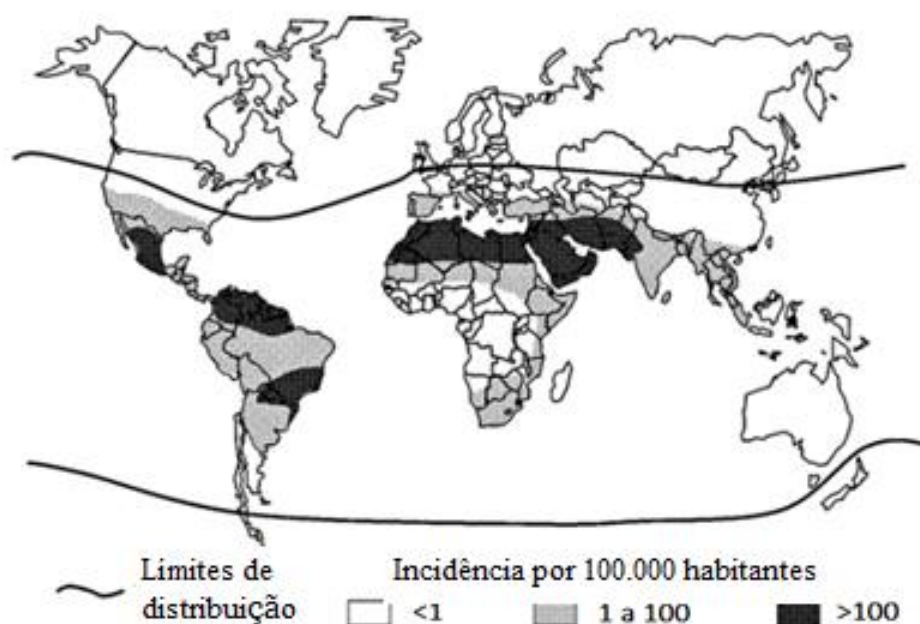
2.4 Escorpionismo e suas manifestações clínicas

O escorpionismo é o quadro clínico gerado pela picada de escorpião, sendo considerado um problema de saúde pública em algumas partes do mundo, como América Central e do Sul, Norte da África, Oriente Médio e Sul da Ásia (**Figura 1**). Embora a maioria dos acidentes cause apenas efeitos locais como dor, cianose, sudorese e parestesia, o envenenamento grave provoca atividade autonômica excessiva, efeitos tóxicos cardiovasculares ou efeitos tóxicos neuromusculares causando morbidade substancial e, entre as crianças, risco de morte. A orientação diante de um caso de envenenamento é que tratamentos específicos (antiveneno) e sintomáticos sejam realizados o mais precoce possível após a picada (ISBISTER e BAWASKAR, 2014).

Os efeitos da peçonha podem ser explicados pela liberação de neurotransmissores, resultado de uma ação excitatória primária de neurotoxinas na membrana axonal, causada pelas modificações dos canais iônicos sensíveis à voltagem. O efeito das toxinas sobre os canais de sódio leva à despolarização das terminações nervosas pós-ganglionares dos sistemas simpático e parassimpático, gerando liberação principalmente de adrenalina, noradrenalina e acetilcolina, que induzem a maioria dos sinais e sintomas (ISBISTER e BAWASKAR, 2014), relacionados ao aumento da pressão arterial, da pressão ventricular esquerda e da contratilidade (TEIXEIRA *et al.*, 2001; MESQUITA *et al.*, 2003). Entretanto, os efeitos cardiovasculares podem estar associados à presença de hemorragia difusa e edema pulmonar (MEDJADBA, MARTIN e LARABA, 2015; COSTAL-OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A idade, além da massa corporal da pessoa, são fatores importantes intrínsecos à vítima, relacionado à gravidade do envenenamento do escorpião, devido a maior e mais rápida distribuição tissular da peçonha, com sintomas cardiovasculares e no sistema nervoso central, observados frequentemente em crianças (NUNAN *et al.*, 2003). Estudos relatam que o envenenamento escorpiônico com gêneros como *Mesobothus*, *Hemiscorpus* e *Buthus* também pode gerar outros efeitos como hemoglobinúria, necrose tubular aguda, nefrite intersticial e síndrome urêmica hemolítica, (VISWANATHAN e PRABHU, 2011). Um consenso permitiu que os especialistas de onze países indicassem uma classificação do escorpionismo, sendo uma ferramenta importante para a padronização do cuidado de pacientes, com base nos sinais e sintomas, sem levar em conta os fatores de risco ou espécies envolvidas, com três estágios de severidade crescente, conforme está descrito na **Tabela 2** (KHATTABI *et al.*, 2011). O 95% dos acidentes com escorpiões nas regiões tropicais são gerados por espécimes da família Buthidae, para América pertencem ao gênero *Centruroides* e *Tityus* e atualmente, apenas um número limitado de espécies são usadas no estudo de venenos e toxinas, principalmente porque representam ameaça aos seres humanos (LOURENÇO, 2018).

Figura 1 – Incidência do escorpionismo a nível mundial.



Fonte: Chippaux & Goyffon, (2008).

Tabela 2 - Sinais e sintomas no envenenamento escorpiônico.

Estágio		Tempo	Sintoma
I	a	2 horas	Dor intensa e persistente, com recuperações parciais e recaídas.
	b	Dura de 10 a 15 horas, às vezes até 24 horas	Agitação, fraqueza, sudorese, náuseas, sensação de desmaio geral, pressão arterial alternada (hipertensão ou hipotensão).
II	Severo	Passadas 2 horas em diante	Sintomas muscarínicos sistêmicos: sudorese, dor epigástrica, vômitos, cólicas, diarreia, priapismo, hipotensão, bradicardia, obstrução pulmonar, dispneia, aumento da temperatura corporal, vômito constitui um sinal de gravidade e requer monitoramento específico.
III (5 a 10% dos casos do estágio II)	Muito grave, potencialmente letal	Entre 4 e 12 horas após a picada	O risco de colapso cardiovascular é o mais alto, associado às complicações respiratórias graves: edema pulmonar, broncoespasmo e cianose. Também reportado hipertermia, arritmia cardíaca, sinais eletrocardiográficos de isquemia miocárdica.

Fonte: Khattabi *et al.*, (2011).

2.5 Gênero *Centruroides* (MARX, 1889)

O gênero *Centruroides* é considerado potencialmente perigoso para os humanos. É originário da América do Norte, também distribuído no México e no Norte da América do Sul (GÓMEZ e OTERO, 2007), e América Central, zona que hospeda uma grande diversidade de escorpiofauna (BORGES *et al.*, 2012). Este gênero apresenta espécies altamente tóxicas, como as do território mexicano (SANTIBANEZ-LOPEZ *et al.*, 2016) e outras espécies, com distribuição na América Central, América do Sul e no Caribe têm menor grau de toxicidade como *C. margaritatus* e *C. bicolor* no Panamá (BORGES, 2011).

Santibáñez-López *et al.*, (2016) analisaram a composição de peçonhas de algumas espécies mexicanas do gênero *Centruroides* e reportaram que os peptídeos mais abundantes são aqueles que modificam o mecanismo de canais de Na⁺ seguido pelos de canais de K⁺. Entretanto, várias espécies deste gênero têm sido fonte para o desenvolvimento de tratamentos anticancerígenos e antimicrobianos, a partir de alguns dos compostos ativos, assim como o

desenho e a expressão de toxinas recombinantes empregadas para a produção de soros (JIMENEZ-VARGAS *et al.*; 2017).

2.6 Escorpião *Centruroides margaritatus*

De Armas e colaboradores (2012) delimitaram a distribuição geográfica de *C. margaritatus* no Noroeste da América do Sul; Noroeste do Peru, Equador e Sudoeste da Colômbia (Valle del Cauca, Cauca e Nariño), também introduzidos em Cuba e na Jamaica. Na Colômbia a espécie *C. margaritatus* é considerada de interesse médico (GUERRERO-VARGAS *et al.*, 2014). Inicialmente as investigações foram realizadas sobre a composição proteica e atividade citotóxica. Os primeiros estudos foram realizados por García-Calvo *et al.*, (1993), com a purificação, caracterização e a biosíntese da Margatoxina, inibidor seletivo dos canais Kv1.3. Estudos *in-vivo* e *in-vitro* mostraram que esta toxina diminui a reação de hipersensibilidade e melhora os sintomas de doenças autoimunes. Além disso, uma vez que a distribuição tecidual do canal é bastante restrita, o bloqueio do Kv1.3 é um novo alvo para a imunossupressão, e contribui amplamente no desenvolvimento de tratamentos, se o perfil de toxicidade é reduzido, comparado com o dos agentes imunossupressores existentes (KOO *et al.*, 1997; VALVERDE *et al.*, 2004). Também, sabe-se que na pesquisa clínica os fármacos bloqueadores dos canais de potássio são direcionados ao estudo de doenças autoimunes (ORTIZ *et al.*, 2015).

Da mesma forma, Guerrero-Vargas, (2008) estudou a composição proteica da espécie Colombiana *C. margaritatus* e obteve 52 tipos de proteínas e toxinas diferentes, concluindo que a produção em miligrama de proteína é aproximadamente 0,11 mg por cada escorpião e determinou a DL50 estimada em 46,83 mg/kg (camundongos, i.p). Aproximadamente 54% das toxinas apresentaram um intervalo de massas moleculares entre 2,5 a 6,0 kDa, incluindo os bloqueadores de canais de potássio de cadeia curta; 13% no intervalo de 6,5 a 8,0 kDa para Na_v e, finalmente, os 33% restantes, eram pequenos compostos com 2,0 kDa que faziam parte de um grupo de moléculas raramente descritas. No mesmo estudo foram isoladas e caracterizadas duas novas toxinas: Margatoxina 2 (MgTx2) (MM=2,6 kDa) com 24 aminoácidos e três pontes dissulfeto, da família das α -KTx e Margatoxina 3 (MgTx3) (MM = 3,38 kDa) com 30 aminoácidos e três pontes dissulfeto.

Escobar *et al.*, (2003) identificaram toxinas específicas para crustáceos, insetos e roedores, sem atividade fosfolipásica e proteolítica, sem sua maioria proteínas de baixo peso molecular (menor de 14 kDa). Tem-se reportado efeitos neurotóxicos (DUEÑAS, 2009), cardiotoxicos (GUERRERO-VARGAS, 2008) e possível atividade genotóxica (LEYTON-CASTRO & RIASCOS-PALACIOS, 2012). Estudos realizados por Rivera *et al.*, (2010), identificaram um peptídeo com propriedades antibacterianas, que representava aproximadamente 3% da proteína total com peso molecular de 7,3 kDa. Até o momento os efeitos cardiotoxicos da peçonha total foram pouco explorados.

2.7 Escorpião *Centruroides limpidus*

México apresenta 281 espécies de escorpiões e estudos indicam aproximadamente 265.000 casos de escorpionismo no ano 2015 (Epidemiológica, 2015), sendo *C. limpidus* um dos mais perigosos, devido à sua toxicidade (SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ *et al.*, 2016), distribuído no México, nas cidades de Michoacán, Guerrero, Estado do México, Morelos, Puebla e parte de Oaxaca. Seus peptídeos foram purificados, encontrando toxinas seletivas com alvos em mamíferos, insetos e crustáceos (LEBRETON *et al.*; 1994), assim como um dos primeiros peptídeos antimicrobianos, conhecido como CII-dlp (*C. limpidus limpidus* defensin-like peptide), uma substância identificada na hemolinfa do escorpião, como resposta à lesão séptica (RODRÍGUEZ DE LA VEGA *et al.*, 2004). Também foram reportados estudos imunológicos avaliando a resposta do antiveneno Alacramyn e do anticorpo F(ab')₂ para a peçonha de *C. limpidus* (PADILLA *et al.*, 2005). Estudos recentes desenvolveram um novo tipo de anti-veneno com o uso de fragmentos de anticorpos de origem humana para a neutralização desta peçonha. Para isso fizeram a caracterização completa de todos os componentes tóxicos e reportaram uma nova toxina chamada CI13 (OLAMENDI-PORTUGAL *et al.*, 2017).

Dados da literatura apresentam a análise proteômica de *C. limpidus*, com novos componentes encontrados, dentre eles metaloproteínases, hialuronidases e fosfatases (URIBE *et al.*; 2017). Também se conhece a presença de toxinas bloqueadoras de canais de K⁺ como CIITX1 e CIITX2 (MARTIN *et al.*, 1994) e uma toxina bloqueadora para canais de Na⁺ (CI12) (DEHESA-DÁVILA *et al.*, 1996).

2.8 Escorpião *Centruroides noxius*

Das espécies já referidas, este escorpião com distribuição no México é o mais letal do país, distribuído nos estados de Jalisco, Nayarit e Sinaloa. Numerosos estudos reportaram a purificação de toxinas desta peçonha, como descrito a seguir. Seu peptídeo mais conhecido é a noxiustoxina que bloqueia a permeabilidade de canais de K^+ (POSSANI e MARTIN, 1982; CALDERON-ARANDA *et al.*, 1999). Assim como para os outros escorpiões, também foram isoladas e caracterizadas toxinas bloqueadoras de canais de Na^+ (VALDIVIA *et al.*, 1994), toxinas específicas para insetos (SELISKO *et al.*; 1996) e para crustáceos (GARCIA *et al.*, 2003).

As Cobatoxinas I e II que constituem uma subfamília de toxinas bloqueadoras de canais de K^+ foram identificadas por Selisko *et al.*, (1998). Outros compostos descritos foram vinte e três novas sequências similares a Ergtoxin (ErgTx) obtidas mediante sequenciamento direto de peptídeos, utilizando-se glândulas de peçonhas de *Centruroides elegans*, *C. exilicauda*, *C. gracilis*, *C. limpidus limpidus*, *C. noxius* e *C. sculpturatus* (CORONA *et al.*, 2002). A análise global do transcriptoma de *C. noxius* identificou novas famílias de toxinas e perspectivas evolutivas de uma espécie de escorpião ancestral. Também foi reportado que a maioria de toxinas tem afinidade para os canais de Na^+ seguido dos canais de K^+ (RENDÓN-ANAYA; 2012).

Baseados na DL50 das três peçonhas avaliadas nesta pesquisa pode-se identificar três graus de toxicidade. Inicialmente, *C. margaritatus* é considerada a menos letal, fundamentados também nos sintomas do envenenamento como dor, agitação, fraqueza, sudorese e náuseas (BORGES *et al.* 2012). O segundo mais tóxico das peçonhas é *C. limpidus* e *C. noxius* poderia ser o mais cardiotoxico. Na **Figura 2** são apresentados os escorpiões que fizeram parte deste estudo.

Figura 2- Escorpiões estudados com sua distribuição geográfica.



Escorpiões objeto de estudo. A) *Centruroides margaritatus* B) *Centruroides limpidus* C) *Centruroides noxius* D) Mapa de distribuição. **Fonte:** A e C Birdspiders.com. B- Redtox.

2.9 Sistema cardiovascular

O sistema cardiovascular permite a manutenção da pressão arterial e a distribuição de sangue para os tecidos, fornecendo nutrientes vitais e permitindo remover os resíduos do metabolismo celular. Está constituído pelo coração, que apresenta mecanismos autônomos de controle e pela rede de capilares e vasos, que permite o retorno do sangue. O automatismo cardíaco é uma importante propriedade possível devido às células autorritmicas, que são capazes de gerar e propagar impulsos nervosos. Seu sistema de condução especializado consiste em quatro componentes básicos: o nó sinoatrial, as fibras de purkinje, o nó atrioventricular e o feixe de His (BARRET *et al.*, 2014).

O coração apresenta um átrio direito, ao qual chegam as veias cavas superior e inferior, que trazem o sangue venoso para o coração e o átrio esquerdo pelo qual retornam as veias pulmonares, que trazem o sangue oxigenado (arterial) dos pulmões para ser distribuído para o resto do organismo. Os ventrículos têm a função de propelar a sangue que vêm dos átrios para a circulação pulmonar (ventrículo direito) e para a circulação sistêmica (ventrículo esquerdo). As células evidenciam um potencial elétrico (voltagem) através de suas membranas e os três

determinantes mais importantes deste potencial são os íons sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{++}), mais concentrados no líquido intersticial que no interior das células, e íons potássio (K^+) que têm a distribuição oposta (MOHRMAN e HELLER, 2007; GUYTON e HALL, 2017).

O ciclo cardíaco é a sequência de eventos que ocorrem no coração, no decorrer do batimento cardíaco. Inclui eventos mecânicos e elétricos e consiste em dois momentos: diástole e sístole. A diástole é o período de enchimento do coração após uma contração, quando as cavidades cardíacas estão relaxadas, a pressão diminui e o músculo recebe na aurícula esquerda o sangue da veia pulmonar e a aurícula direita recebe o sangue das veias cavas. Ao mesmo tempo as válvulas atrioventriculares se abrem e o sangue entra nos ventrículos. As válvulas semilunares (pulmonar e aórtica) se fecham de modo a impedir que o sangue passe para as artérias, pelo que a pressão nos ventrículos aumenta. Assim, as aurículas contraem-se, o que provoca a saída de mais sangue para os ventrículos e seguidamente o fecho das válvulas atrioventriculares (bicúspide e tricúspide ou mitral).

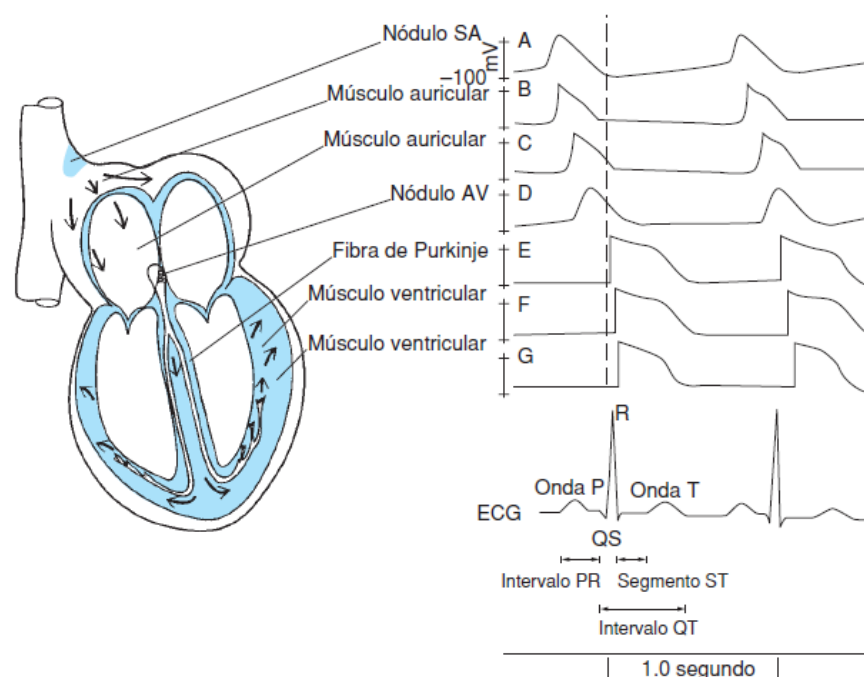
Ao se iniciar a sístole ventricular, a pressão no interior do ventrículo eleva-se rapidamente, fechando as válvulas atrioventriculares. Logo, a pressão no ventrículo abre as válvulas semilunares e assim inicia a ejeção do sangue para os órgãos sistêmicos. À medida que o enchimento cardíaco aumenta durante a diástole, o volume que é ejetado durante a sístole também aumenta. Esse fenômeno (Lei de Starling) é uma propriedade intrínseca do músculo cardíaco (MOHRMAN e HELLER 2007; BARRET *et al.*, 2014).

A função cardíaca é influenciada pela inervação simpática e parassimpática, os estímulos destas vias permitem modificações no bombeamento cardíaco para satisfazer as necessidades homeostáticas do corpo. O coração possui fibras adrenérgicas e quando ativos, os nervos simpáticos liberam noradrenalina, que interage com receptores adrenérgicos β_1 para aumentar a frequência Cardíaca (FC - efeito cronotrópico), velocidade de condução do potencial de ação (efeito dromotrópico) e a força de contração (efeito inotrópico). As fibras nervosas parassimpáticas colinérgicas chegam ao coração através do nervo vago e inervam o nodo sinoatrial (as), nodo atrioventricular (AV) e músculo atrial. A acetilcolina interage com os receptores muscarínicos para reduzir a FC (nodo SA) e gera efeito dromotrópico negativo (BARRET *et al.*, 2014).

A representação gráfica da atividade elétrica do coração em função do tempo é representada pelo eletrocardiograma. A onda P é produzida pela despolarização atrial, o

complexo QRS pela despolarização ventricular e a onda T pela repolarização ventricular. O período compreendido entre o início da onda P e o início do complexo QRS é chamado intervalo PR, e indica o tempo necessário para um potencial de ação se propagar através dos átrios e o nodo AV. A onda R é o episódio mais longo no eletrocardiograma porque as células do músculo ventricular são numerosas e são despolarizadas quase em uníssono (BARRET *et al.*, 2014) (**Figura 3**).

Figura 3- Atividade elétrica do coração.



A figura representa a atividade elétrica do coração: registros da voltagem de uma célula (linhas A até G) e eletrocardiograma de duas derivações. **Fonte:** Mohrman & Heller, (2007).

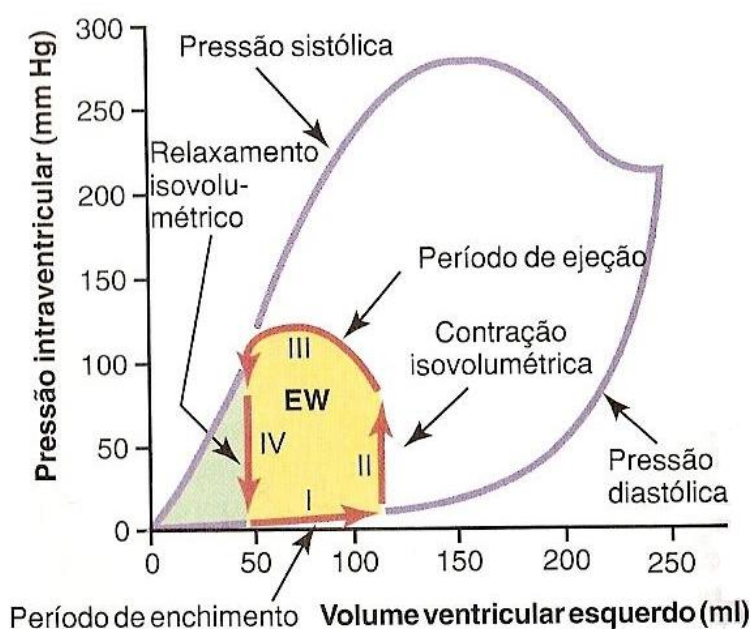
A representação do ciclo cardíaco com a curva de Pressão-Volume do ventrículo esquerdo é uma das melhores formas de expressar a capacidade funcional do coração (MOHRMAN e HELLER, 2007). A **Figura 4** representa a curva de Pressão-Volume, que é descrita a continuação:

- Diástole ventricular
 - No final de uma contração, o ventrículo se relaxa, nesse ponto, ocorre o relaxamento isovolumétrico, com mudança na pressão sem alteração do volume.
 - Quando a pressão do ventrículo é menor que no átrio esquerdo, a valva mitral se abre e o ventrículo passa por duas fases: enchimento rápido e preenchimento lento (diastólico).

➤ Sístole ventricular

- O ventrículo começa a se contrair e a pressão aumenta até ultrapassar a pressão na aorta, chamada contração isovolumétrica porque há uma mudança na pressão sem alteração de volume.
- Posteriormente a válvula aórtica se abre e são iniciadas a ejeção rápida e a ejeção lenta do sangue, até que a pressão ventricular diminua e se torne menor que a pressão aórtica. Neste momento a válvula aórtica é fechada e a ejeção é completada.

Figura 4 - Ciclo pressão volume ventricular.



Fonte: Adaptado de Mohrman & Heller, (2007).

Outra variável importante é o trabalho sistólico pré-recrutável (PRSW), determinado pela regressão linear do trabalho cardíaco com o volume diastólico final. A inclinação da relação PRSW é considerada como o índice de referência de contratilidade devido à sua relativa independência das condições de carga e sua sensibilidade às mudanças no inotropismo (RADOVITS *et al.*, 2009).

2.10 Hemodinâmica sistêmica e os efeitos cardiovasculares gerados pela peçonha de escorpião

A hemodinâmica é o estudo funcional do sangue no interior das estruturas sanguíneas como artérias, veias, vênulas, arteríolas e capilares assim como também da mecânica do coração. O procedimento consiste em inserir um cateter na artéria carótida até o ventrículo esquerdo, e conectado ao transdutor de pressão ligado ao monitor é usado para medir a pressão ventricular esquerda. Antes de iniciar o registro é necessário definir o ponto zero no monitor, mediante a calibração da PVC, da PAM e da PVE, usando um manômetro. O VVE é calibrado com um programa digital.

A vantagem da hemodinâmica sistêmica sobre as outras abordagens disponíveis é que permite uma medição específica do desempenho do ventrículo esquerdo. O cateter foi utilizado pela primeira vez em grandes animais e humanos a partir de meados da década de 1980. Cerca de 15 anos depois, o desenvolvimento técnico de sensores tornou possível aplicar essa abordagem a pequenos mamíferos, permitindo a caracterização detalhada da função cardiovascular em camundongos e ratos (PACHER *et al.*, 2008).

Esta metodologia permite avaliar o desempenho cardíaco, determinado pela contratilidade, pré-carga (pressões de enchimento), pós-carga (resistências) e frequência cardíaca. A pré-carga é determinada pelo comprimento da fibra cardíaca antes de sua contração. De acordo com a lei de Frank-Starling, existe uma relação direta entre o grau de alongamento da fibra na diástole e o subsequente encurtamento da fibra miocárdica na sístole. A pós-carga é a resistência ao esvaziamento do coração, gerada pela tensão, que é a pressão que o ventrículo deve superar para contrair. O débito cardíaco tem relação inversa com pós-carga (GARCÍA *et al.* 2011).

Neste estudo a hemodinâmica sistêmica foi utilizada com a finalidade de identificar os efeitos sistêmicos e cardiovasculares gerados por três peçonhas de escorpião do gênero *Centruroides*, considerando que a gravidade do envenenamento está relacionada com alterações hemodinâmicas e cardiorrespiratórias, com o distúrbio do ritmo cardíaco como maior causa de morte (CUPO & HERING, 2002).

A pressão arterial média é a força exercida pelo sangue contra a parede arterial. É o resultado da interação entre o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular das arteríolas (MOHRMAN e HELLER, 2007). O DC é a quantidade de sangue que expelle o coração em um

minuto (L/min), regulado por fatores como a idade, o tamanho do corpo e as demandas metabólicas. Pode ser obtido por vários métodos invasivos e não invasivos, baseados em imagens (ecocardiografia/ressonância magnética), consumo de oxigênio (princípio de Fick) ou técnicas de termodiluição (HAAG *et al.*, 2018). Neste estudo a técnica empregada foi a ventriculografia esquerda, que estima o DC de forma indireta.

Na técnica de termodiluição, um volume com 5% de glicose ou solução salina é injetado a uma temperatura inferior à do sangue através da via localizada no átrio direito; o líquido se mistura com o sangue produzindo uma mudança na temperatura do sangue que é detectada por um termistor localizado na extremidade distal do cateter na artéria pulmonar. O termistor determina a mudança de temperatura e calcula eletronicamente o DC. Entretanto o método de Fick estabelece que a diferença no conteúdo de oxigênio entre o sangue arterial e o sangue venoso central é diretamente proporcional ao consumo de oxigênio e inversamente proporcional ao DC (GARCÍA *et al.*, 2011). O DC depende do volume sistólico (VS), definido como o volume de sangue que o coração expelle para a aorta durante o período de contração (sístole) e o número de batimentos por minuto (FC).

A elastância arterial é um índice de impedância vascular que é principalmente determinado pela resistência periférica total (RPT) e a FC (MAURER *et al.*, 2006). A RPT é a impedância que encontra o fluxo sanguíneo para percorrer um segmento do leito vascular. De acordo com a lei de Ohm é definida como a diferença de pressão através de um leito vascular dividido pelo fluxo sanguíneo do mesmo. As duas resistências calculadas clinicamente são a resistência vascular sistêmica (RVS) (valor quantitativo da pós-carga do ventrículo esquerdo) e a resistência vascular pulmonar (RVP) (valor quantitativo da pós-carga do ventrículo direito) (NADERI, 2018).

Dentre os parâmetros sistólicos está o trabalho cardíaco (TC), a fração de ejeção e o dP/dt máximo. O TC refere-se ao trabalho realizado pelo ventrículo para ejetar um volume de sangue, e estima a contratilidade (KLABUNDE, 2012). É importante considerar os parâmetros de contratilidade dependentes de carga, como a fração de ejeção (FE) e o dP/dt máx. A FE é a fração volumétrica de sangue ejetada do coração com cada batimento cardíaco (ventrículo esquerdo), sendo um indicador da eficácia do bombeamento para a circulação sistêmica usado para classificar os tipos de insuficiência cardíaca. A FE é calculada dividindo o volume de sangue bombeado do ventrículo esquerdo por batida (volume sistólico) pelo volume de sangue coletado

no ventrículo esquerdo no final do enchimento diastólico (volume diastólico final) (MAURER *et al.*, 2006). Entretanto, o dp/dt é um índice que representa a mudança de pressão durante a contração isovolumétrica (SCHWARZWALD *et al.* 2009).

A relação entre o retorno venoso e a função cardíaca determina os valores da pressão venosa central (PVC) e do DC do momento. Um aumento no retorno venoso produzirá um aumento no DC em um coração saudável e a PVC permanecerá dentro dos limites normais. A PVC corresponde à pressão sanguínea ao nível do átrio direito e da veia cava, sendo um reflexo do retorno venoso, um importante componente do desempenho cardíaco (pré-carga), determinando o volume sistólico (GARCÍA *et al.*, 2011).

Outros parâmetros avaliados no sistema da hemodinâmica foram os índices diastólicos como o tempo de relaxamento isovolumétrico (Tau) e o dP/dt mínimo. O Tau é um intervalo no ciclo cardíaco que acontece durante o fechamento da válvula aórtica, até o início do preenchimento pela abertura da válvula mitral. Pode ser usado como um indicador de disfunção diastólica. A taxa de variação de pressão pelo tempo (dP/dt) é um dos índices isovolumétricos utilizado para a avaliação da função sistólica ventricular esquerda, e avalia a relação força-velocidade durante a fase pré-ejetiva. O dP/dt min é a mínima velocidade da diminuição da pressão ventricular esquerda (PVE), da mesma forma o dP/dt máx é a máxima velocidade do aumento da PVE (DAVIS *et al.*, 1999).

Com os parâmetros hemodinâmicos descritos, pode-se avaliar a função cardiovascular, considerando que algumas referências relatam a existência da correlação entre os efeitos cardiovasculares e a picada de escorpião (*C. limpidus*, *T. serrulatus*, *Leiurus quinquestriatus*, *Buthotus judaicus*); descritos em duas fases: uma inicial caracterizada por hipertensão, taquicardia e aumento da contratilidade miocárdica, seguida de um estágio hipocinético com hipotensão e comprometimento da função ventricular esquerda (GUERON *et al.*, 1992; OSNAYA-ROMERO *et al.*, 2001; FUKUHARA *et al.*, 2003). Também foi estudada a função dos potentes vasodilatadores óxido nítrico e citocinas na hipotensão terminal que é usualmente observada após envenenamento (ISMAIL *et al.*, 1973; ABDOON e FATANI, 2009).

Na revisão da literatura, identifica-se que os estudos sobre a hemodinâmica sistêmica têm sido com peçonhas de escorpiões com distribuição na África e Meio Oriente. Um clássico estudo foi na década dos anos 80 com *Leiurus quinquestriatus*, usando-se cachorros e encontrou-se

aumento das pressões sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, das pressões arteriais pulmonares e sistêmicas e na contratilidade ventricular esquerda (GUERON *et al.*, 1980).

Outro estudo com esta peçonha, também em cachorros, registrou aumento do trabalho cardíaco, do débito cardíaco, da FC e da PAM. Estes dois últimos parâmetros apresentaram uma resposta bifásica, com posterior diminuição (TARASIUK *et al.*, 1994). Estudos anteriores avaliaram em ratos a peçonha de *Buthus martensii*, reportando aumento da PAM, sem alteração da FC (WANG *et al.*, 1994). Também foram descritos os efeitos hemodinâmicos para *Buthus occitanus*, gerando aumento da PAM, do dp/dt e da resistência periférica total (ZEGHAL *et al.*, 2000).

Um estudo clínico reportou disfunção ventricular esquerda em pessoas picadas por *Androctonus australis*, com aumento da frequência cardíaca e resistência periférica total e diminuição da pressão arterial sistólica e fração de ejeção (NOUIRA *et al.*, 1995). Os trabalhos apresentados neste estudo mostraram que, frente à falta de avaliações sistêmicas das três espécies mencionadas, fazia-se necessária uma análise dos efeitos e interações existentes entre a peçonha total e o sistema cardiovascular, considerando a alta incidência de escorpionismo nos países tropicais.

3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A peçonha de escorpião é uma ferramenta importante nas pesquisas desenvolvidas na área da farmacologia, e isso se dá pela variedade de toxinas presentes na sua composição. Os efeitos cardiovasculares gerados após a picada de escorpião são uns dos principais eventos de envenenamento grave e os casos clínicos e experimentais reportados indicam efeitos como arritmias, falha cardíaca, alterações na contratilidade do ventrículo esquerdo, associado com edema pulmonar agudo e infarto agudo do miocárdio.

Diante ao exposto, visto que o gênero *Centruroides* apresenta uma ampla variedade de espécies de importância médica, com algumas delas altamente tóxicas e considerando a inexistência de estudos relatando os efeitos cardiovasculares destas peçonhas, o interesse crescente na caracterização dos seus efeitos biológicos e farmacológicos, torna-se relevante. Desta forma, o foco de investigação deste estudo experimental foi identificar as alterações sistêmicas *in-vivo* induzidas pelas peçonhas das espécies *C. margaritatus* da Colômbia e *C. limpidus* e *C. noxius* do México. Assim, pretende-se contribuir com o conhecimento dos efeitos tóxicos e cardiovasculares, que venham a auxiliar diagnósticos e tratamentos no envenenamento e a identificação de toxinas com potencial terapêutico.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Analisar os efeitos das peçonhas dos escorpiões *C. margaritatus*, *C. limpidus* e *C. noxius*, visando identificar as alterações sistêmicas e cardiovasculares em ratos.

4.2 Específicos

Utilizando-se peçonha de *C. margaritatus*, *C. limpidus* e *C. noxius* pretende-se:

- ✓ Avaliar as alterações hemodinâmicas.
- ✓ Mensurar os efeitos no eletrocardiograma.
- ✓ Identificar as alterações histopatológicas cardiopulmonares da peçonha de *C. noxius*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção das peçonhas

A peçonha de *C. margaritatus* foi adquirida de escorpiões coletados pela autora no estado do Cauca, no município do Patía (Colômbia), especialmente no setor do Bordo, mantidos em caixas e adaptados ao micro-habitat com controle de variáveis de luminosidade. Sua alimentação consistiu em aracnídeos e insetos e água constante (algodão úmido). Foram mantidos no Centro de Investigações Biomédicas (CIBUC) da Universidade do Cauca (Unicauca) na Colômbia. O cuidado e a extração da peçonha foram realizados pela autora e os integrantes treinados do Grupo de Investigações Herpetológico e Toxinológico (Unicauca).

A extração da peçonha foi obtida mediante um gerador de impulsos elétricos; aplicando entre 50 e 55 milivolts. A técnica foi padronizada por GUERRERO VARGAS, (2002) e consistiu em colocar o agulhão (ferrão) do escorpião no eppendorf e aplicar um impulso elétrico no quarto segmento do abdômen coletando gota a gota a peçonha. Cada escorpião foi estimulado no máximo com cinco impulsos elétricos, para não alterar os músculos da glândula venenosa. A peçonha resultante, que apresenta aspecto branco, foi centrifugada, obtendo uma fração insolúvel, não tóxica, constituída por muco-proteínas e frações de membranas. A parte solúvel é particularmente rica em proteínas básicas neurotóxicas, enzimas e substâncias orgânicas (lipídeos, carboidratos, nucleosídeos, peptídeos, nucleotídeos e aminoácidos livres) e inorgânicas (íons). Para sua preservação foi liofilizado e refrigerado a -20°C até o uso.

As peçonhas de *C. limpidus* e *C. noxius*, originárias do México, foram cedidas pelo professor Lourival Possani do Instituto de Biotecnologia da Universidade Nacional Autônoma do México. As peçonhas foram armazenadas a -20°C. O método da coleta e processamento da peçonha foi também por estimulação elétrica (modificado) como já foi exposto para *C. margaritatus* (PADILLA *et al.*, 2003).

5.2 Animais experimentais

Para os experimentos foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com peso entre 310 a 350 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da

Universidade Federal do Ceará -UFC. Durante o período de adaptação e experimentação, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em um ambiente com temperatura e luminosidade controladas, um ciclo de 12h claro/escuro, com acesso a água e ração *ad libitum*, na sala de quarentena do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

Todos os tratamentos e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará – UFC (Protocolo nº 49/2017), de acordo com as diretrizes apresentadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

5.3 Modelos experimentais

5.3.1 Hemodinâmica sistêmica

É uma metodologia que foi realizada na Universidade Estadual do Ceará, no Laboratório de Farmacologia Cardio-Renal (LAFCAR), com a finalidade de estudar as alterações hemodinâmicas em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) normotensos anestesiados, com diferentes doses cumulativas, induzidas pelas peçonhas brutas dos escorpiões *C. margaritatus*, *C. limpidus* e *C. noxius*. A **Figura 5** representa os grupos experimentais de PCm e PCl e a **Figura 6** indica o procedimento para PCn.

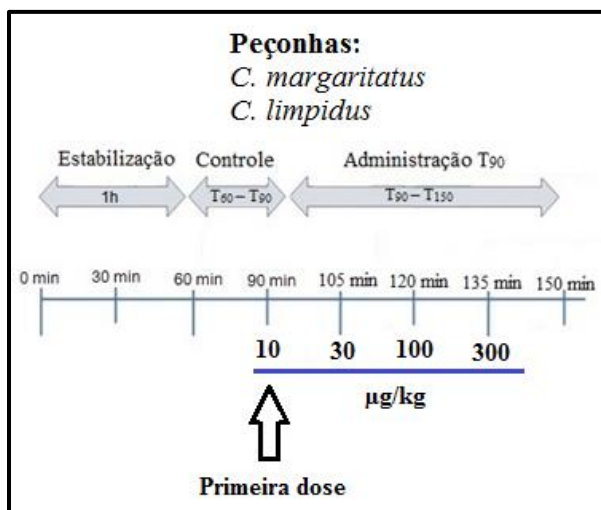
Para preparar as doses, inicialmente, foi pesado 1 mg de peçonha liofilizada e diluído em 1000 µl de solução salina (solução 1), para fazer as doses de 60, 100 e 300 (µg/kg). Uma segunda solução foi realizada, diluindo 100 µl (solução 1) em 1000 µl de salina, para obter as doses de 1, 10, e 30 (µg/kg).

Grupos experimentais:

- i) **Controle Interno:** Ratos Wistar permaneceram os primeiros 30 min sem administração de substâncias.
- ii) **Grupo peçonha *C. margaritatus*:** Diferentes doses da peçonha (10, 30, 100 e 300 µg/kg) foram administradas via endovenosa (n=6) em ratos Wistar.
- iii) **Grupo peçonha *C. limpidus*:** Diferentes doses da peçonha (10, 30, 100 e 300 µg/kg) foram administradas via endovenosa (n=6) em ratos Wistar.

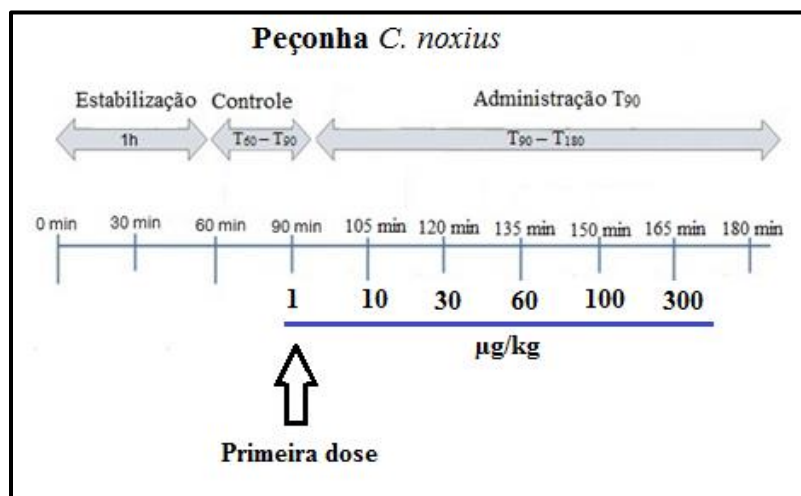
- iv) **Grupo peçonha *C. noxius***: Diferentes doses da peçonha (1, 10, 30, 60, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) foram administradas via endovenosa (n=6) em ratos Wistar.

Figura 5 - Desenho experimental, grupo *C. margaritatus* e *C. limpidus*.



Fonte: Autor.

Figura 6 - Desenho experimental, grupo *C. noxius*.



Fonte: Autor.

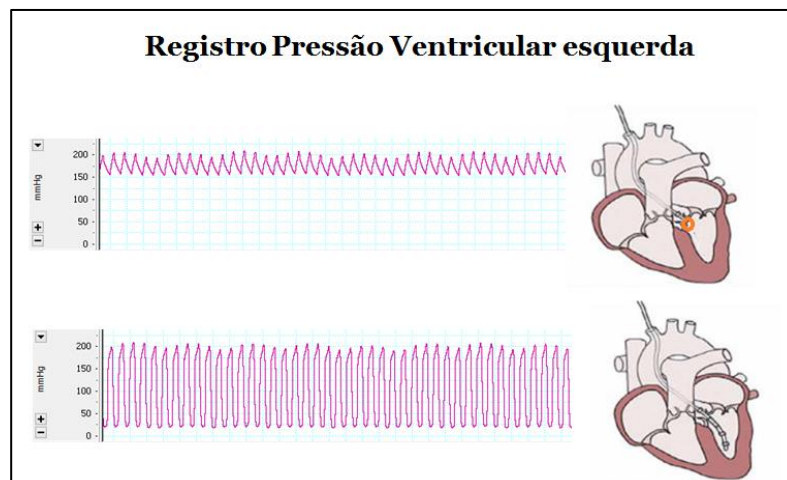
Técnica cirúrgica

Ratos Wistar machos (310 – 350 g) foram anestesiados com pentobarbital (60 mg/kg, ip). Após a perda dos reflexos de dor profunda, o procedimento cirúrgico começou com a secção da linha mediana da região cervical ventral até a exposição da traqueia para a realização da traqueostomia usando uma cânula de polietileno (PE 240), facilitando a ventilação e aspiração de

possíveis secreções respiratórias. A pressão venosa central foi continuamente monitorada por meio de uma cânula inserida na veia jugular e acoplada ao transdutor de pressão SP844. A pressão arterial média (PAM) foi continuamente registrada também com um transdutor SP844 (ADInstruments, Sidney, Australia) acoplado a uma cânula inserida na artéria femoral. Para a administração da peçonha, foi realizada a exteriorização da veia femoral seguida de canulação (PE 10).

Após o acesso à região medial esquerda e identificação do feixe vâsculo-nervoso, procedeu-se o isolamento da artéria carótida direita, que foi canulada com um cateter de pressão-volume (SPR-838, Millar instruments; Houston, TX), introduzido até o ventrículo esquerdo para simultaneamente medir o volume e a pressão ventricular esquerda (**Figura 7**).

Figura 7- Representação da PVE durante o procedimento cirúrgico.



Esquema da forma da onda da PVE quando o cateter (SPR- 838) é inserido na carótida e passa pelo átrio até chegar ao ventrículo esquerdo. **Fonte:** autor.

Concluída a cirurgia, o animal anestesiado passou por um período de 1 hora de estabilização e controle interno de 30 min. Quando necessário, houve suplementação da anestesia (um terço da dose inicial -pentobarbital 60 mg/kg). Após este período, administrou-se por via intravenosa 200 µl de solução (peçonha solubilizada em solução salina 0,9%). Realizou-se uma curva cumulativa dose resposta (10, 30, 100 e 300 µg/kg) para PCm e PCl e para PCn, além das já referidas foram avaliadas doses intermediárias de 1 e 60 µg/kg considerando a toxicidade desta peçonha, como foi descrito no desenho experimental. O intervalo entre as doses foi de aproximadamente 15 minutos.

Os dados foram adquiridos por meio do programa ADInstrument Powerlab System e analisados através do software Labchart 7. Os parâmetros obtidos mediante o programa foram: fração de ejeção, constante de relaxamento ventricular (Tau), trabalho sistólico, elastância arterial, dP/dt máximo e mínimo, pressão arterial média, pressão venosa central, exceto débito cardíaco ($VS*FC$) e resistência vascular periférica (PAM/DC). Os parâmetros avaliados neste estudo são apresentados na **Tabela 3**.

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados com cloreto de potássio (KCl 3M) via endovenosa. No grupo de *C. noxius*, os animais ainda anestesiados foram exanguinados, para a coleta do coração e pulmão. Para o estudo histopatológico, os órgãos coletados foram fixados em formalina neutra 10%, incluídos em parafina, realizadas secções em micrótomo (5 μ m) e corados com hematoxilina e eosina, processados pela técnica Débora Rejane Alves Calvante. As alterações foram examinadas em microscópio óptico (NIKON) em aumento de 200x e 400x, pelo professor Mário Rogério Lima Mota, no Laboratório de Patologia Bucal.

5.3.2 Eletrocardiograma (ECG)

Finalizados os procedimentos cirúrgicos da hemodinâmica sistêmica, eletrodos subcutâneos foram implantados, em número de três (membros superiores esquerdo e direito; linha hemi-clavicular esquerda com rebordo costal inferior), acoplados a um equipamento PowerLab (ADI instruments, Sidney, Austrália) e o ECG continuamente gravado usando o software LabChart 7 na ausência (controle interno) ou presença da administração endovenosa das peçonhas em estudo.

5.3.3. Análise estatística

Inicialmente foi feita a análise de normalidade de Kolmogorov Smirnov. Os dados foram comparados por análise de variância ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett. A probabilidade de $P < 0,05$ indicando significância estatística, utilizando o programa GraphpadPrism ® versão 6.0.

Tabela 3 - Parâmetros hemodinâmicos avaliados.

Abreviação	Parâmetro	Valores de referência para ratos
PAM (mmHg)	Pressão arterial média	93-120
DC (ml/min)	Débito Cardíaco	42-62
FC (bpm)	Frequência cardíaca	350-440
VVE (μ l)	Volume ventricular esquerdo	140 \pm 7
EA (mmHg/ μ l)	Elastância arterial	0.1-0.5
PVC (mmHg)	Pressão venosa central	0.2 \pm 0.1
RVP	Resistência vascular periférica	2,2 \pm 0,1
Índices diastólicos		
Tau (ms)	Constante de relaxamento ventricular	7-13
dP/dt mín (mmHg/s)	Pressão em função do tempo mínimo	-5970,-9675
Índices sistólicos		
dP/dt máx (mmHg/s)	Pressão em função do tempo máxima	7600-15876
FE (%)	Fração de ejeção	42-87
TC	Trabalho cardíaco	12800-21000

Valores de referência de: Treskatsch et al., (2014) e Pacher et al., (2008).

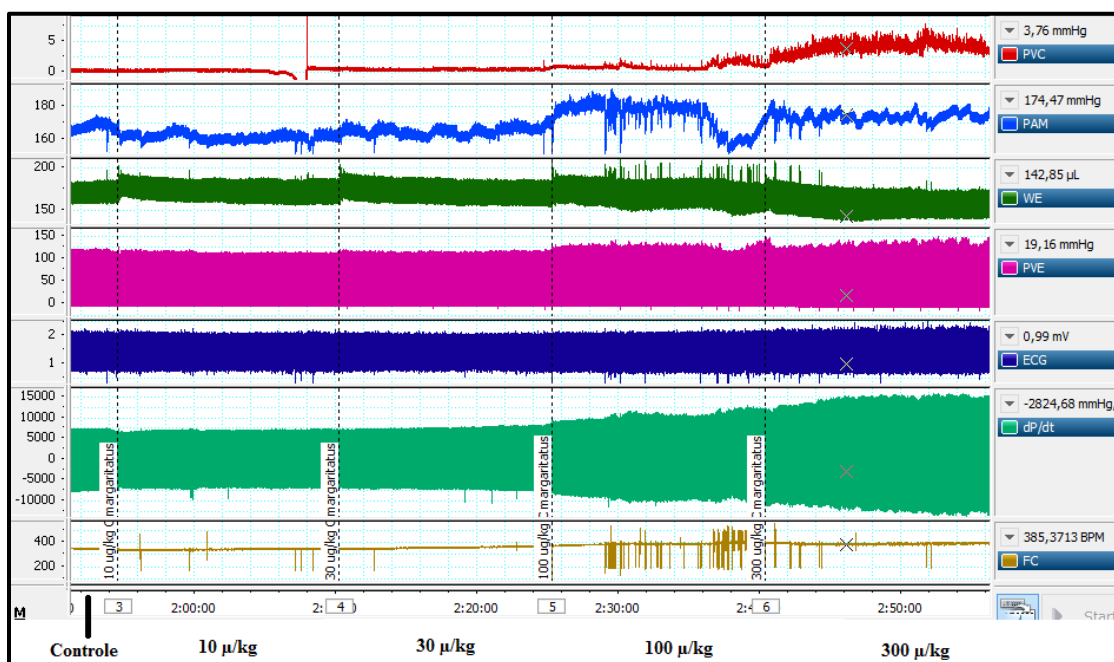
6 RESULTADOS

6.1 Registro da hemodinâmica sistêmica

6.1.1 Parâmetros avaliados com a peçonha de *C. margaritatus*

Na hemodinâmica sistêmica foram administradas doses crescentes da peçonha de *C. margaritatus* (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A **Figura 8**, representa o registro do programa Lab Chart 7, no qual o eixo X apresenta os tempos avaliados do controle e as diferentes doses administradas e o eixo Y apresenta as variáveis como Pressão Venosa Central (PVC), seguido da Pressão Arterial Média (PAM), Volume Ventricular Esquerdo (VVE), Pressão Ventricular Esquerda (PVE), Eletrocardiograma (ECG), dP/dt e Frequência Cardíaca (FC).

Figura 8 - Registro representativo da hemodinâmica sistêmica para *C. margaritatus*.



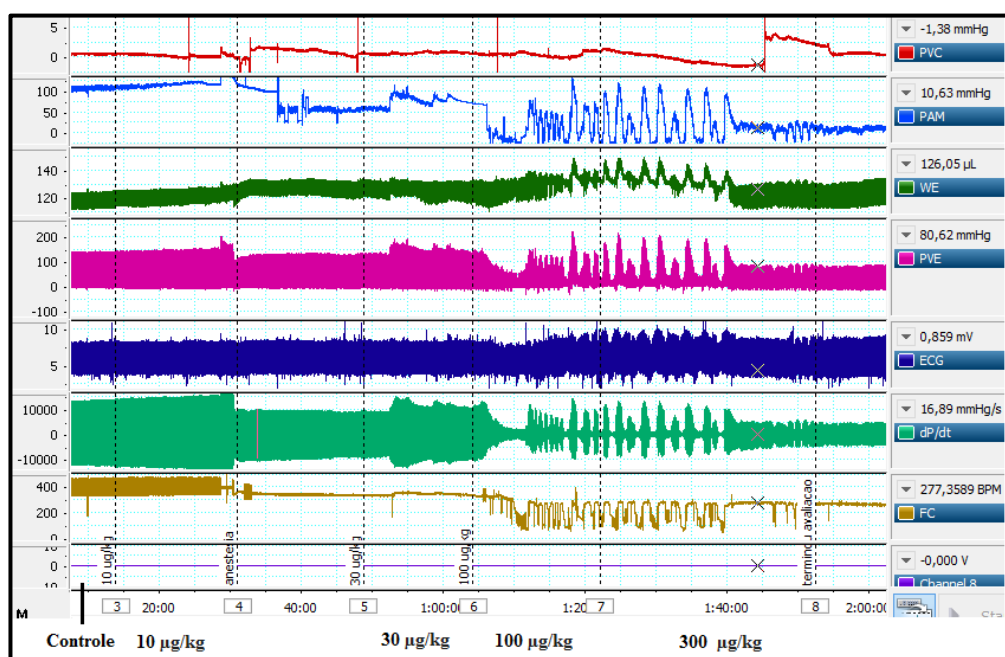
Variáveis avaliadas na hemodinâmica sistêmica. No primeiro canal está registrada a PVC. No segundo canal a PAM. No terceiro canal o VVE. No quarto canal a PVE. No quinto canal o ECG. No sexto canal o dP/dt e no sétimo canal a FC. Registro de $n=1$.

6.1.2 Parâmetros avaliados com a peçonha de *C. limpidus*

Foram administradas doses crescentes da peçonha de *C. limpidus* (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Para a dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, após 10 min, os animais apresentaram alterações como

contrações musculares, parada respiratória intermitente e arritmias, também foram observadas oscilações na pressão arterial média, volume de ejeção ventricular, ECG, dP/dt e frequência cardíaca (**Figura 9**). O envenenamento com *C. limpidus* gerou secreção traqueal viscosa, cianose, dificuldade respiratória e bradicardia.

Figura 9 - Registro representativo da hemodinâmica sistêmica para *C. limpidus*.

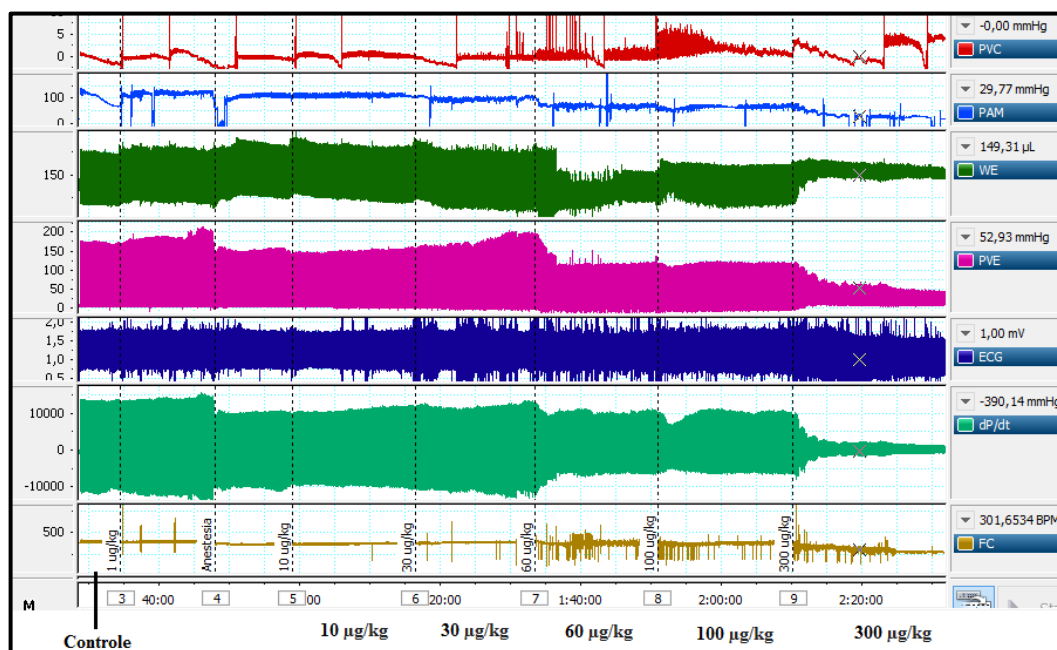


Variáveis avaliadas na hemodinâmica sistêmica. No primeiro canal está registrado a PVC. No segundo canal a PAM. No terceiro canal o VVE. No quarto canal a PVE. No quinto canal o ECG. No sexto canal o dP/dt e no sétimo canal a FC. Registro de n=1.

6.1.3 Parâmetros avaliados com a peçonha de *C. noxius*

A peçonha de *C. noxius* foi avaliada em doses de 1, 10, 30, 60, 100 e 300 ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Iniciou-se com a dose de $1\mu\text{g}/\text{kg}$, devido a sua baixa DL50 comparada as outras peçonhas. Com a dose de $30\mu\text{g}/\text{kg}$, os animais apresentaram pilo-ereção, contrações e cianose. A partir da dose de $60\mu\text{g}/\text{kg}$ observou-se salivagem excessiva, assim como diminuição da pressão venosa central, pressão arterial média, volume de ejeção ventricular, pressão ventricular esquerda e dP/dt. Também houve diminuição constante da atividade sistêmica até o final da avaliação, sem presença de oscilações bifásicas como no registro de *C. limpidus*. Na dose de $100\mu\text{g}/\text{kg}$, houve dificuldade respiratória, movimentos contráteis e pouca salivagem (**Figura 10**).

Figura 10 - Registro representativo da hemodinâmica sistêmica para *C. noxius*.



Variáveis avaliadas na hemodinâmica sistêmica. No primeiro canal está registrado a PVC. No segundo canal a PAM. No terceiro canal o VVE. No quarto canal a PVE. No quinto canal o ECG. No sexto canal o dP/dt e no sétimo canal a FC. Registro de n=1.

6.2 Efeitos gerados por *C. margaritatus*, *C. limpidus* e *C. noxius* no envenenamento

A **Tabela 4** apresenta um resumo dos efeitos sintomáticos encontrados durante a avaliação dos grupos.

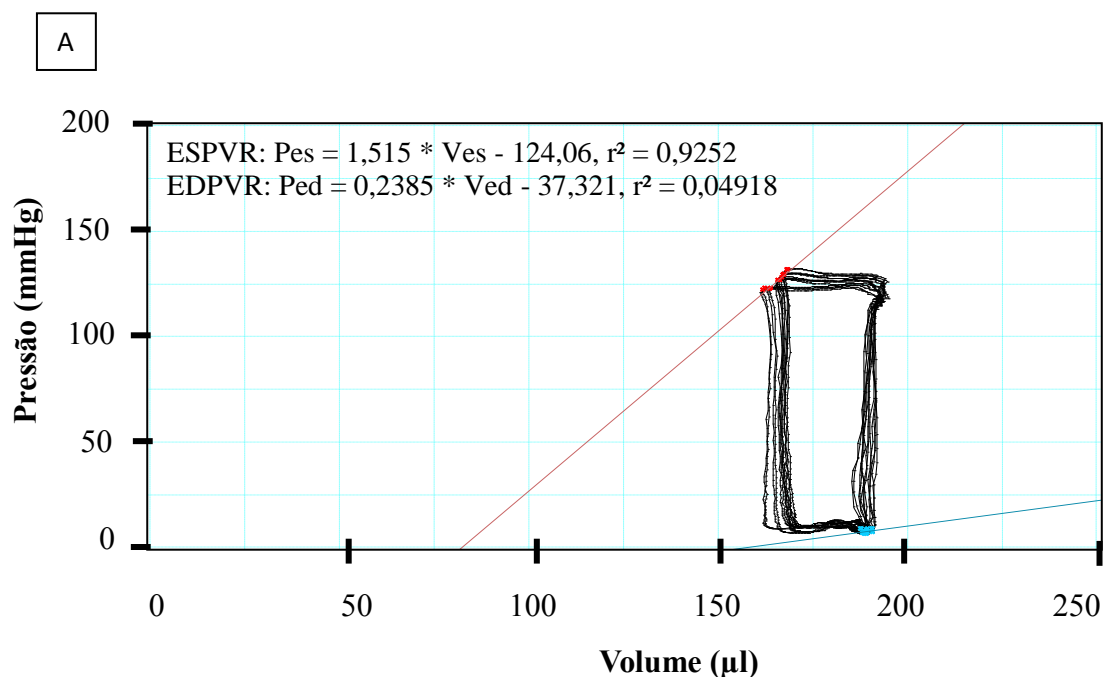
Tabela 4 - Resultados dos efeitos sintomáticos de envenenamento gerados pela peçonhas de *C. margaritatus* (Cm), *C. limpidus* (Cl) e *C. noxius* (Cn).

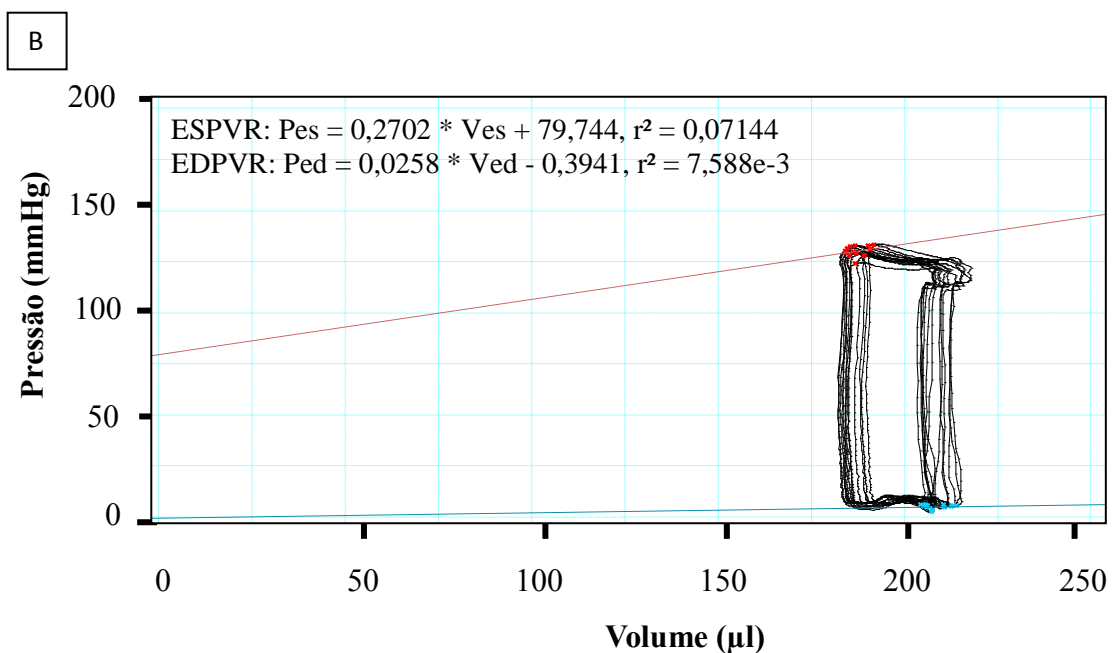
Parâmetros	Espécie		
	<i>C. m</i>	<i>C. l</i>	<i>C. n</i>
Cianose	X	X	X
Secreção	X	X	X
Convulsão		X	
Contrações involuntárias		X	X
Taquipneia		X	X
Bradipneia		X	X
Pilo-ereção	X	X	X
Sialorreia		X	X
Mastigação		X	
Óbito: (100µg/kg)		1	1
(300µg/kg)	1	1	3

6.3 Efeitos promovidos pela PCm, PCI e PCn na curva pressão-volume e no PRSW.

Conforme a **Figura 11** apresenta-se a curva pressão-volume de aproximadamente 15 ciclos de um único registro (representativo do n=6) da pressão ventricular esquerda (PVE) para a hemodinâmica de *C. margaritatus* (Cm), comparando controle interno com a dose de 100 µg/kg. Observou-se que a contratilidade foi inalterada, com a PVE constante. A análise do trabalho sistólico pré-recrutável (PRSW), apresenta a relação entre trabalho cardíaco e volume diastólico final. O PRSW para o grupo de Cm indica aumento do trabalho cardíaco, representando os ciclos analisados como pontos vermelhos (**Figura 12**). No grupo de *C. limpidus*, nas mesmas condições de avaliação (100 µg/kg) gerou diminuição da contratilidade (**Figura 13**), e de acordo com a **Figura 14**, o PRSW indicou queda do trabalho cardíaco. Da mesma forma na avaliação do grupo de *C. noxius* (100 µg/kg) gerou diminuição da contratilidade (**Figura 15**) e do trabalho cardíaco (**Figura 16**).

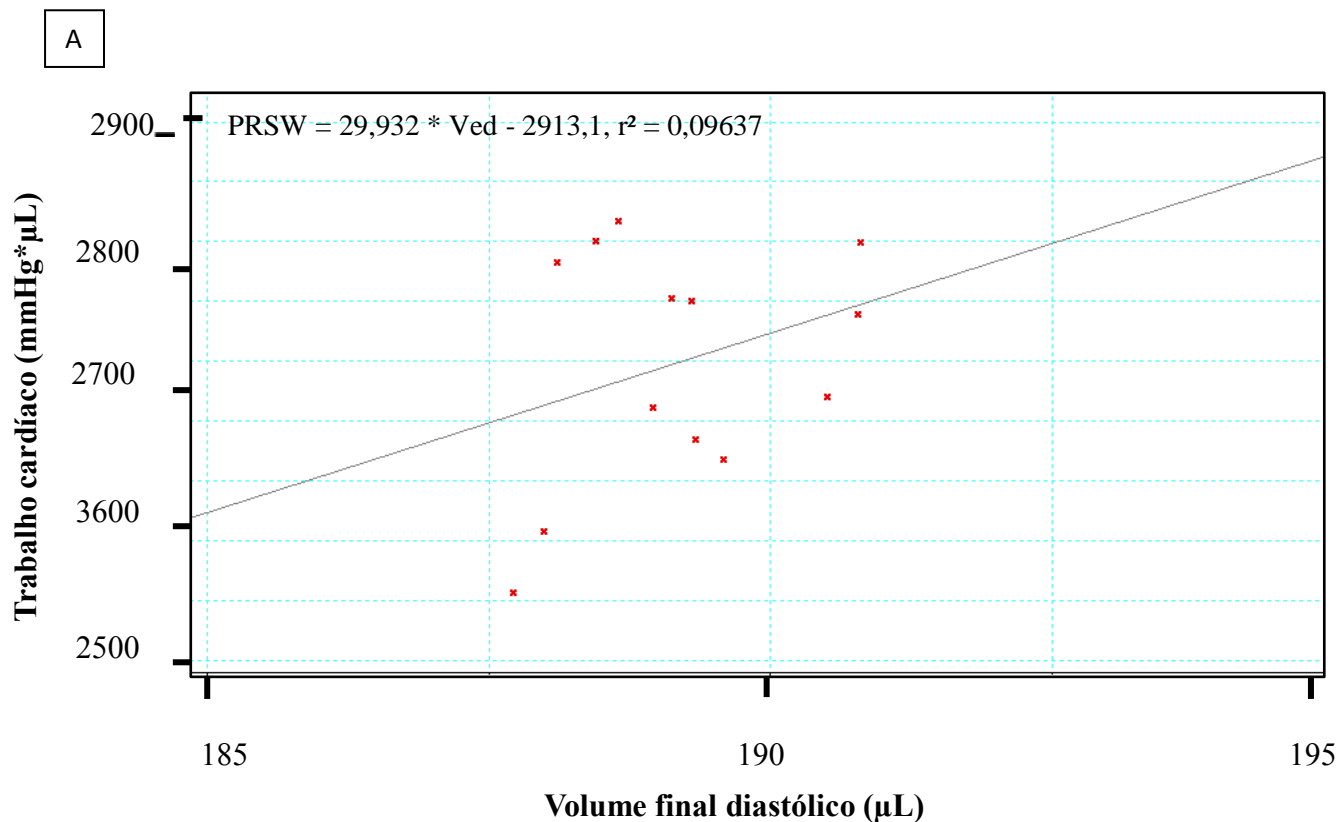
Figura 11 – Efeito da peçonha de *C. margaritatus* sobre a curva pressão-volume da hemodinâmica sistêmica.



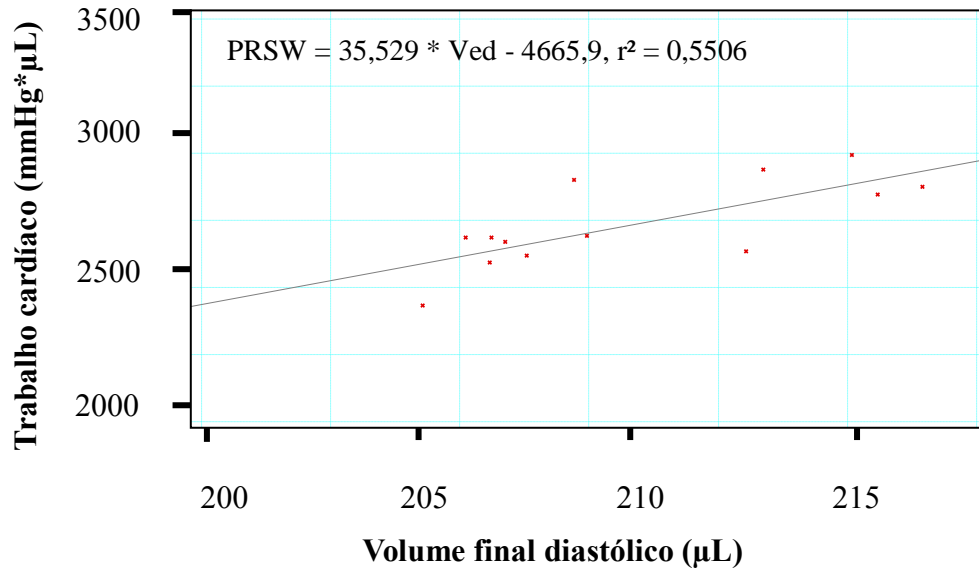


Obtenção da curva pressão-volume do ventrículo esquerdo a partir dos dados da hemodinâmica. O ESPVR (relação pressão-volume sistólica final), linha vermelha, representa a elastância sistólica final, que fornece um índice de contratilidade miocárdica. O EDPVR (relação pressão-volume diastólica final), linha azul, representa a capacitância e a função diastólica. (A) Controle. (B) Dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ da peçonha de *C. margaritatus*. $n=1$.

Figura 12 – Efeito da peçonha de *C. margaritatus* sobre o PRSW da hemodinâmica sistêmica.



B

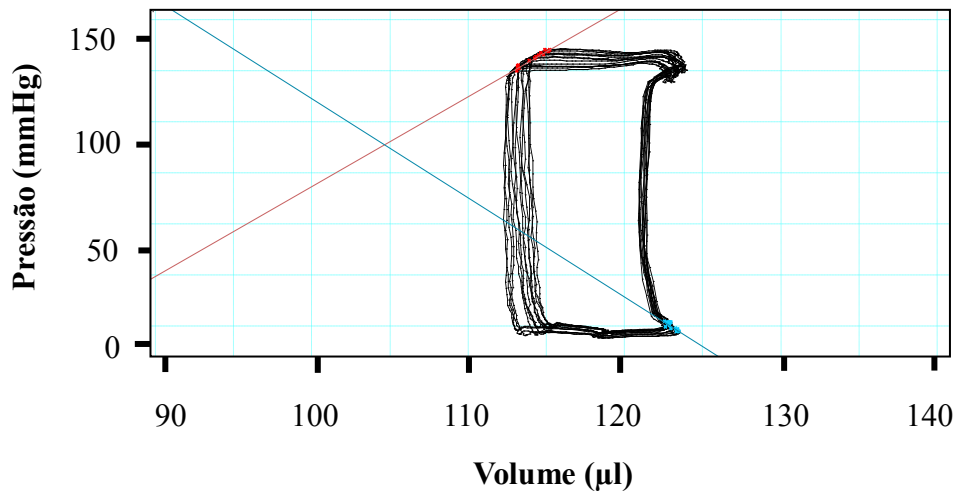


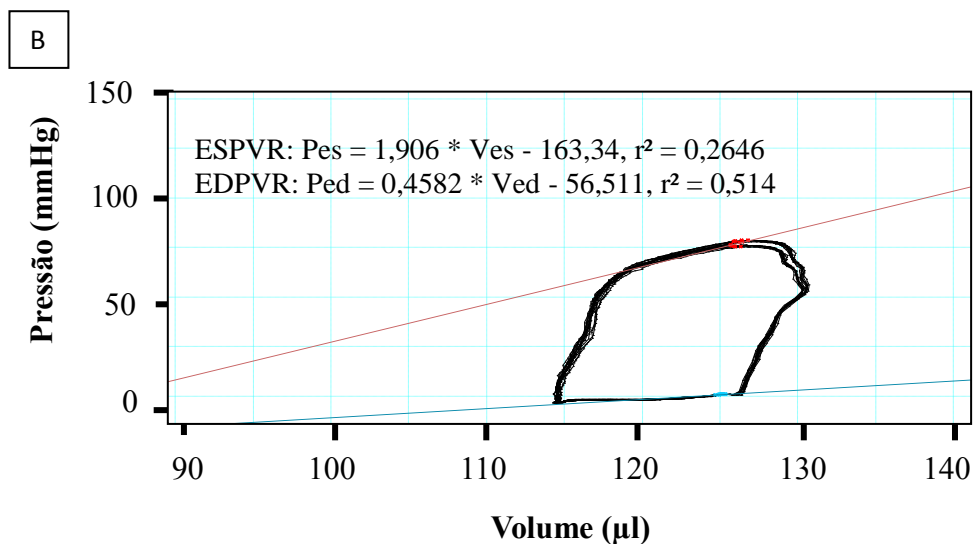
Obtenção do PRSW do ventrículo esquerdo a partir dos dados da hemodinâmica. Os pontos vermelhos representam os ciclos avaliados. (A) Controle. (B) Dose de 100 µg/kg da peçonha de *C. margaritatus*. n=1.

Figura 13 - Efeito da peçonha de *C. limpidus* sobre a curva pressão-volume da hemodinâmica sistêmica.

A

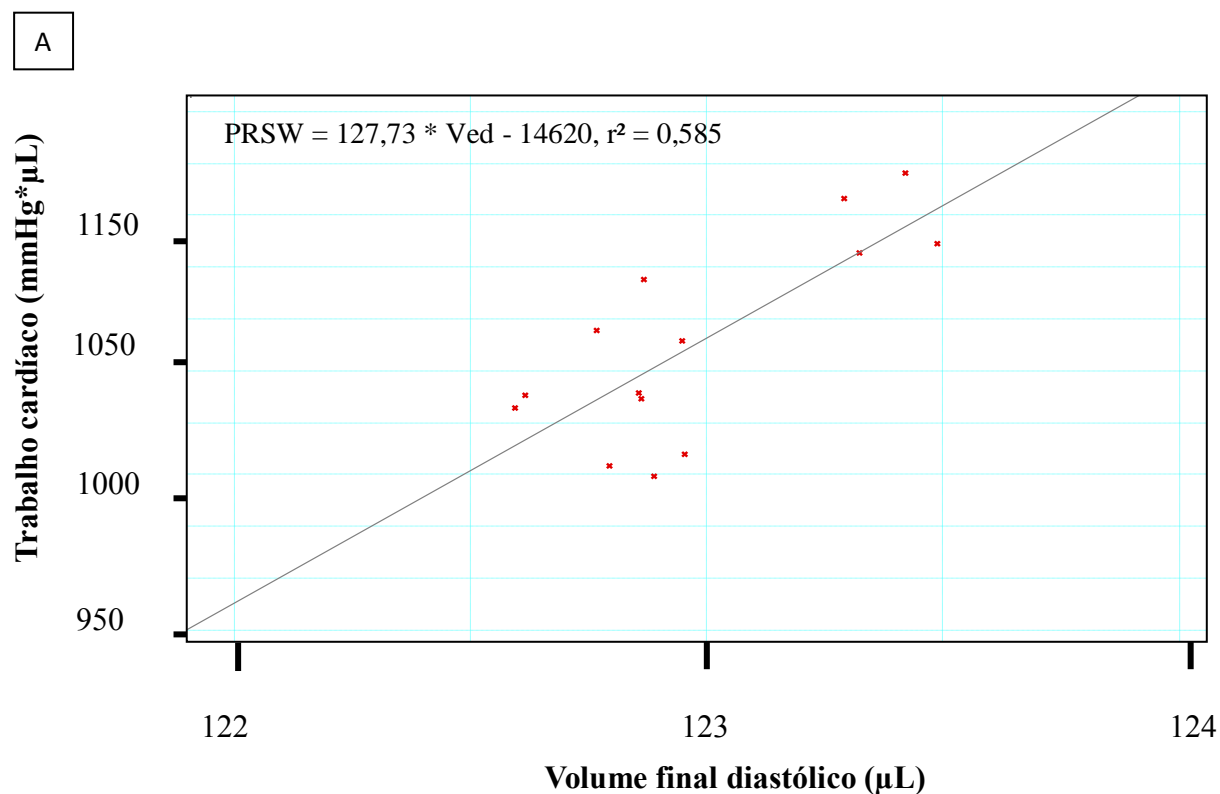
ESPVR: $Pes = 4,39 * Ves - 370,3$, $r^2 = 0,9594$
 EDPVR: $Ped = -4,832 * Ved + 594,47$, $r^2 = 0,6391$

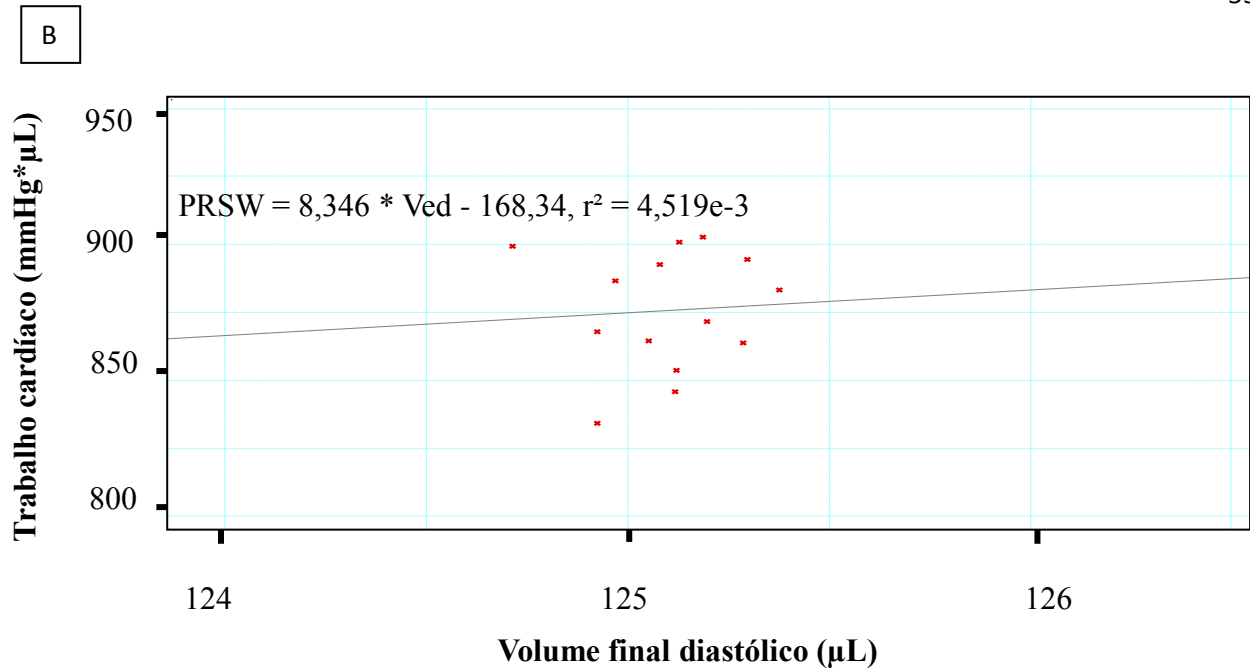




Obtenção da curva pressão-volume do ventrículo esquerdo a partir dos dados da hemodinâmica. O ESPVR (relação pressão-volume sistólica final), linha vermelha, representa a elastância sistólica final, que fornece um índice de contratilidade miocárdica. O EDPVR (relação pressão-volume diastólica final), linha azul, representa a capacitância e a função diastólica. (A) Controle. (B) Dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ da peçonha de *C. limpidus*. $n=1$.

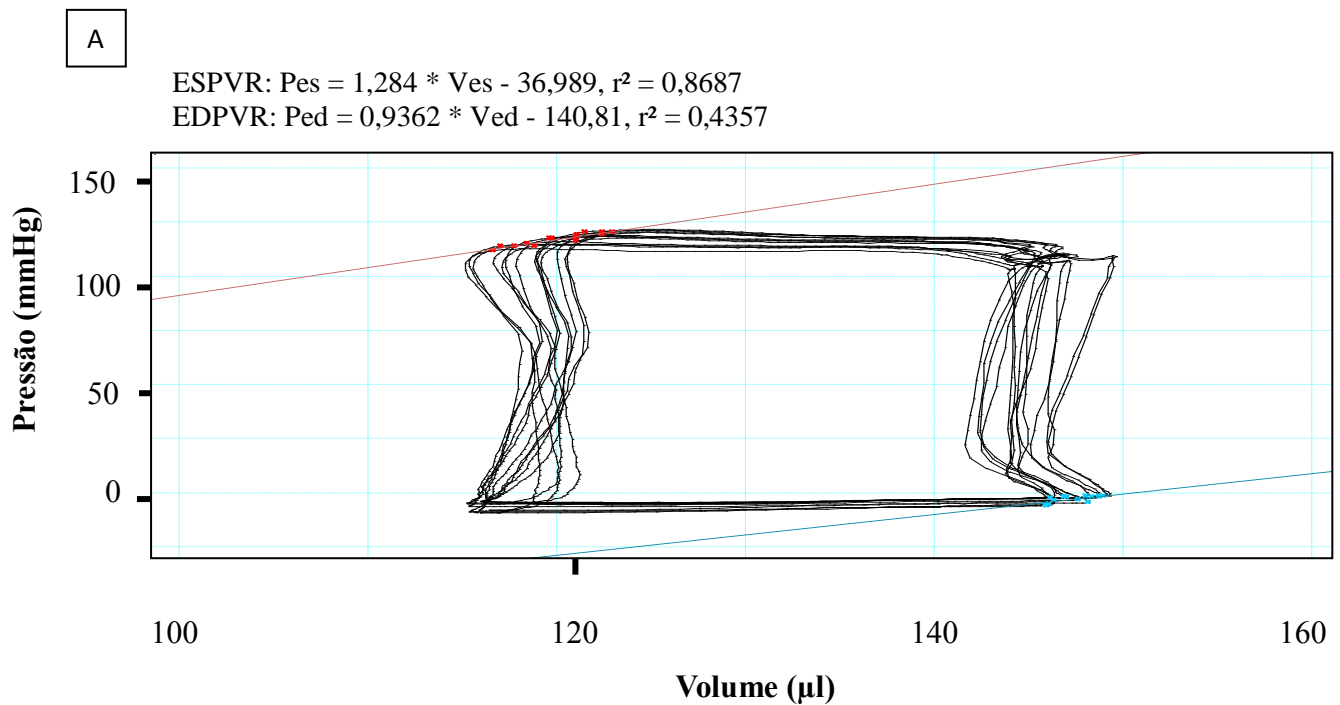
Figura 14 - Efeito da peçonha de *C. limpidus* sobre o PRSW da hemodinâmica sistêmica.



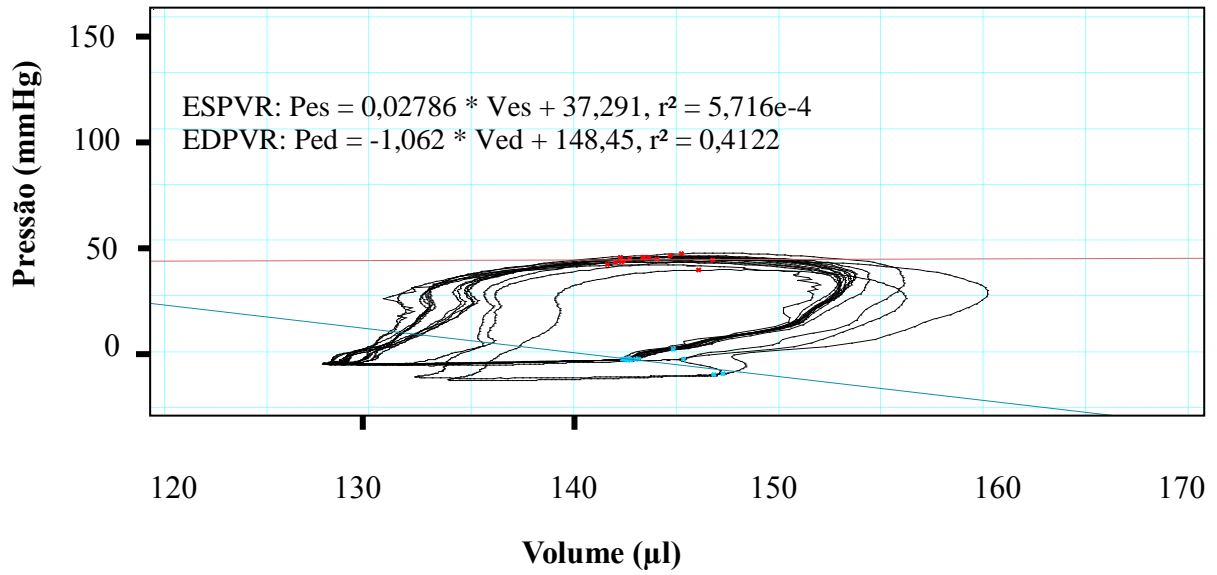


Obtenção do PRSW do ventrículo esquerdo a partir dos dados da hemodinâmica. Os pontos vermelhos representam os ciclos avaliados. (A) Controle. (B) Dose de $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ da peçonha de *C. limpidus*. $n=1$.

Figura 15 - Efeito da peçonha de *C. noxius* sobre a curva pressão-volume da hemodinâmica sistêmica.



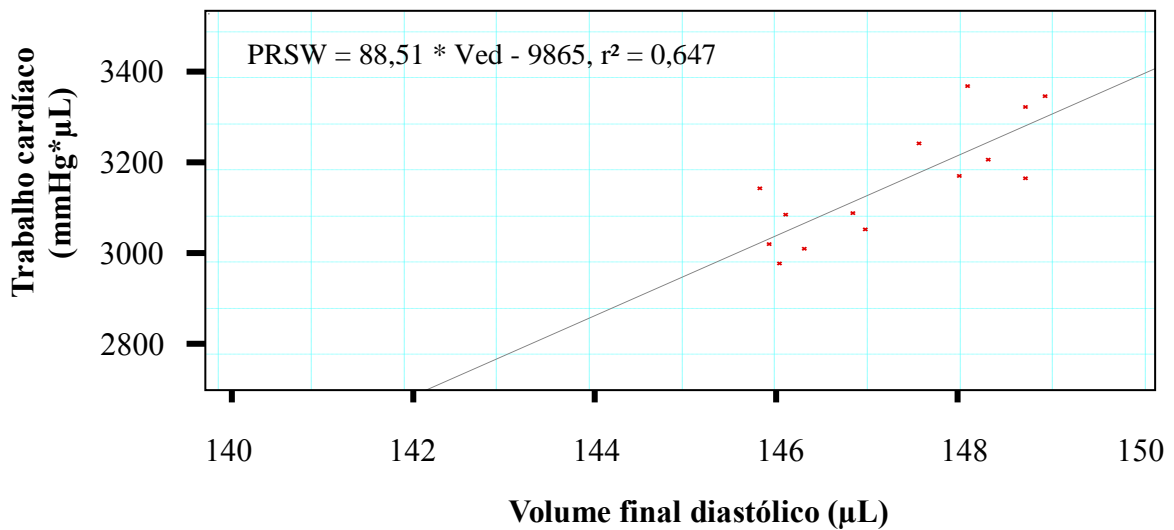
B

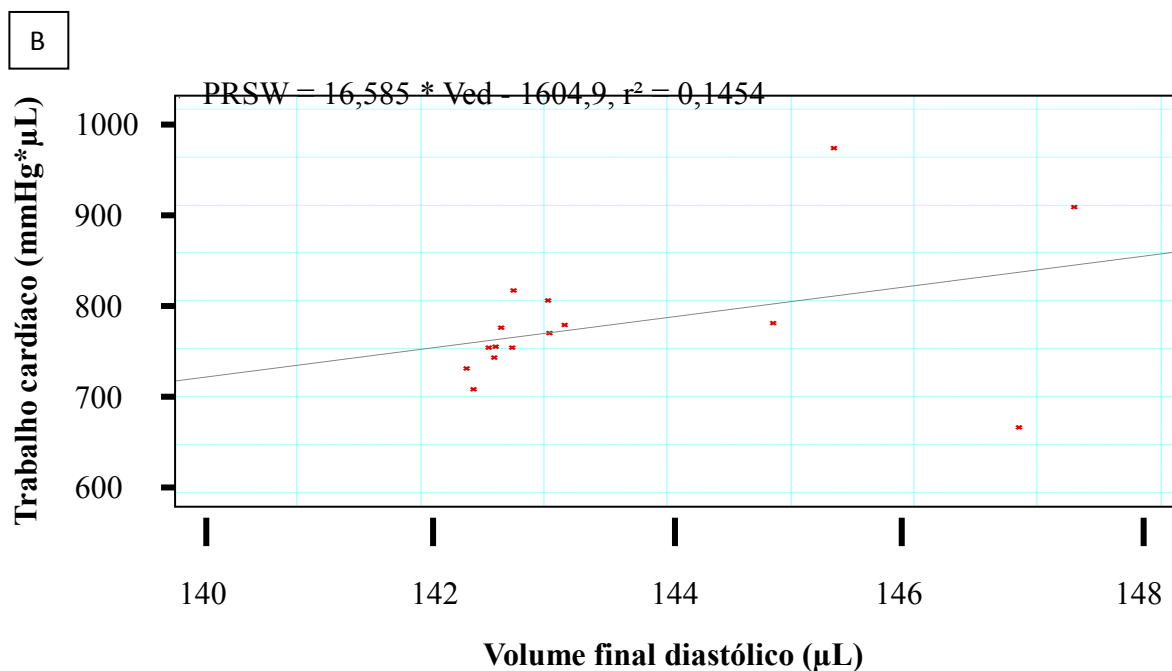


Obtenção da curva pressão-volume do ventrículo esquerdo a partir dos dados da hemodinâmica. O ESPVR (relação pressão-volume sistólica final), linha vermelha, representa a elastância sistólica final, que fornece um índice de contratilidade miocárdica. O EDPVR (relação pressão-volume diastólica final), linha azul, representa a capacitância e a função diastólica. (A) Controle. (B) Dose de 100 µg/kg da peçonha de *C. noxius*. n=1.

Figura 16 - Efeito da peçonha de *C. noxius* sobre o PRSW da hemodinâmica sistêmica.

A





Obtenção do PRSW do ventrículo esquerdo a partir dos dados da hemodinâmica. Os pontos vermelhos representam os ciclos avaliados. (A) Controle. (B) Dose de 100 µg/kg da peçonha de *C. noxius*. n=1.

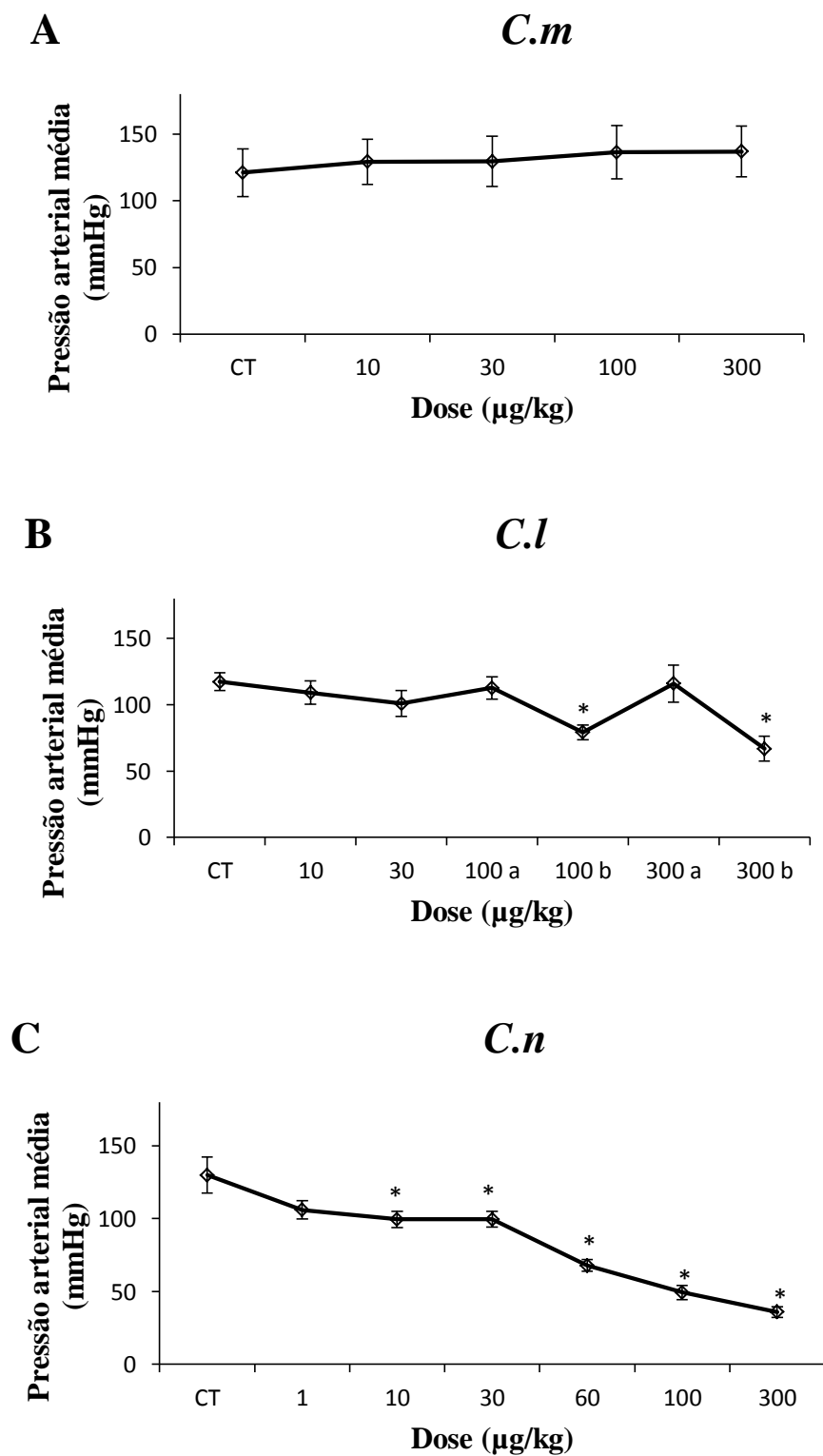
6.4 Avaliação da hemodinâmica sistêmica com a PCm, PCI e PCn

Na avaliação de cada registro, visto que o grupo de *C. limpidus* apresentou um efeito bifásico para todos os parâmetros, nas doses de 100 e 300 µg/kg foi realizada uma análise da seguinte forma: 100 a, indica o maior ponto alcançado e 100 b o menor ponto do registro; da mesma forma para a dose de 300.

6.4.1 Pressão arterial

Conforme apresentado na **Figura 17** as peçonhas de *C. limpidus* (PCI) e *C. noxius* (PCn) induziram diminuição de forma significativa da pressão arterial média (PAM) quando comparado ao tempo controle. PCI apresentou um registro com efeito bifásico nas doses de 100 e 300 (a - maior efeito e b - menor efeito), alterando as doses de 100b e 300b µg/kg (79,17±5,48; 66,80±9,45, respectivamente). PCn gerou diminuição nas doses de 10, 30, 60, 100 e 300 µg/kg (99,57±5,6; 99,57±5,6; 67,86±4,0; 49,33±4,8; 36,00±3,7, respectivamente). Entretanto *C. margaritatus* não gerou alteração neste parâmetro.

Figura 17 – Efeitos da PCm, PCI e PCn na pressão arterial média.

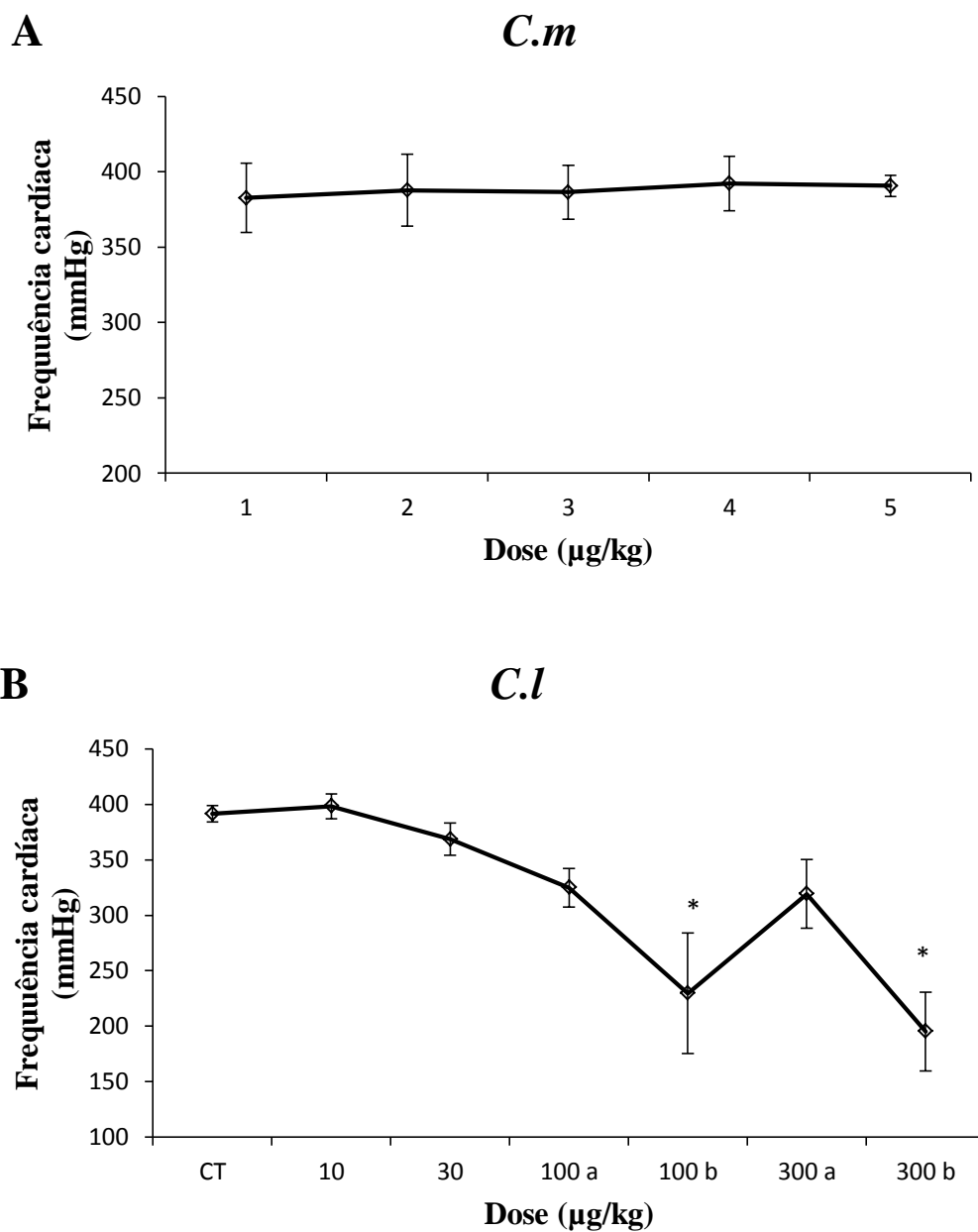


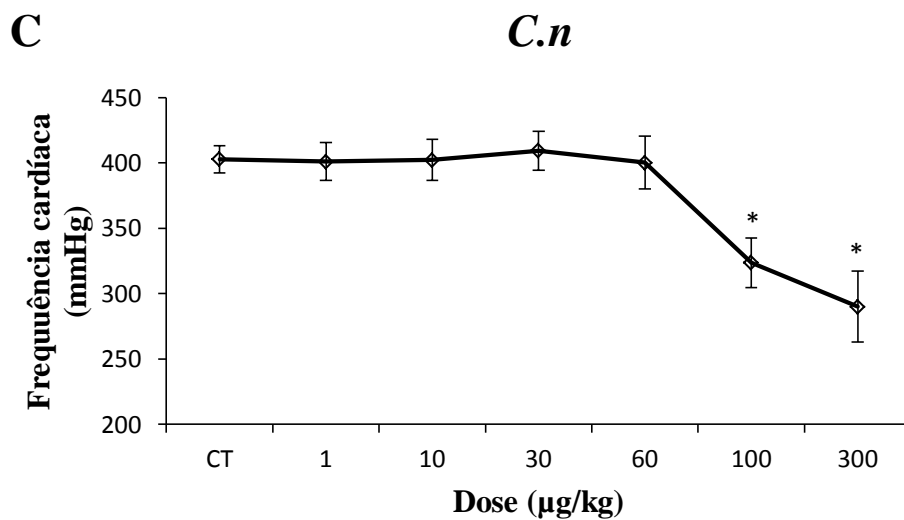
Varição da PAM induzida pelas peçonhas nas diferentes doses testadas (A) PCm (B) PCI (C) PCn. Dados expressos como média \pm EPM (n=6), na dose de 300 μ g/kg de PCI (n=5). *P<0,05 em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós teste Dunnett.

6.4.2 Frequência cardíaca

Alterações e complicações na FC é um evento constante após o envenenamento. A **Figura 18** demonstra que na avaliação de *C. limpidus* houve diminuição nas doses de 100b $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($229,6\pm 54$) e 300b $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($159,3,7\pm 36$), que foram os segmentos mais baixos do efeito bifásico para essas doses. O efeito gerado por *C. noxius* foi às doses de 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($323,6\pm 18,8$; $290\pm 27,0$). *C. margaritatus* não alterou a FC.

Figura 18 – Efeitos da PCm, PCI e PCn na frequência cardíaca.



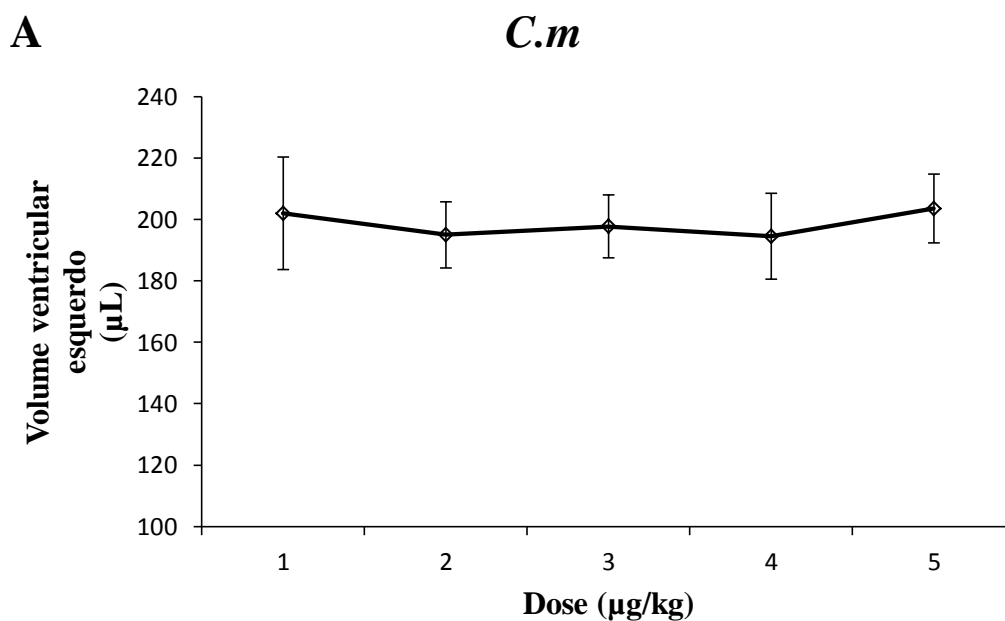


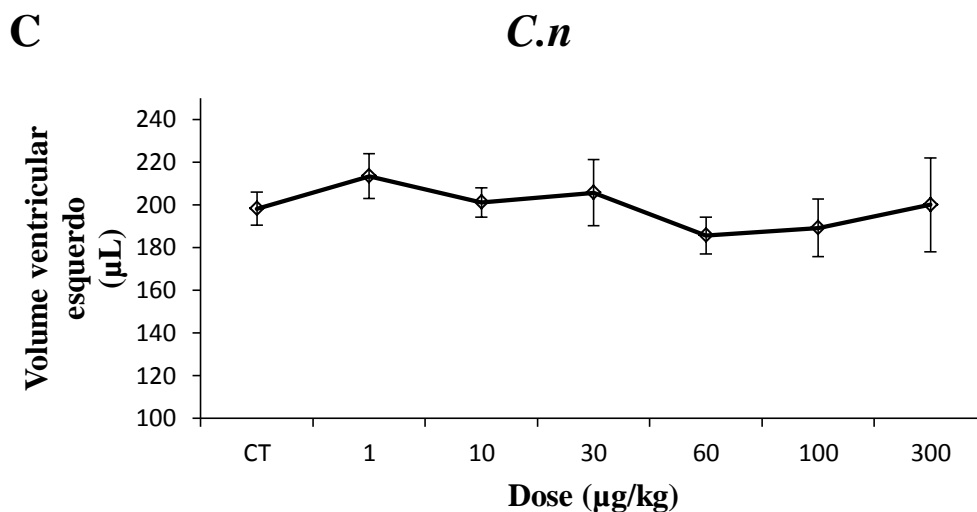
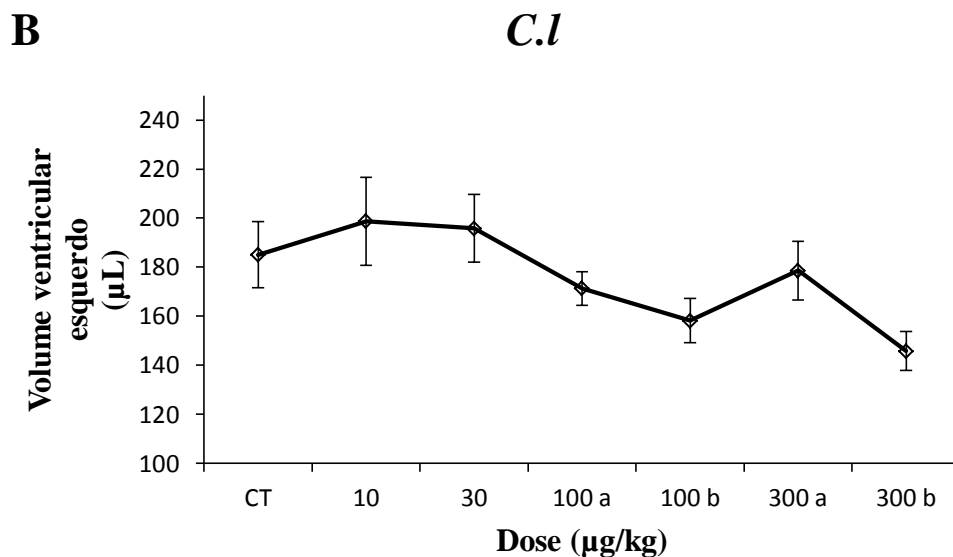
Varição da FC induzida pelas peçonhas nas diferentes doses testadas (A) PCm (B) PCI (C) PCn. Dados expressos como média \pm EPM (n=6), na dose de 300 μ g/kg de PCI (n=5). *P<0,05 em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós teste Dunnett.

6.4.3 Volume ventricular esquerdo

De acordo com a **Figura 19** o VVE não manifestou alterações para nenhuma das três peçonhas avaliadas.

Figura 19 – Efeitos da PCm, PCI e PCn no volume ventricular esquerdo.



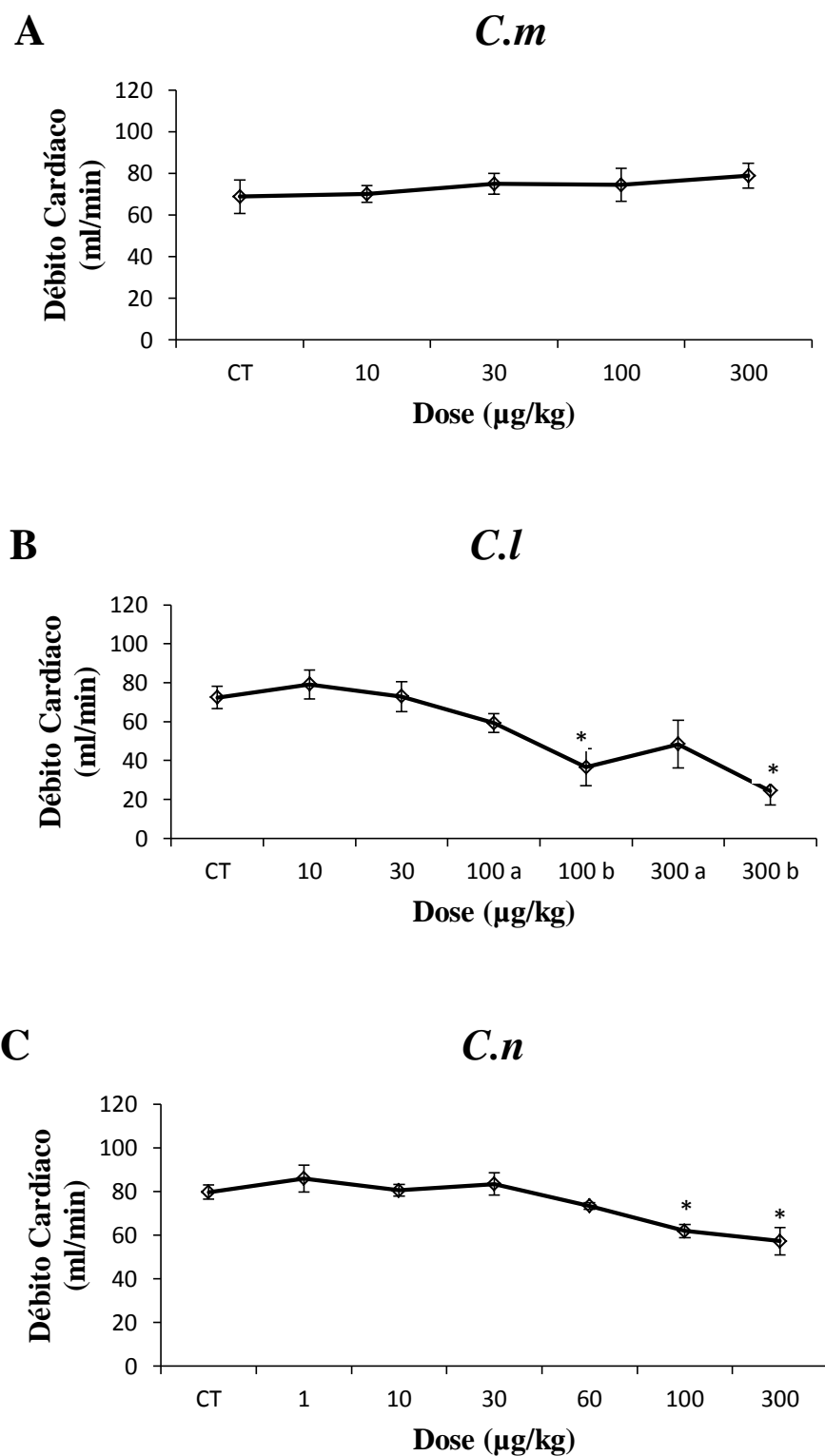


Variação do VVE induzido pelas peçonhas nas diferentes doses testadas (A) PCm (B) PC1 (C) PCn. Dados expressos como média \pm EPM (n=6), na dose de 300 µg/kg de PC1 (n=5). *P<0,05 em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós teste Dunnett.

6.4.4 Débito cardíaco

Conforme exposto na **Figura 20**, os valores do grupo controle não se diferenciaram em relação aos valores após a administração das diferentes doses das peçonhas de *C. margaritatus*. O DC diminuiu de forma significativa no grupo de *C. limpidus* nas doses de 100 b e 300 b (36,49 \pm 9,5; 24,43 \pm 7,3, respectivamente) e para *C. noxius* na dose de 100 µg/kg (61,84 \pm 3,1) e 300 µg/kg (57,23 \pm 6,2).

Figura 20 – Efeitos da PCm, PCI e PCn no débito cardíaco.

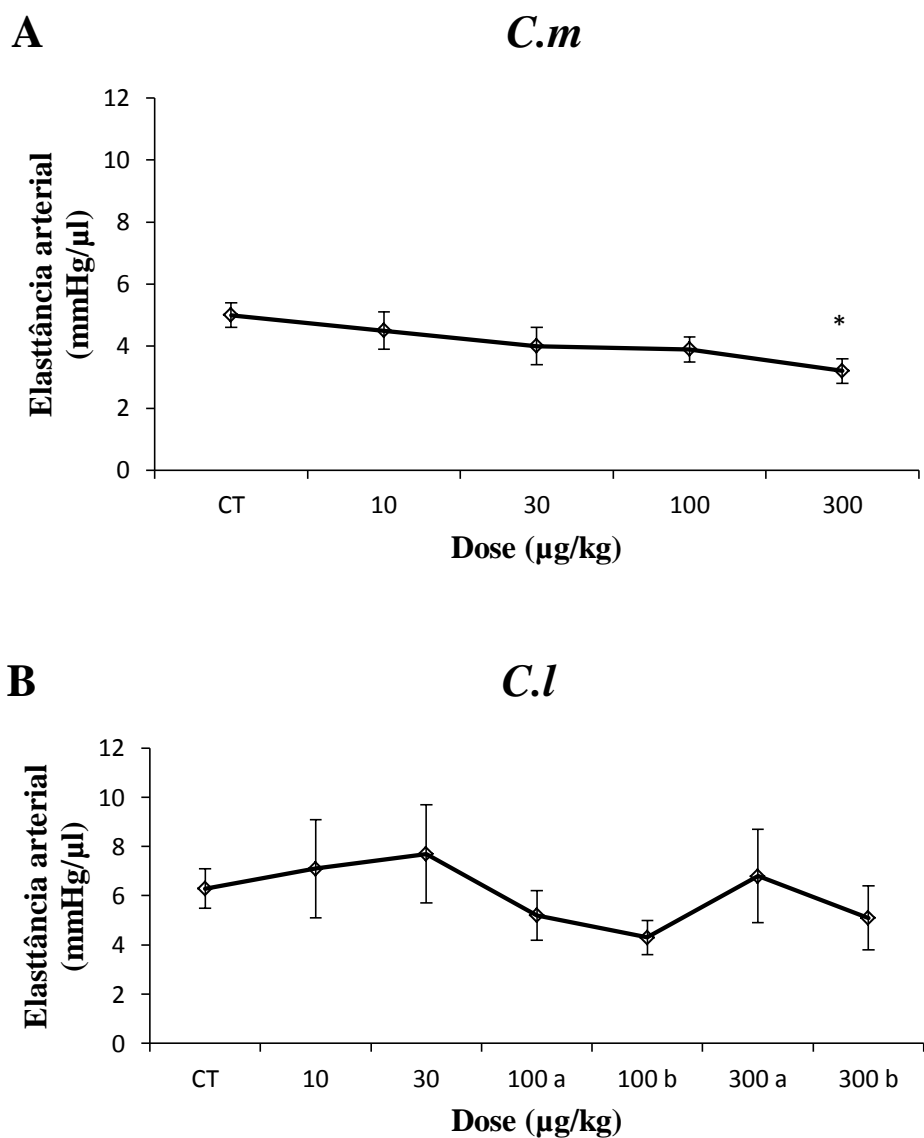


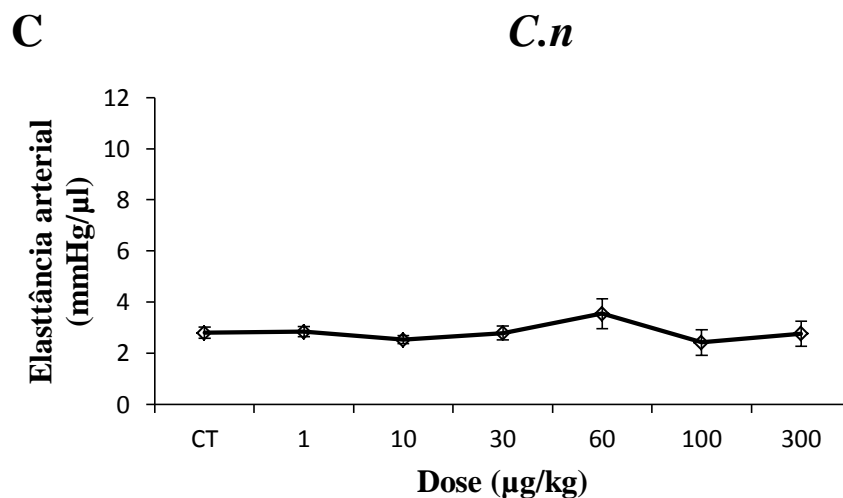
Varição do DC induzido pelas peçonhas nas diferentes doses testadas (A) PCm (B) PCI (C) PCn. Dados expressos como média \pm EPM (n=6), na dose de 300 $\mu\text{g/kg}$ de PCI (n=5). *P<0,05 em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós teste Dunnett.

6.4.5 Elastância arterial

Conforme a **Figura 21** a Ea apresentou redução significativa para *C. margaritatus* na dose de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($3,2 \pm 0,4$). *C. limpidus* e *C. noxius* não apresentaram alteração quando comparado ao grupo controle.

Figura 21 – Efeitos da PCm, PCI e PCn na elastância arterial.



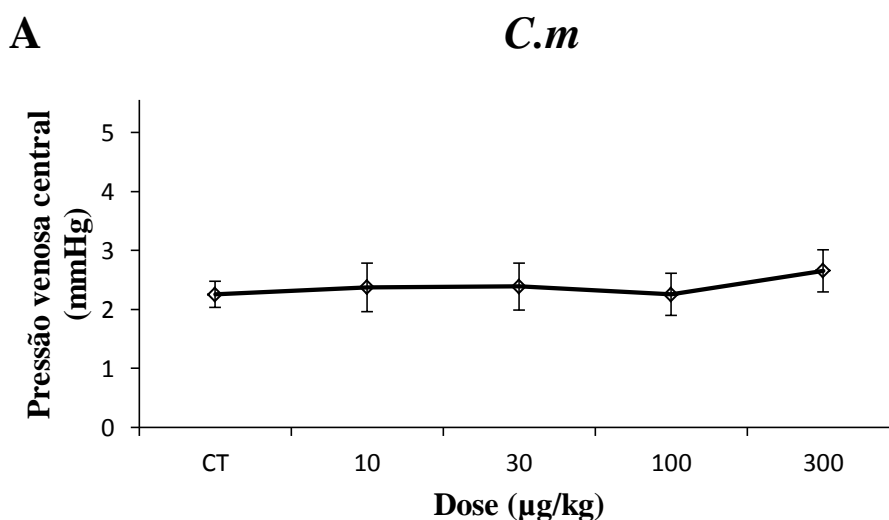


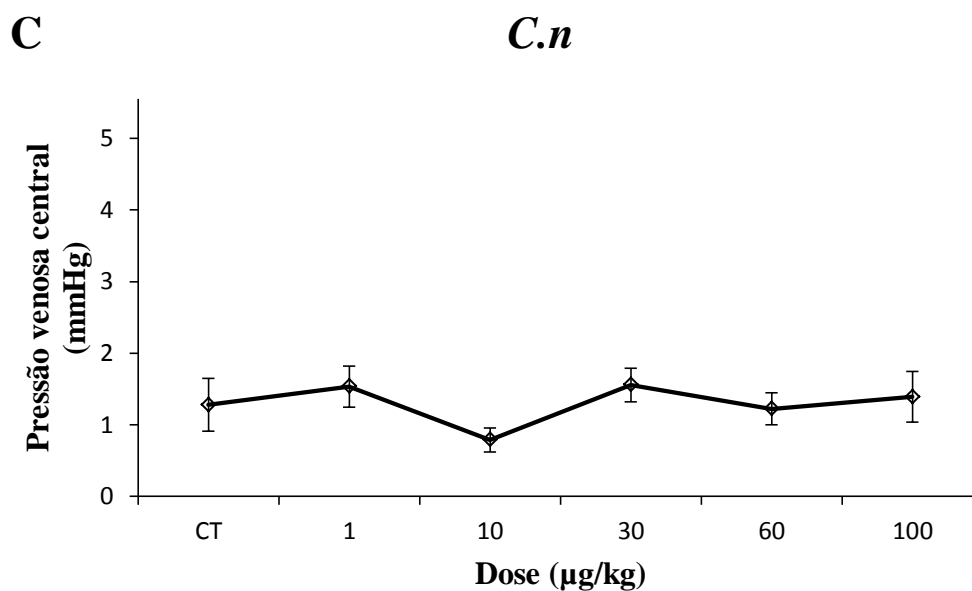
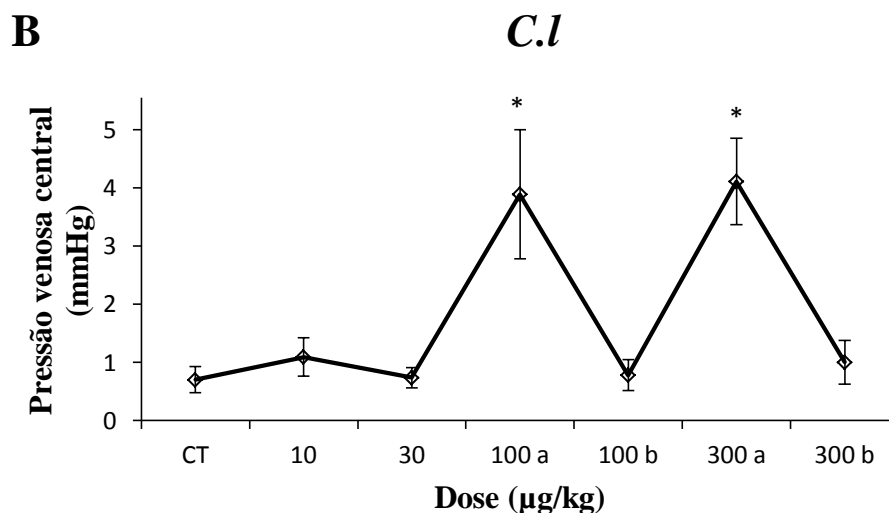
Variação da Ea induzido pelas peçonhas nas diferentes doses testadas (A) PCm (n=5) (B) PCl (n=6) (C) PCn (n=6), na dose de 300 μg/kg de PCl (n=5). Dados expressos como média ± EPM. *P<0,05 em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós teste Dunnett.

6.4.6 Pressão venosa central

No presente estudo, de acordo com a **Figura 22**, a peçonha de *C. limpidus* na dose de 100a μg/kg e 300a μg/kg; (a- é considerado o maior efeito do registro bifásico), desencadeou um aumento significativo nos valores da PVC (3,5±1; 3,7±0,7, respectivamente), quando comparados ao grupo controle. No entanto, o grupo de *C. margaritatus* e *C. noxius* não geraram diferenças significativas.

Figura 22 – Efeitos da PCm, PCl e PCn na pressão venosa central.



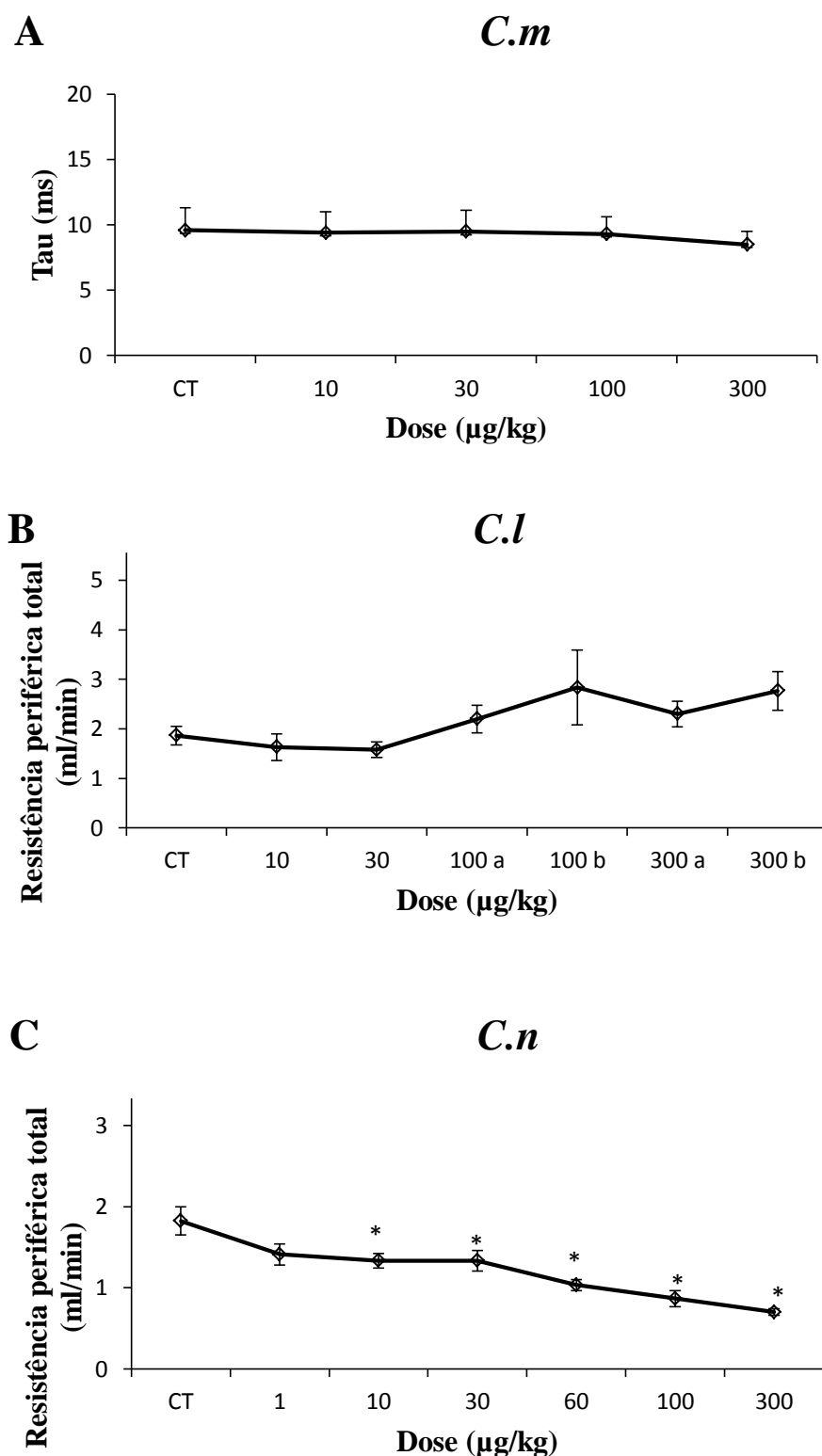


Varição da PVC induzido pelas peçonhas nas diferentes doses testadas (A) PCm (n=5) (B) PCl (n=6) (C) PCn (n=6), na dose de 300 µg/kg de PCl (n=5). Dados expressos como média ± EPM. *P<0,05 em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós teste Dunnett.

6.4.7 Resistência Periférica Total

A RPT foi um parâmetro determinado pelo cociente entre a PAM e o DC. Conforme observado na **Figura 23** a RPT diminuiu de forma significativa no grupo de *C. noxius* nas doses de 10, 30, 60, 100 e 300 µg/kg de forma dose dependentes (1,2±0,08; 1,2±0,1; 0,93±0,06; 0,78±0,08; 0,63±0,03, respectivamente). Não foi observada diferença estatística entre os grupos de *C. margaritatus* nem *C. limpidus*.

Figura 23 – Efeitos da PCm, PCI e PCn na resistência periférica total.

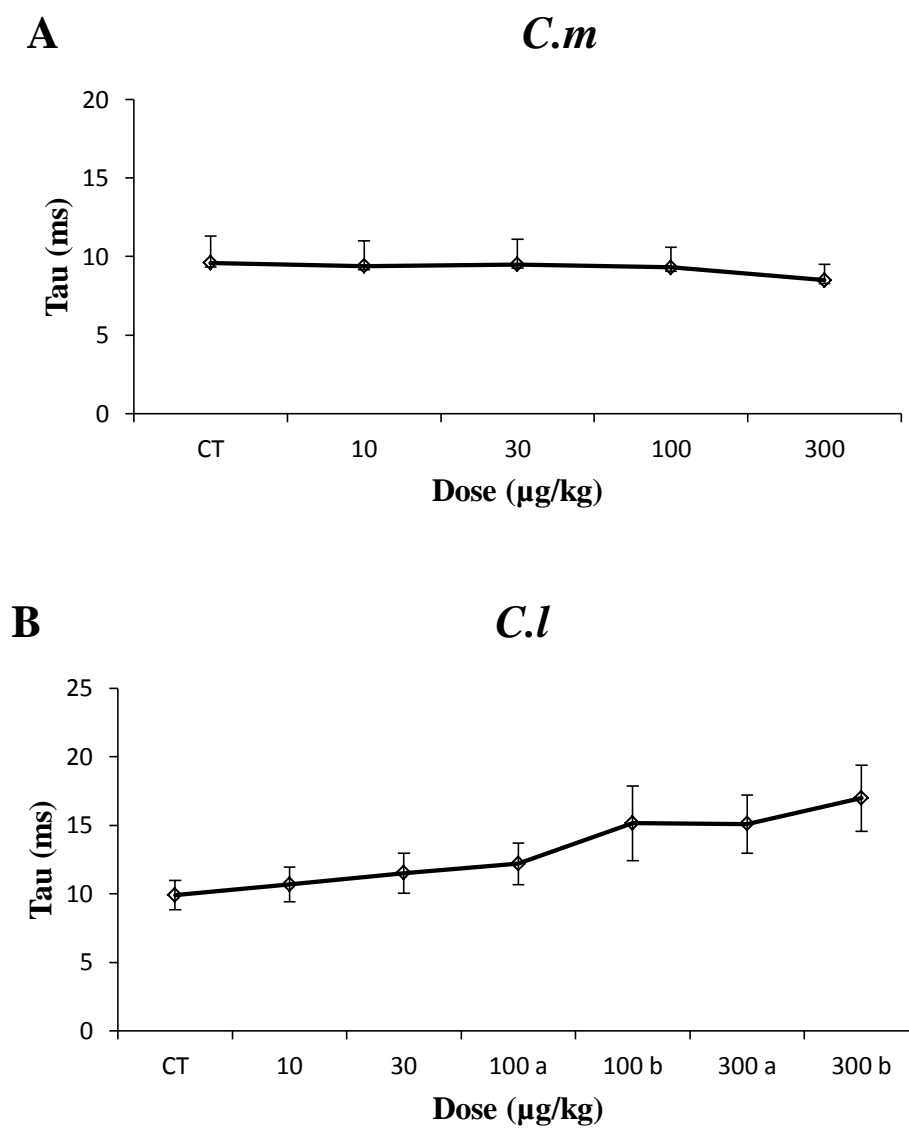


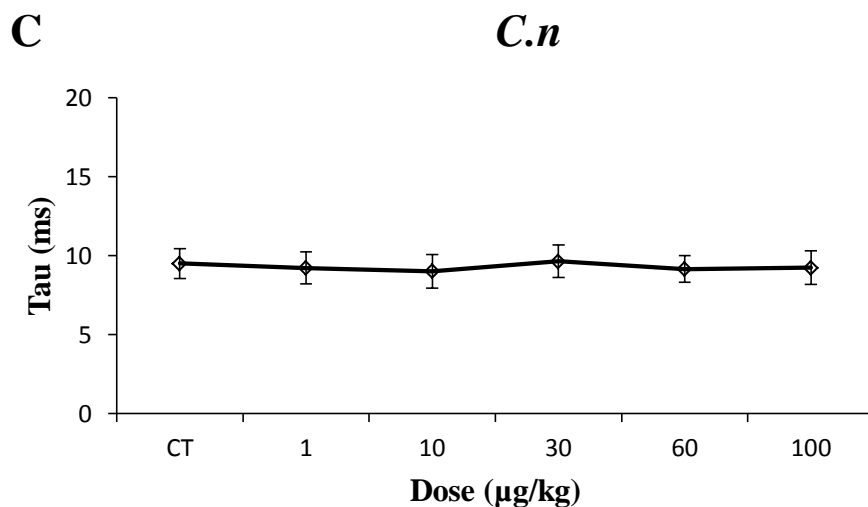
Varição da RPT induzido pelas peçonhas nas diferentes doses testadas (A) PCm (n=5) (B) PCI (n=6) (C) PCn (n=6), na dose de 300 $\mu\text{g/kg}$ de PCI (n=5). Dados expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós teste Dunnett.

6.4.8 Índices diastólicos

As peçonhas avaliadas, após a administração endovenosa das diferentes doses, não alteraram a constante de relaxamento isovolumétrico (Tau).

Figura 24 – Efeitos da PCm, PCI e PCn na constante de relaxamento isovolumétrico.

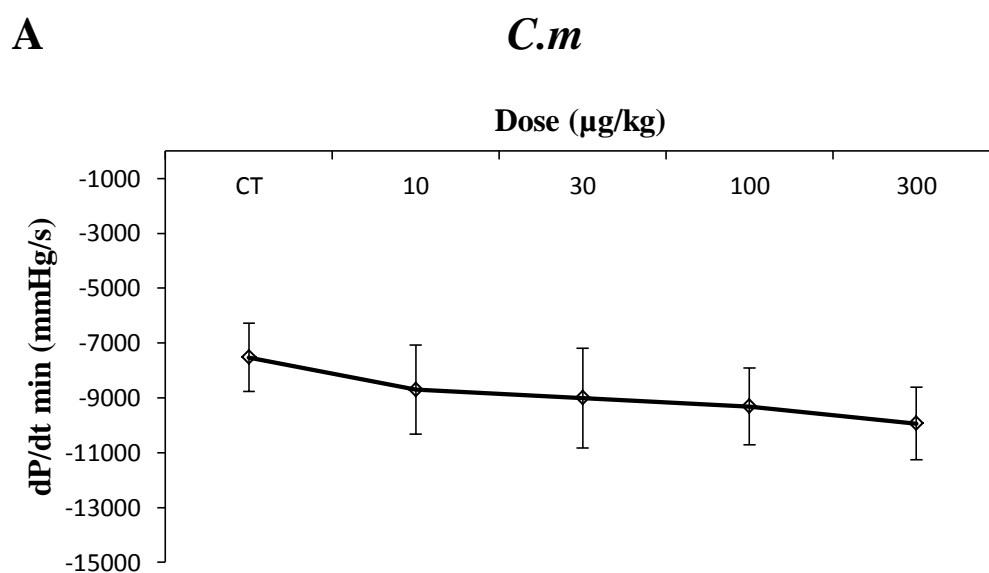


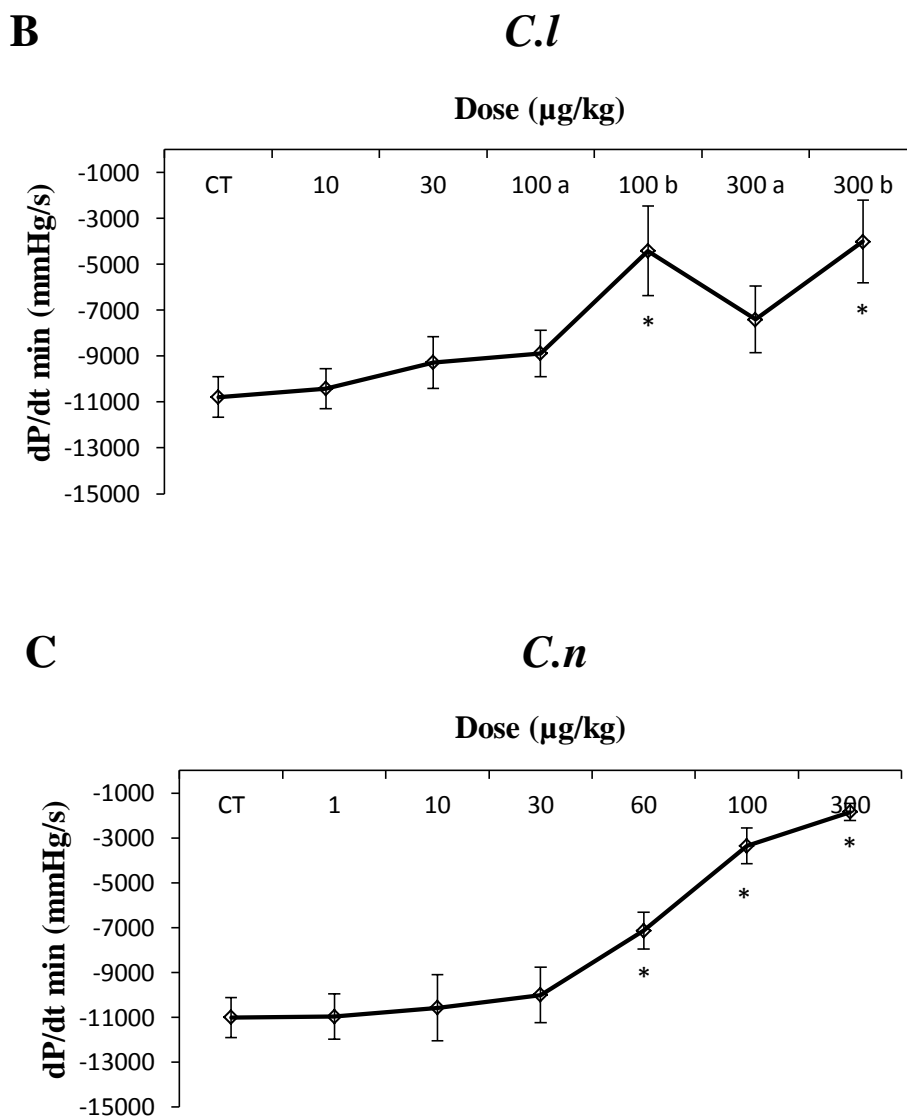


Varição da Tau induzido pelas peçonhas nas diferentes doses testadas (A) PCm (n=5) (B) PCI (n=6) (C) PCn (n=6), na dose de 300 µg/kg de PCI (n=5). Dados expressos como média ± EPM. *P<0,05 em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós teste Dunnett.

Conforme demonstrado na **Figura 25**, o grupo de *C. limpidus* aumentou de forma significativa o dP/dt mínimo nas doses de 100b e 300b (-4412±1958; -4001±1797, respectivamente). *C. noxius* aumentou o dP/dt mínimo nas doses de 60, 100 e 300 µg/kg (-7137±816; -3354±787; 1846±377, respectivamente), quando comparado ao grupo controle. Não foi observada diferença entre o grupo de *C. margaritatus*.

Figura 25 – Efeitos da PCm, PCI e PCn no dP/dt min.



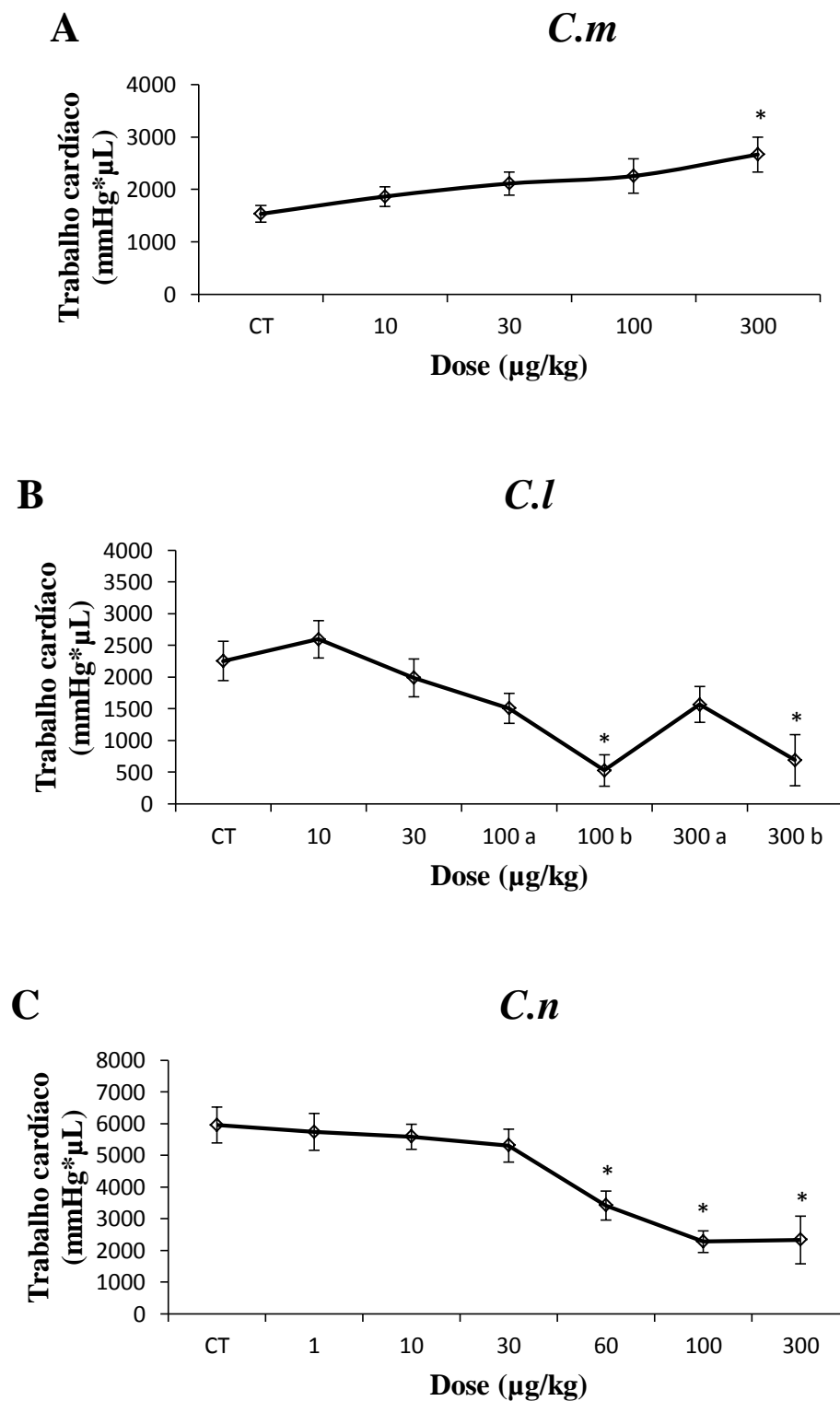


Variação do dP/dt mínimo induzido pelas peçonhas nas diferentes doses testadas (A) PCm (n=5) (B) PCI (n=6) (C) PCn (n=6), na dose de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de PCI (n=5). Dados expressos como média \pm EPM. *P<0,05 em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós teste Dunnett.

6.4.9 Índices Sistólicos

Parâmetros como Trabalho Cardíaco (TC), Fração de Ejeção (FE) e dP/dt máximo (dP/dt máx) representam a função sistólica do ventrículo esquerdo. Como observado na **Figura 26** o TC aumentou significativamente para *C. margaritatus* na dose de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (2666 \pm 334) e diminuiu para *C. limpidus* nas doses de 100b $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 300b $\mu\text{g}/\text{kg}$ (528,8 \pm 248,1; 690,8 \pm 401, respectivamente), da mesma forma para *C. noxius* nas doses de 60, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (3424 \pm 457; 2278 \pm 337; 2334 \pm 752, respectivamente).

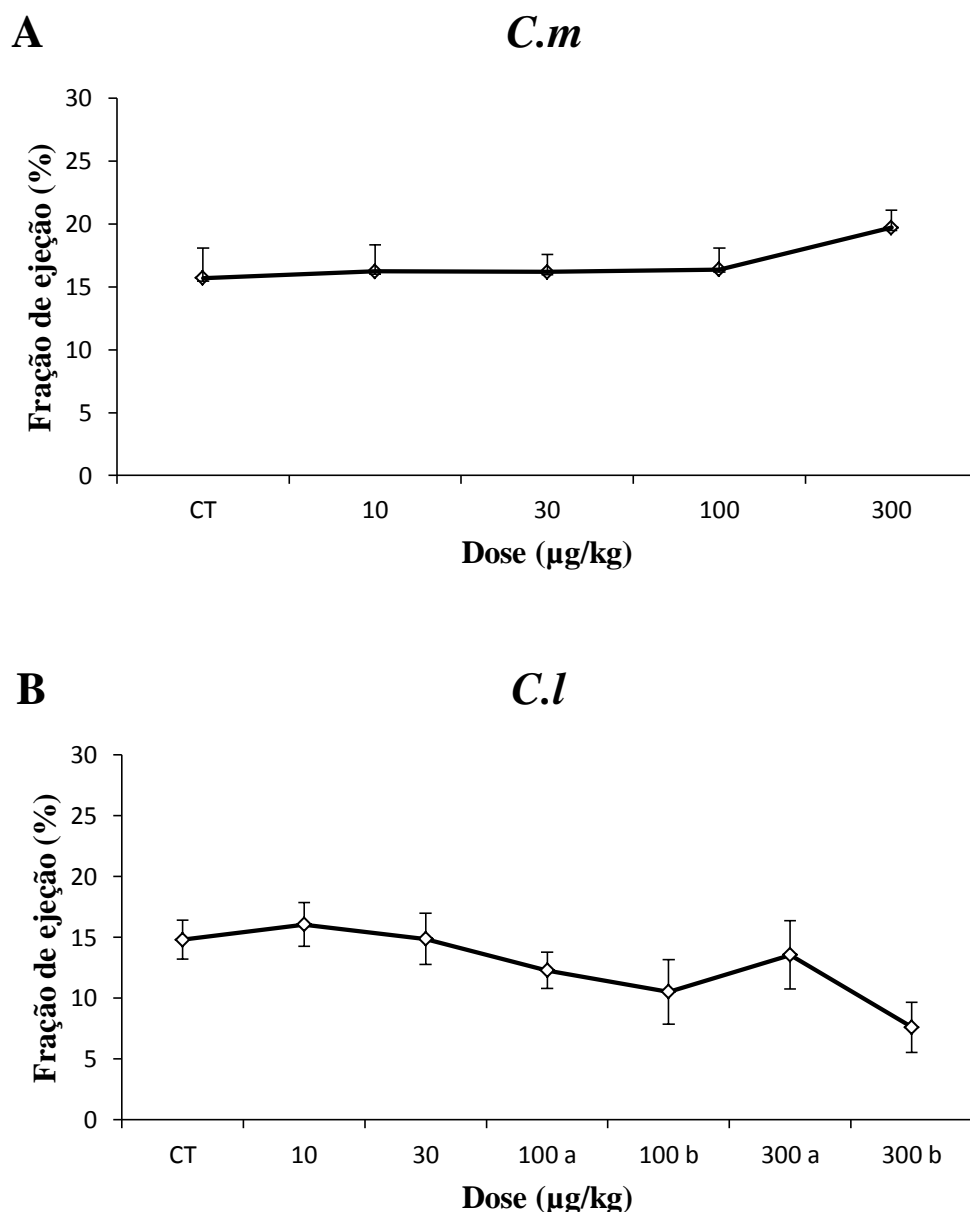
Figura 26- Efeitos da PCm, PCl e PCn no trabalho cardíaco.

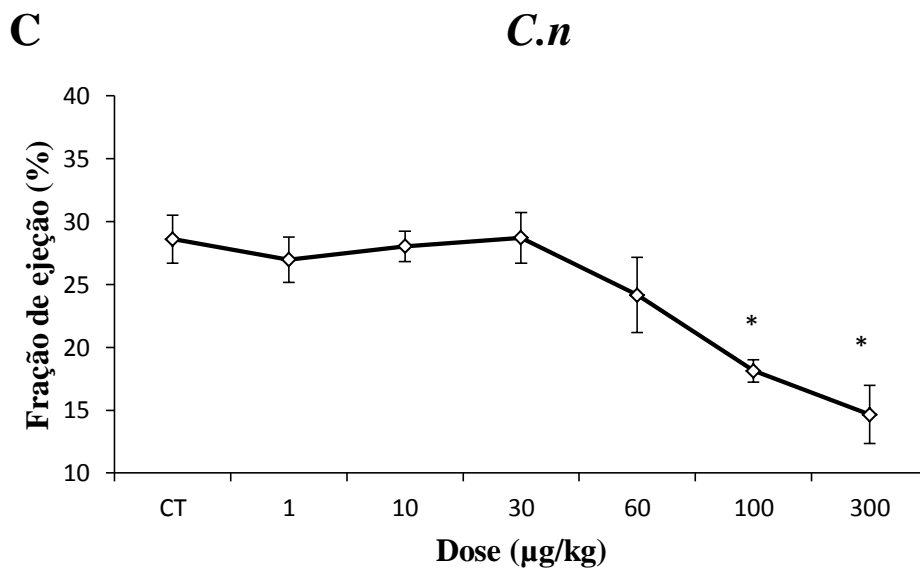


Varição do TC induzido pelas peçonhas nas diferentes doses testadas (A) PCm (n=5) (B) PCl (n=6) (C) PCn (n=6), na dose de 300 µg/kg de PCl (n=5). Dados expressos como média ± EPM. *P<0,05 em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós teste Dunnett.

Já em relação à fração de ejeção, observou-se uma diminuição nesse parâmetro nos animais tratados com a peçonha de *C. noxius* nas doses de 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($18,12 \pm 0,9$ e $14,6 \pm 2,3$, respectivamente). No entanto, nos grupos de *C. margaritatus* e *C. limpidus* não alterou de forma significativa (**Figura 27**).

Figura 27 – Efeitos da PCm, PCI e PCn na fração de ejeção.

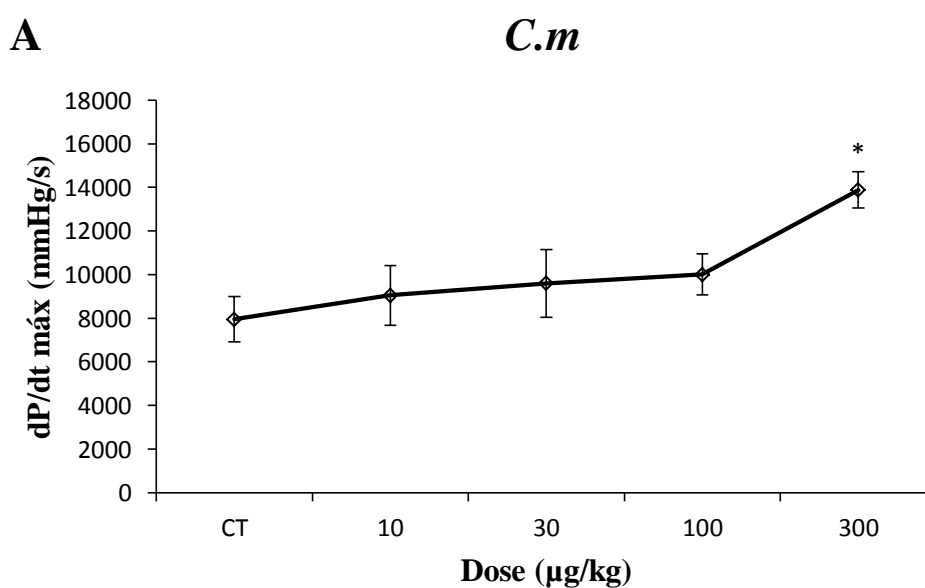


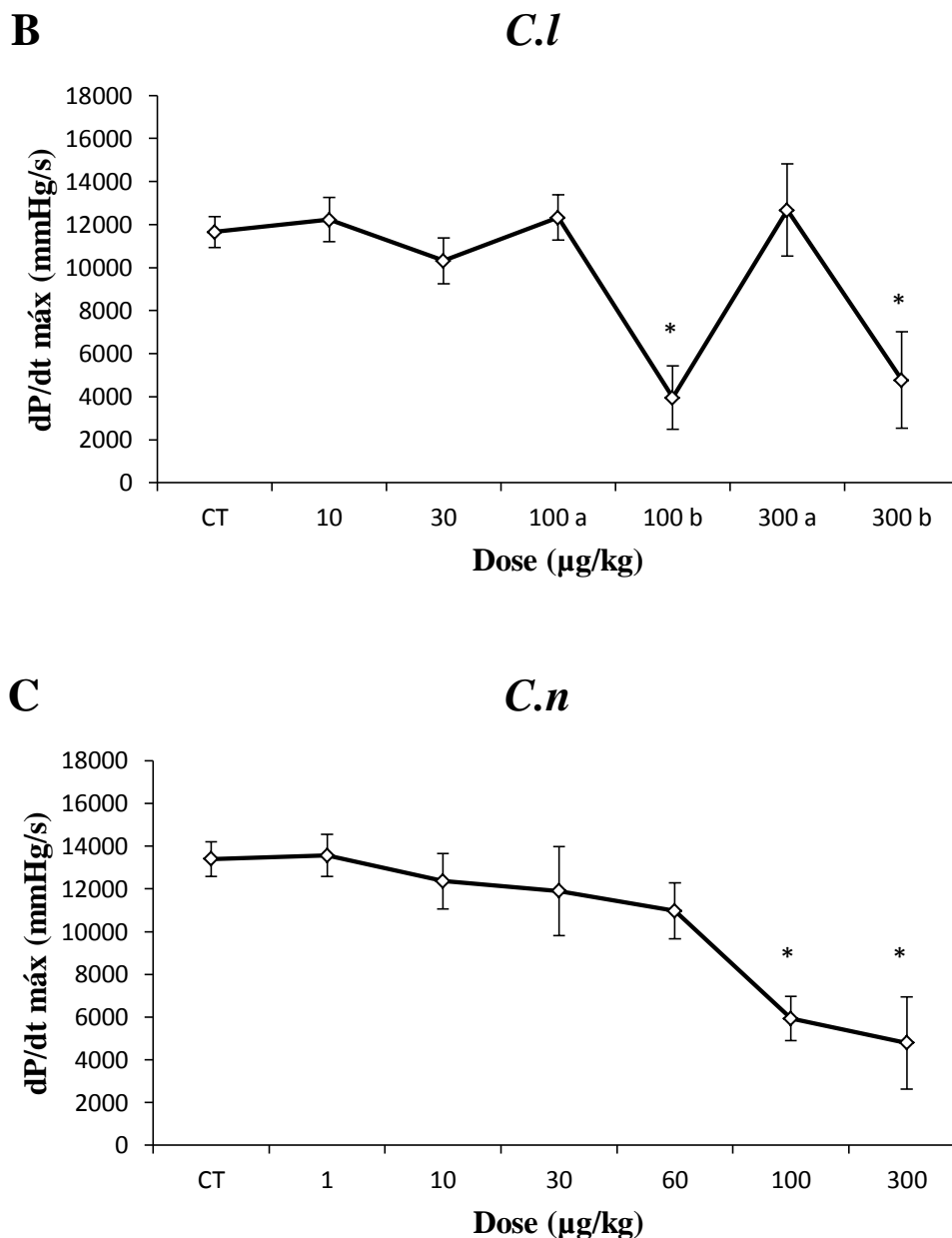


Variação da FE máximo induzido pelas peçonhas nas diferentes doses testadas (A) PCm (B) PCI (C) PCn. Dados expressos como média \pm EPM (n=6), na dose de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de PCI (n=5). *P<0,05 em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós teste Dunnett.

De acordo com a **Figura 28**, o dP/dt máximo elevou-se de forma significativa no grupo de *C. margaritatus* na dose de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (13884 \pm 834) e diminuiu para *C. limpidus* na dose de 100b $\mu\text{g}/\text{kg}$ (3950 \pm 1474) e 300 b (4771 \pm 2249). A mesma diminuição foi observada para o grupo de *C. noxius* nas doses de 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (5932 \pm 1037 e 4791 \pm 21,53, respectivamente).

Figura 28 – Efeitos da PCm, PCI e PCn no dP/dt max.



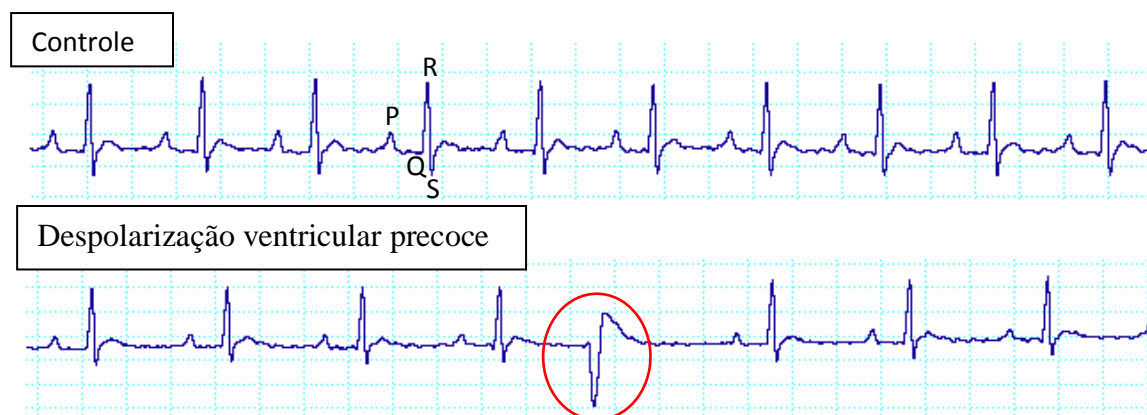


Varição do Dp/dt máximo induzido pelas peçonhas nas diferentes doses testadas (A) PCm (n=5) (B) PCI (n=6) (C) PCn (n=6), na dose de 300 µg/kg de PCI (n=5). Dados expressos como média ± EPM. *P<0,05 em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós teste Dunnett.

6.4.10 Eletrocardiograma

A despolarização ventricular precoce a partir da dose de 10 µg/kg, conforme a **figura 29** foi mais frequente para *C. limpidus* e *C. noxius* que para *C. margaritatus*, de forma dose dependente, quando comparado ao grupo controle.

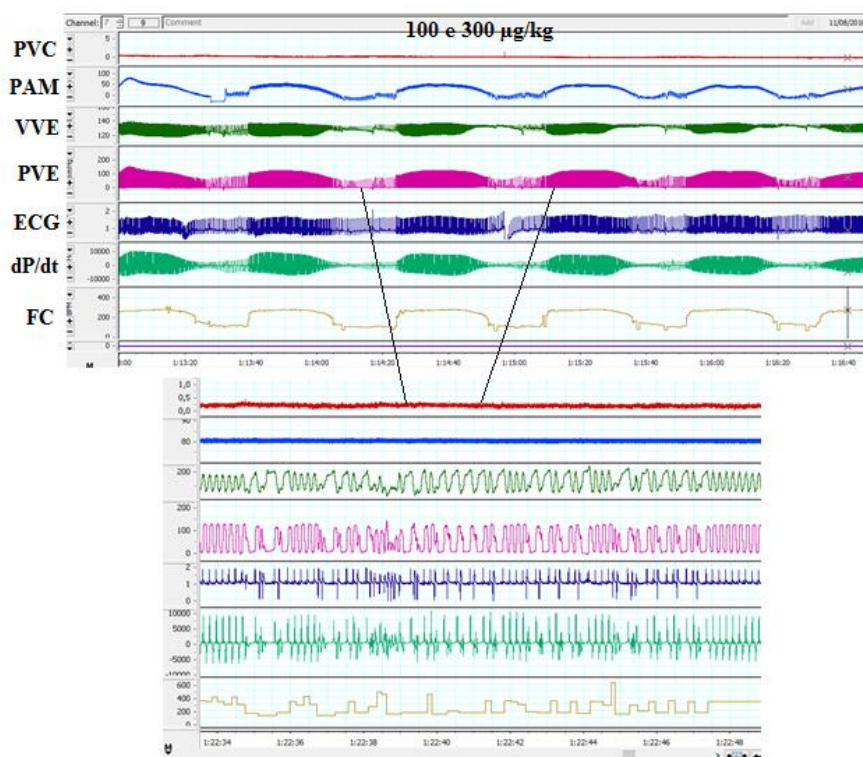
Figura 29 – Efeito da peçonha de *C. margaritatus* no eletrocardiograma.



Registro do ECG no grupo controle e representação da despolarização ventricular precoce encontrada durante a avaliação das diferentes doses com *C. margaritatus*

De acordo com a **Figura 30**, na avaliação de *C. limpidus* foi comum as oscilações gerando um efeito bifásico no registro, apresentando aumento e diminuição recorrente nos diferentes parâmetros já descritos (**Figura 30**). Observou-se este tipo de alterações pelas fortes contrações musculares e dificuldade respiratória nos ratos.

Figura 30 - Registro ampliado da hemodinâmica sistêmica para PCI.



Alterações dos diferentes parâmetros da hemodinâmica durante o procedimento experimental, com efeito bifásico nas doses de 100 e 300 µg/kg.

A despolarização ventricular precoce para *C. limpidus* surgiram a partir da dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sendo mais frequentes nas últimas doses 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (**Figura 31**).

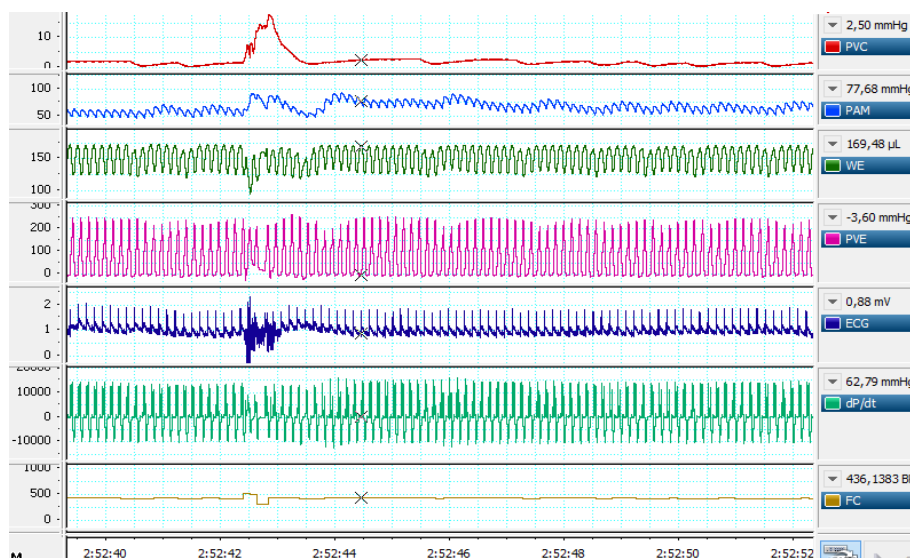
Figura 31 – Efeitos da peçonha de *C. limpidus* no eletrocardiograma.



Registro do ECG no grupo controle e representação da despolarização ventricular encontrada durante a avaliação das diferentes doses com *C. limpidus*

Para *C. noxius* também foram observados eventos oscilatórios (**Figura 32**), que começaram a partir da dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (aproximadamente 10 eventos) a cada 4 minutos, na dose de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (aproximadamente 15 eventos), e na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (aproximadamente 48 eventos). Na dose de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o registro ficou alterado e não permitiu caracterizar este fenômeno.

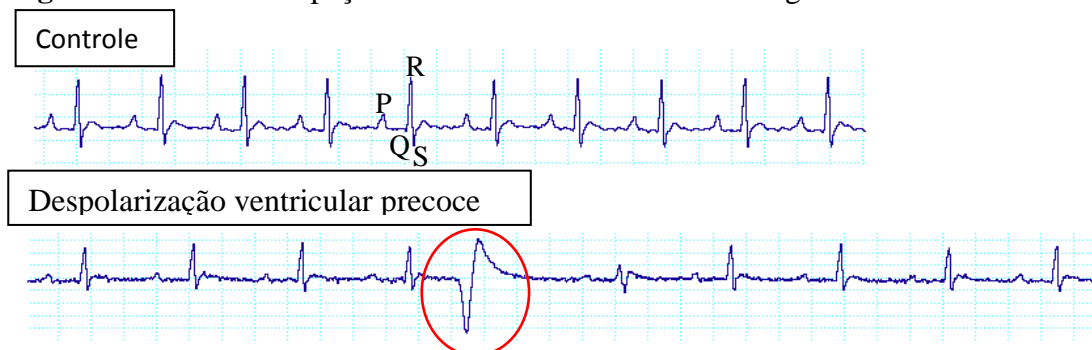
Figura 32 – Alterações no registro da hemodinâmica sistêmica de PCn.



Alterações dos diferentes parâmetros da hemodinâmica durante o procedimento, em todas as doses avaliadas para *C. noxius*

A despolarização ventricular encontrada para *C. noxius* começaram a partir da dose de 10 µg/kg, sendo mais frequentes nas últimas doses (**Figura 33**).

Figura 33 – Efeitos da peçonha de *C. noxius* no eletrocardiograma.



Registro do ECG no grupo controle e representação da despolarização ventricular encontradas durante a avaliação das diferentes doses com *C. noxius*.

Conforme exposto na **Tabela 5**, no grupo de *C. margaritatus*, o tempo controle não teve diferença significativa em relação aos valores dos parâmetros do ECG, como o intervalo RR (tempo entre dois batimentos cardíacos), o intervalo PR (atraso do estímulo no nodo atrioventricular), o intervalo QRS (despolarização dos ventrículos), o intervalo QTc (eficiência na repolarização do ventrículo) e a amplitude P. De acordo com a **Tabela 6**, a avaliação do ECG para *C. limpidus* desencadeou um aumento significativo nos valores do intervalo RR na dose de 300 µg/kg, diminuição do intervalo QTc e amplitude P e sem alteração dos intervalos RR e QRS. Entretanto, os parâmetros do ECG para *C. noxius* são apresentados na **Tabela 7**, com aumento dos intervalos RR e QRS na dose de 300 µg/kg. No entanto, na dose de 300 µg/kg o intervalo QTc e a amplitude P, manifestou reduziu significativamente em relação ao grupo controle. A mesma figura ainda reporta que o intervalo RR não foi alterado.

Tabela 5 - Registros de *C. margaritatus* nos parâmetros do ECG.

Parâmetros	Controle	10	30	100	300
RR	0,153±0,04	0,161±0,07	0,159±0,06	0,155±0,05	0,154±0,03
PR	0,049±0,00	0,048±0,00	0,049±0,00	0,049±0,00	0,048±0,00
QRS	0,018±0,00	0,017±0,00	0,019±0,00	0,020±0,00	0,017±0,00
QTc	0,139±0,00	0,141±0,00	0,151±0,02	0,155±0,01	0,164±0,00
Amplitude P	0,134±0,01	0,136±0,01	0,135±0,01	0,135±0,01	0,131±0,01

Os dados são expressos em média ± E.P.M, com análise por ANOVA seguida do pós teste Dunnett. *P<0.05. n=6.

Tabela 6 - Registros de *C. limpidus* nos parâmetros do ECG.

Parâmetros	Controle	10	30	100	300
RR	0,153±0,00	0,152±0,00	0,164±0,00	0,214±0,03	0,295±0,06 *
PR	0,049±0,00	0,049±0,00	0,049±0,00	0,049±0,00	0,052±0,00
QRS	0,016±0,00	0,015±0,00	0,016±0,00	0,017±0,00	0,019±0,00
QTc	0,179±0,01	0,178±0,01	0,173±0,01	0,168±0,01	0,138±0,01 *
Amplitude P	0,126±0,01	0,127±0,01	0,123±0,01	0,111±0,01	0,058±0,01 *

Os dados são expressos em média ± E.P.M, com análise por ANOVA seguida do pós teste Dunnett. *P<0.05. n=6, na dose de 300 µg/kg de PCI (n=5).

Tabela 7 – Registros de *C. noxius* nos parâmetros do ECG.

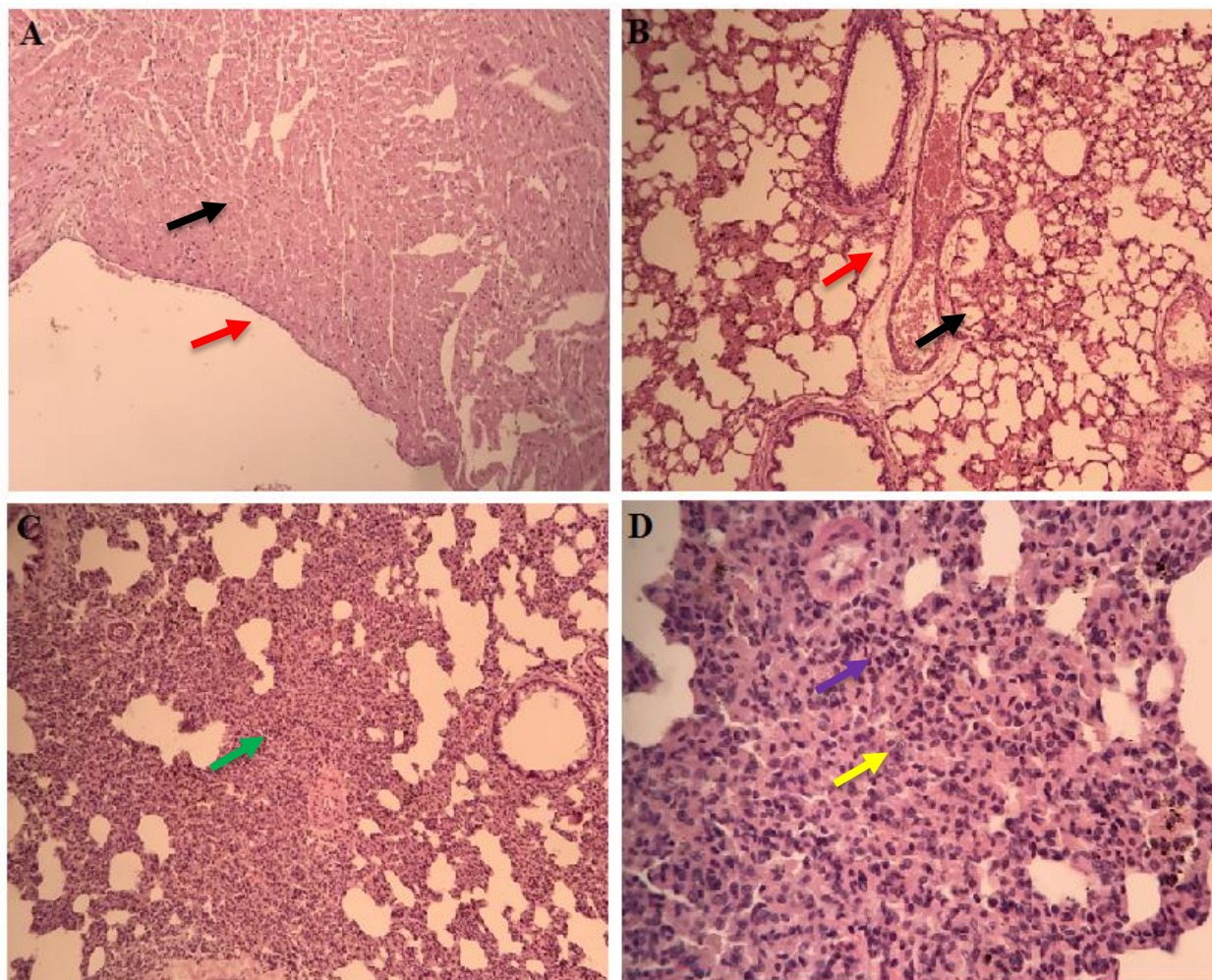
Parâmetros	Controle	1	10	30	60	100	300
RR	0,149±0,00	0,152±0,01	0,151±0,01	0,148±0,01	0,157±0,01	0,190±0,01	0,215±0,03*
PR	0,049±0,02	0,049±0,02	0,049±0,02	0,048±0,02	0,048±0,02	0,050±0,02	0,052±0,01
QRS	0,017±0,00	0,017±0,00	0,017±0,00	0,016±0,00	0,014±0,00	0,017±0,00	0,02±0,00 *
QTc	0,1706±0,01	0,1664±0,01	0,1655±0,01	0,1608±0,01	0,180±0,01	0,159±0,01	0,12±0,02 *
Amplit. P	0,129±0,01	0,131±0,01	0,133±0,02	0,136±0,02	0,137±0,02	0,109±0,01	0,051±0,02*

Os dados são expressos em média ± E.P.M, com análise por ANOVA seguida do pós teste Dunnett. *P<0.05. n=6.

6.5 Avaliação histopatológica

A análise histológica da hemodinâmica de *C. noxius*, a mais tóxica das peçonhas avaliadas, mostrou alterações no pulmão, embora sem alteração do tecido cardíaco (**Figura 34**).

Figura 34 - Avaliação histopatológica do coração e pulmão na hemodinâmica sistêmica da peçonha de *C. noxius*.



A imagem mostra a avaliação histopatológica do coração e pulmão. A) análise do tecido cardíaco evidenciou miocárdio normal (seta preta) e cavidades cardíacas amplas e revestidas por endotélio típico (seta vermelha). A análise do pulmão evidenciou presença de marcante hemorragia intra-alveolar (Painel B; seta preta) com visualização de vasos sanguíneos ectásicos (Painel B; seta vermelha). Adicionalmente, observou-se áreas com formação de edema pulmonar associado a intenso infiltrado inflamatório difuso (Painel C; seta verde), composto por células mononucleares (Painel D; seta amarela) e polimorfonucleares (painel D; seta roxa). Aumento 200X e 400X. Coloração HE.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos gerados por diferentes doses de peçonha de três espécies de escorpiões do gênero *Centruroides*: *C. margaritatus* da Colômbia (Município do Patía), *C. limpidus* e *C. noxius* do México, sobre os parâmetros hemodinâmicos sistêmicos. O processo de injeção e avaliação de cada dose induziu diferentes graus de envenenamento para cada espécie, com efeitos em comum como cianose, secreção e piloereção. Achados similares são observados em acordo a outros estudos (BUSH, 1999; PADILLA *et al.*, 2003).

As manifestações sistêmicas causadas pela intoxicação após a picada do escorpião é resultado fundamental da ação neurotóxica dos peptídeos. As espécies perigosas para o homem geram hiperestimulação simpática, com liberação de catecolaminas e alteração dos canais iônicos pelas proteínas de baixo peso molecular da peçonha, prolongando o potencial de ação das células do sistema nervoso autônomo (ISMAIL, 1995). Esses efeitos podem causar graves alterações na contratilidade do ventrículo esquerdo (cardiomiopatia) e aumento da permeabilidade capilar pulmonar (edema pulmonar agudo) (CUPO e HERING, 2002; ABOUMAÂD *et al.*, 2014; COSTAL-OLIVEIRA *et al.*, 2017; DOKUR *et al.*, 2017).

Com relação à escolha das doses avaliadas, considerou-se prévios registros da hemodinâmica sistêmica e a quantidade aproximada de proteína que é inoculada após a picada. A espécie *C. margaritatus* gera aproximadamente 110 µg de proteína por animal (GUERRERO-VARGAS 2002) e para *C. limpidus* relataram um valor médio de 320 µg (URIBE *et al.*, 2017). Estudos anteriores de hemodinâmica sistêmica como o de Zeghal *et al.*, (2000) avaliaram doses de 150, 300 e 600 µg/kg do escorpião *Buthus occitanus* e fizeram as aplicações pela via intravenosa (iv). A última dose apresentou uma alta taxa de mortalidade e foi excluída. O estudo de Wang *et al.*, (1994) avaliaram as doses de 10, 30, 50, 70 e 100 µg/kg, administradas com intervalos de 5 min (iv), similares ao nosso estudo (1, 10, 30, 60, 100 e 300 µg/kg). Também foram relatadas doses como 40, 50, 80 e 700 µg/kg (TARASIUK *et al.*, 1994), sendo inviáveis nesta pesquisa, considerando as quantidades de proteína geradas pelas espécies avaliadas. Neste estudo as doses iniciais para avaliar foram 1, 30, 100 e 300 µg/kg, para *C. margaritatus* e *C. limpidus*, e considerando baixa DL50 de *C. noxius* foram acrescentadas as doses de 1 e 60 µg/kg.

O gênero *Centruroides*, apresenta uma ampla distribuição geográfica e expõe uma característica particular: integrar espécies da América do Norte consideradas entre as mais letais do mundo, dentre eles *C. limpidus* que apresenta uma DL50, em camundongos, de 1,72 mg/kg subcutâneo (sc) (PADILLA *et al.*, 2005) e *C. noxius* sendo o mais letal com a DL50 de 0,8 mg/kg (sc) (PETRICEVICH, 2006). Já no caso de *C. margaritatus* com distribuição em Centro e América do Sul tem uma DL50 de 46,83 mg/kg (ip) e sua importância sobrevém pela prevalente distribuição na Colômbia e a alta incidência de casos de escorpionismo em áreas rurais e urbanas (GUERRERO-VARGAS, 2008).

Os efeitos do envenenamento gerados por *C. margaritatus* indicam que sua peçonha tem baixa toxicidade, confirmado pelos estudos clínicos e toxicológicos dos acidentados, por Marinkelle e Stahnke (1965). Esses autores mostraram nos primeiros 10 minutos após o envenenamento (63 mg/kg sc) sintomas como hipertesia, hiperatividade acompanhada de intensa hiperventilação e salivação moderada. Após 20-25 minutos da inoculação os animais continuaram hiperativos, com salivação densa, sem perda aparente do controle do nervo motor nem evidência de convulsão. Foi observado que seguidos 45-50 minutos posterior à inoculação, os animais estavam hiperativos, com respiração diminuída, mas a salivação permaneceu densa e a morte ocorreu nos 75-90 minutos seguintes. Tem-se relatado que após a picada de *C. margaritatus* os pacientes apresentam um diagnóstico de envenenamento de grau I, com exacerbação das vias respiratórias e reação alérgica moderada (SEAN, 1999). No presente estudo também foi observado o envenenamento de grau I de forma experimental.

Na avaliação da peçonha de *C. limpidus* foi marcante a dispneia, cianose e secreção salivar com aspecto espumoso com tonalidade rosa, sintomas que classificam o envenenamento como grau III e relacionados à formação de edema pulmonar (KHATTABI *et al.*, 2011). Esses efeitos também foram encontrados no estudo de Padilla *et al.*, (2003), que reportou salivação, mastigação, taquipneia, convulsões, bradipneia e taquicardia. Eles indicam que as diferenças genéticas, sexo e idade do paciente são relevantes na patogênese do envenenamento e que o tratamento oportuno com antiveneno reduz a taxa de mortalidade. No grupo de *C. limpidus* identificou-se que os parâmetros foram alterados a partir da dose de 30 µg/kg e devido às contrações musculares e paradas respiratórias, foram comuns as oscilações, com aumento e diminuição frequente nos registros, levando a um efeito bifásico nas doses de 100 e 300 µg/kg.

Sabe-se que *C. noxius* é o mais tóxico de todos os escorpiões mexicanos, amplamente estudado no isolamento de toxinas com propriedades farmacológicas (SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ *et al.*, 2016). Os efeitos de envenenamento encontrados para esta espécie foram similares aos apresentados para o grupo de *C. limpidus* com exceção das convulsões e mastigação, corroborado com os resultados do estudo de Petricevich (2006), que mostraram entre os sintomas mais frequentes, salivação e tremor observado até 120 min após a inoculação. No presente trabalho, após os 15 min do registro do grupo de *C. noxius*, na dose de 300 µg/kg, ocorreu a morte de três dos seis ratos, possivelmente pelo alto grau de envenenamento. A peçonha de *C. noxius* não apresentou oscilações no registro da hemodinâmica, embora tenha causado diminuição dose-dependente dos parâmetros sistêmicos a partir da dose de 30 µg/kg.

As variáveis da hemodinâmica analisadas nesta pesquisa são dependentes da carga, e medidas mais precisas da função ventricular estão disponíveis na curva pressão-volume (MAURER *et al.*, 2006). No presente estudo a curva pressão-volume para *C. margaritatus*, mostrou que a dose de 100 µg/kg não alterou a contratilidade, nem o trabalho sistólico pré-recrutável (PRSW). Nesse contexto, na dose de 300 µg/kg houve aumento da contratilidade (dP/dt máx) e do trabalho cardíaco, e autores indicam que estes eventos contribuem com a progressão de lesões como despolarização ventricular precoce, observadas de maneira dose-dependente no registro do eletrocardiograma (ABROUG *et al.*, 2015).

Em condições normais do coração, o aumento da contratilidade, está relacionado ao aumento da pré-carga e fração de ejeção e, neste estudo, esses parâmetros não foram alteradas para o grupo de *C. margaritatus*. Esses resultados foram similares aos encontrados no estudo da hemodinâmica sistêmica com a mesma espécie, realizado por Bonilla-Valencia (2014), que reportou aumento do dP/dt máx e diminuição do dP/dt min. Neste estudo, utilizaram as doses de 1, 10 e 100 µg e 1 mg. Além disso, na avaliação do ECG encontraram extra-sístoles ventriculares e supraventriculares, e bradicardia sinusal.

Adicionalmente, a curva pressão-volume para *C. limpidus* indica diminuição da contratilidade e da rigidez do ventrículo. O aumento da pressão venosa central gera um aumento do retorno venoso, que no caso de um coração saudável o débito cardíaco (DC) também seria aumentado, embora, devido às alterações hemodinâmicas como hipotensão, bradicardia, queda do trabalho cardíaco e do dP/dt máx, o coração não conseguiu compensar estes efeitos e o DC diminuiu de forma significativa (GARCÍA *et al.*, 2011). Com as duas maiores doses avaliadas, esta espécie

induziu um efeito bifásico na pressão arterial e a frequência cardíaca, expresso primeiro por uma resposta hipotensora transitória de aproximadamente 1 minuto, alternada com respostas basais, observado em 4 dos 6 ratos avaliados (100 µg/kg). Por outro lado, na dose maior (300 µg/kg), o efeito foi observado em 5 dos 6 ratos, com 1 caso de óbito após a dose de 100 µg/kg. Esse achado corrobora com estudos nas mesmas condições, que encontraram uma resposta bifásica com a peçonha de *Scorpio maurus palmatus* (ETTINGER *et al.*, 2013) e *L. quinquestriatus* (TARASIUK *et al.*, 1994).

Diferente dos nossos achados, o estudo hemodinâmico com a peçonha de *Buthus occitanus*, com uma DL50 (1,44 mg/kg) próxima à de *C. limpidus*, causou aumento da pressão arterial, dP/dt e resistência periférica total, assim como diminuição do débito cardíaco (ZEGHAL *et al.*, 2000) e concluíram que esses resultados foram devido à liberação massiva de catecolaminas, com estimulação dos receptores α e β com o desenvolvimento de fortes efeitos vasoconstritores sistêmicos, aumentando a pós-carga e reduzindo a atividade cardíaca.

Os dados deste trabalho indicam que a peçonha de *C. noxius* foi a mais tóxica das três avaliadas, toda a função cardíaca foi alterada após a sua administração. A curva pressão-volume na dose de 100 µg/kg indica diminuição da contratilidade e baixa rigidez do ventrículo, que foi representada pela diminuição da relação PRSW e a queda do índice de contratilidade dP/dt máximo e resistência periférica total (RPT). O débito cardíaco é regulado principalmente pela demanda de oxigênio pelas células do corpo e considerando a dificuldade respiratória e a diminuição significativa deste parâmetro, pode-se inferir que o coração não está desempenhando de forma regular sua função de transportar sangue para fornecer oxigênio, nutrientes e substâncias químicas às células do corpo, com menor desempenho sistólico do ventrículo após envenenamento (NADERI, 2018).

O presente estudo evidenciou que o volume ventricular esquerdo (VVE) foi conservado para *C. margaritatus* e *C. limpidus*, evento que pode estar associado à manutenção da fração de ejeção (FE) (GARCÍA *et al.*, 2011). Adicionalmente, cita-se que a peçonha de *C. noxius* diminuiu o trabalho cardíaco e a fração de ejeção, que é determinada pela divisão do volume ejetado e o volume diastólico final. Sugere-se que este fenômeno pode ser associado a uma possível disfunção ventricular esquerda, como também foi reportado no estudo clínico dos efeitos hemodinâmicos por *Androctonus australis* (NOUIRA *et al.*, 1995).

A pesquisa de Ettinger *et al.*, (2013) determinaram que a injeção da peçonha de *Scorpio maurus palmatus* induziu um efeito bifásico, expresso primeiro por uma resposta hipotensora rápida e transitória, que durou até 10 minutos, seguida por uma resposta hipertensiva, que durou até uma hora. Verificou-se que estes efeitos resultaram dos diferentes componentes da peçonha. A fosfolipase A2 produziu o efeito hipotensivo, enquanto uma fração polipeptídica neurotóxica não enzimática produziu o efeito hipertensivo. Baseado nesta referência é possível relacionar o efeito hipotensivo dos escorpiões mexicanos com a presença de metaloproteinases (enzimas proteolíticas), hialuronidasas e fosfatases para *C. limpidus* (URIBE *et al.*, 2017), da mesma forma, dados da literatura demonstraram para *C. noxius* compostos enzimáticos (SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ *et al.*, 2016).

Por outro lado, também é possível que a diminuição da atividade simpática, seja desencadeada pela vasodilatação, redução da pressão arterial e aumento do armazenamento de sangue nos reservatórios venosos. Geralmente há uma diminuição concomitante da frequência cardíaca, mas isso se deve possivelmente à estimulação da inervação vagal do coração, como é descrito por Barret *et al.*, (2014).

Em adição, os resultados encontrados para *C. limpidus* e *C. noxius* estão em desacordo com outros estudos, que reportaram aumento da pressão arterial, do dP/dt e da resistência periférica total, para *Buthus occitanus* (ZEGHAL *et al.*, 2000) e aumento do trabalho cardíaco e débito cardíaco no estudo com *Leiurus. quinquestriatus* (TARASIUK *et al.*, 1994). Da mesma forma, estudos prévios da hemodinâmica de *L. quinquestriatus* que reporta uma DL50 de 0,25 mg/kg, próxima à de *C. noxius*, gerou estimulação simpática, com aumento nas pressões sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, pressões arteriais pulmonares e sistêmicas e na contratilidade ventricular esquerda (GUERON *et al.* 1980), diferente do nosso estudo, o qual sugere diminuição do desempenho cardíaco para *C. noxius* (GARCÍA *et al.*, 2011).

A despolarização ventricular precoce foi evidente de forma dose-dependente para as três peçonhas, com maior número de eventos para *C. limpidus* e *C. noxius*. Esta arritmia indica o impedimento para que o impulso sinusal penetre no nó AV, resultando em uma pausa compensatória. Mesmo na presença desses eventos, o organismo pode não apresentar alterações hemodinâmicas (SCHWARZWALD *et al.*, 2009). A peçonha de *C. margaritatus* não gerou alterações significativas nos intervalos do ECG, devido que as anormalidades do ritmo cardíaco,

geralmente de curta duração, podem não contribuir com as alterações hemodinâmicas (GUERON *et al.*, 1992).

O eletrocardiograma do grupo de *C. limpidus* indicam aumento do tempo entre dois batimentos cardíacos (intervalo RR) e diminuição da despolarização atrial (intervalo P), assim como também foi reportado para *C. noxius*, além do aumento na despolarização dos ventrículos (intervalo QRS) e queda na eficiência da repolarização do ventrículo (intervalo QTc). Estes achados indicam uma possível falha cardíaca (SCHWARZWALD *et al.*, 2009) e estão de acordo com outros estudos, nos quais encontraram bradicardia, e alterações no eletrocardiograma indicando isquemia cardíaca, bloqueio do miocárdio, arritmias e infarto na avaliação da peçonha de *Leiurus quinquestriatus quinquetriatus* (0.5 mg/kg i.v) (FATANI *et al.*, 2000; KRISHNA MURTHY, 2014).

Na análise do pulmão para *C. noxius* evidenciou-se a presença de marcante hemorragia intra-alveolar, com visualização de vasos sanguíneos ectásicos e, adicionalmente, observou-se áreas com formação de edema pulmonar associado à intenso infiltrado inflamatório difuso. Dados hemodinâmicos relatam que o edema pulmonar em envenenamento escorpiónico grave pode ser de origem cardíaca. Os dados achados neste estudo mostram que *C. noxius* induziu edema pulmonar e alterações cardio-respiratórias semelhantes aos encontrados por Medjadba *et al.*, (2016), realizada com uma toxina isolada do escorpião africano *Androctonus australis* (*Aa*).

Dados da literatura também reportaram efeitos como bradicardia, edema e alterações cardiorrespiratórias no estudo com *Mesobothus tamulus* (SINGH e DESHPANDE, 2005). Outros autores como Pinto e colaboradores (2010) estudaram os efeitos cardiorrespiratórios da peçonha de *Tityus fasciolatus* na dose de 2,3 mg/kg em ratos, encontrando alterações no ECG, além de hemorragias visuais e microscópicas nos pulmões, resultados que apoiam os nossos achados para *C. noxius*.

Evidências experimentais e clínicas mostram que a cascata inflamatória e a liberação de citocinas desempenham um papel importante na patogênese de muitas síndromes de envenenamento (FUKUHARA *et al.*, 2003; PETRICEVICH, 2006). Em base nos resultados descritos na literatura, infere-se que a peçonha de *C. noxius* possivelmente poderia gerar um aumento moderado da permeabilidade capilar no rato, sendo um fator contribuinte para a hipotensão, ligado também ao edema pulmonar (MEDJADBA *et al.*, 2016).

Na análise histológica do tecido cardíaco de *C. noxius* não foram visualizadas alterações. Embora, os resultados da hemodinâmica fornecem evidências da relação entre a bradicardia, hipotensão e edema pulmonar induzido pela peçonha deste escorpião (obtido a partir de métodos físicos e histológicos), da mesma forma, corroborando com o estudo de Deshpande *et al.*, (1999) com *Buthus tamulus*.

O edema pulmonar pode estar acompanhado ou não de efeitos no tecido cardíaco, como é apresentado no estudo com *Tityus serrulatus* que reportou a presença de necrose miocárdica. Os autores sugerem que esse efeito é induzido por catecolaminas e provavelmente devido à isquemia, induzida pela demanda aumentada de oxigênio causada pela estimulação inotrópica do coração, sem evidência de um efeito tóxico direto da peçonha do escorpião no miocárdio (BENVENUTI *et al.*, 2002).

Considerando a alta incidência de escorpionismo nos países tropicais, fazia-se necessária uma análise dos efeitos e interações existentes entre a peçonha total e o sistema cardiovascular. Esta metodologia permite avaliar o desempenho cardíaco, determinado pela contratilidade, pré-carga (pressões de enchimento), pós-carga (resistências) e frequência cardíaca. Os achados principais deste estudo foram que a peçonha de *C. margaritatus* gerou leve toxicidade, com efeitos de envenenamento, catalogados de grau I, como agitação, tremor e cianose. Entretanto, *C. limpidus* apresentou toxicidade média, com hipotensão, bradicardia, aumento da pressão venosa central, diminuição do trabalho cardíaco e da contratilidade. A peçonha de *C. noxius* foi a mais tóxica, gerando alterações na maioria dos parâmetros sistêmicos avaliados.

Esses efeitos são relevantes, contribuindo com posteriores pesquisas na descoberta dos mecanismos de ação de peçonhas como *C. margaritatus*, *C. limpidus* e *C. noxius*, importante na descoberta de ferramentas farmacológicas, assim como o estudo de receptores e vias fisiológicas. Acreditamos que estes resultados ampliem os conhecimentos sobre a fisiopatologia das peçonhas de escorpiões que levam sérios eventos de intoxicação.

Tabela 8 Resumos dos resultados da Hemodinâmica sistêmica encontrados na pesquisa.

Parâmetros	<i>C. margaritatus</i>				<i>C. limpidus</i>						<i>C. noxius</i>					
	10	30	100	300	10	30	100a	100b	300a	300b	1	10	30	60	100	300
PAM	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	↓	-	↓	↓	↓	↓	↓
FC	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	↓	-	-	-	-	↓	↓
VVE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DC	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	↓	-	-	-	-	↓	↓
Ea	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVC	-	-	-	-	-	-	↑	-	↑	-	-	-	-	-	-	-
RPT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓
Tau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dP/dt min	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	↑	-	-	-	↑	↑	↑
TC	-	-	-	↑	-	-	-	↓	-	↓	-	-	-	↓	↓	↓
FE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓
dP/dt máx	-	-	-	↑	-	-	-	↓	-	↓	-	-	-	-	↓	↓

Fonte: autor.

Tabela 9 Resumos dos resultados do electrocardiograma encontrados na pesquisa.

Parâmetros	<i>C. margaritatus</i>				<i>C. limpidus</i>				<i>C. noxius</i>						
	10	30	100	300	10	30	100	300	1	10	30	60	100	300	
RR	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	↑
PR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QRS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑
QTc	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	↓
P	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	↓

Fonte: autor.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se a partir dos dados obtidos no presente estudo que a peçonha de *C. margaritatus* gerou sintomas de envenenamento de grau I e leve cardiotoxicidade, com aumento do trabalho cardíaco, contratilidade e diminuição da elastância arterial. A peçonha de *C. limpidus* induziu envenenamento de grau III e cardiotoxicidade severa, com hipotensão, bradicardia e diminuição do débito cardíaco, trabalho cardíaco e contratilidade, assim como aumento da pressão venosa central. Das peçonhas avaliadas *C. noxius* foi a mais tóxica e causou envenenamento de grau III, gerando hipotensão, bradicardia, alterações no ECG e edema pulmonar, relacionado à insuficiência ventricular esquerda, sem alteração direta no tecido cardíaco. A despolarização ventricular precoce ocorreu de forma dose-dependente, com maior frequência para *C. limpidus* e *C. noxius* que para *C. margaritatus*, vinculadas às alterações hemodinâmicas.

REFERÊNCIAS

- ABDOON, N. A.; FATANI, A. J. Correlation between blood pressure, cytokines and nitric oxide in conscious rabbits injected with *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* scorpion venom. **Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 54 (4), p. 471–80, 2009.
- ABOUMAÂD, B.; TIGER, A.; KHATTABI, A.; SOULAYMANI, R.; LAHSSAINI, M.; BENHASSAIN, S. M.; IBA, N. Cardiac involvement and its complications about three cases of severe scorpion envenomation. **Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 78, p. 78–82, 2014.
- ABROUG, F.; SOUHEIL, E.; OUANES, I.; DACHRAOUI, F.; FEKIH-HASSEN, M.; OUANES BESBES, L. Scorpion-related cardiomyopathy: Clinical characteristics, pathophysiology, and treatment. **Clinical Toxicology**, v. 53 (6), p. 511–518, 2015.
- ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Peptides Scorpion venom peptides with no disulfide bridges. **A review. Peptides**, v. 51, p. 35–45, 2014.
- B.D.V. EPIDEMIOLOGICA. Casos por entidad federativa de enfermedades no transmisibles hasta la semana epidemiológica, p. 52. 2015.
- BARRET, K. E.; BARMAN, S. M.; BOITANO, S.; BROOKS, H. L. **Fisiología Médica de Ganong**. (McGraw-Hill Interamericana, Ed.) (24th ed.). México. 2014
- BENVENUTI, L. A.; DOUETTS, K. V.; CARDOSO, J. L. C. Myocardial necrosis after envenomation by the scorpion *tityus serrulatus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96 (3), p. 275–276. 2002.
- BONILLA-VALENCIA, J. M. Evaluación hemodinámica sistémica de los efectos provocados por el veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) en ratas Wistar. **Trabajo de grado**. Universidad del Cauca, 2014.
- BORGES, A. Los escorpiones y el escorpionismo en Panamá. In **Los escorpiones y el Escorpionismo en Panamá**. 1st ed., p. 21–30, 2011.
- BORGES, A.; MIRANDA, R.; PASCALE, J. Scorpionism in Central America , with special reference to the case of Panama. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 18 (2), p. 130–143, 2012.
- BROWNELL, P.; POLIS, G. **Scorpion Biology and Research**. New York: University of Oxford, 2001.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Biología de Invertebrados**. McGraw-Hill Interamericana de España S.L, 2003.
- BUSH, S. Envenomation by the scorpion (*Centruroides limbatus*) outside its natural range and recognition of medically important scorpions. **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 10 (3), p. 161–164, 1999.
- CALDERON-ARANDA, E. S.; SELISKO, B., YORK, E. J.; GURROLA, G. B.; STEWART, J. M.; POSSANI, L. D. Mapping of an epitope recognized by a neutralizing monoclonal antibody

specific to toxin Cn2 from the scorpion *Centruroides noxius*, using discontinuous synthetic peptides. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 746–755, 1999.

CANDIA, S.; GARCIA, M. L.; LATORRE, R. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca (2+)-activated K⁺ channel. **Biophysical Journal**, v. 63 (2), p. 583–590, 1992.

CHIPPAUX, J.-P.; GOYFFON, M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. **Acta Tropica**, v. 107 (2), p. 71–79, 2008.

CHIPPAUX, J. P. Emerging options for the management of scorpion stings. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 6, p. 165–173, 2012.

CORONA, M., GURROLA, G. B.; MERINO, E.; CASSULINI, R. R.; VALDEZ-CRUZ, N. A.; GARCÍA, B.; POSSANI, L. D. A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. **FEBS Letters**, v. 532 (1–2), p. 121–6, 2002.

COSTAL-OLIVEIRA, F.; GUERRA-DUARTE, C.; OLIVEIRA, M. S.; LARISSA, K.; CASTRO, P. LOPES-DE-SOUSA, L.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Cardiorespiratory alterations in rodents experimentally envenomed with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23 (2), p. 1–9, 2017.

CUPO, P., FIGUEIREDO, A. B.; FILHO, A. P.; PINTYA, A. O.; TAVARES, G. A.; CALIGARIS, F.; SIMÕES, M. V. Acute left ventricular dysfunction of severe scorpion envenomation is related to myocardial perfusion disturbance. **International Journal of Cardiology**, v. 116 (1), p. 98–106, 2007.

CUPO, P.; HERING, S. E. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 40 (6), p. 823–830, 2002.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 41–104, 1980.

DAVIS, K. L.; MEHLHORN, U.; SCHERTEL, E. R.; GEISSLER, H. J.; TREVAS, D., LAINE, G. A.; ALLEN, S. J. Variation in Tau, the time constant for isovolumic relaxation, along the left ventricular base-to-apex axis. **Basic Research in Cardiology**, v. 94 (1), p. 41–48, 1999.

DE ARMAS, L. ., LUNA, D.; FLÓREZ, E. Composición del género *Centruroides* Marx, 1890 (scorpiones: *buthidae*) en Colombia, con la descripción de una nueva especie. **Boletín de La Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.)**, v. 50, p. 105–114, 2012.

DEHESA-DÁVILA, M.; RAMFREZ, A. N.; ZAMUDIO, F. Z.; GURROLA-BRIONES, G.; LIÉVANO, A.; DARSZON, A.; POSSANI, L. D. Structural and Functional Comparison of Toxins from the Venom of the Scorpions *Centruroides infamatus infamatus*, *Centruroides limpidus limpidus* and *Centruroides noxius* Source of Venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 113 (2), p. 331–339, 1996.

DESHPANDE, S. B.; BAGCHI, S.; RAI, O. P.; ARYYA, N. C. Pulmonary oedema produced by scorpion venom augments a phenyldiguanide-induced reflex response in anaesthetized rats. **Journal of Physiology**, v. 521 (2), p. 537–544, 1999.

- DING, J.; CHUA, P.-J.; BAY, B. H.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutic compounds. **Experimental Biology and Medicine**, v. 0, p.1–7, 2014.
- DOKUR, M.; DOGAN, M.; YAGMUR, E. A. Scorpion-related cardiomyopathy and acute pulmonary edema in a child who is stung by *Leiurus abduhbayrami*. **Turkish Journal of Emergency Medicine**, v. 17 (3), p. 104–108, 2017.
- DUEÑAS CUELLAR, R. A. Identificação e caracterização de peptídeos bioativos presentes na peçonha do escorpião Colombiano *Centruroides margaritatus* (Gervais,1841). Universidade de Brasília. **Tese**, 2014.
- DUEÑAS, R. A. Valoración in vivo del efecto tóxico, citotóxico y gentóxico del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841). Universidad del Cauca. **Trabalho de conclusão de curso**, 2009
- ESCOBAR, E.; VELÁSQUEZ, L.; RIVERA, C. Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais , 1841) (Scorpiones: Buthidae). **Revista Peruana de Biología**, v. 10 (2), p. 217–220, 2003.
- ETTINGER, K.; COHEN, G.; MOMIC, T.; LAZAROVICI, P. The Effects of a Chactoid Scorpion Venom and Its Purified Toxins on Rat Blood Pressure and Mast Cells Histamine Release. **Toxins**, V. 5, P. 1332–1342, 2013.
- FATANI, A. J.; HARVEY, A. L.; FURMAN, B. L.; ROWAN, E. G. The effects of lignocaine on actions of the venom from the yellow scorpion “*Leiurus quinquestriatus*” in vivo and in vitro. **Toxicon**, V. 38 (12), P. 1787–1801. 2000.
- FET, V., SISSOM, W.; LOWE, G.; BRAUNWALDER, M. Catalog of the scorpions of the world (1758-1998). **The New York Entomological Society**, P. 690, 2000.
- FLÓREZ, E. Escorpiones de la Familia Buthidae (Chelicerata: Scorpiones) de Colombia. **Biota Colombiana**, V. 2 (1), P. 25–30, 2001.
- FUKUHARA, Y. D. M.; REIS, M. L.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; CUNHA, F. Q. C.; DONADI, E. A. Increased plasma levels of IL-1 b , IL-6 , IL-8 , IL-10 and TNF- a in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**. v. 41, p. 49–55, 2003.
- GARCÍA-CALVO, M.; LEONARD, R. J.; NOVICK, J., STEVENS, S. P.; SCHMALHOFER, W., KACZOROWSKI, G. J.; GARCIA, M. L. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268 (25), p. 18866–74, 1993.
- GARCIA, C., CALDERÓN-ARANDA, E. S.; ANGUIANO, G. A V, BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Analysis of the immune response induced by a scorpion venom sub-fraction, a pure peptide and a recombinant peptide, against toxin Cn2 of *Centruroides noxius* Hoffmann. **Toxicon**.v. 41 (4), p. 417–27, 2003.
- GARCÍA, X.; MATEU, L.; MAYNAR, J.; MERCADAL, J.; OCHAGAVÍA, A.; FERRANDIZ, A. Estimación del gasto cardíaco. Utilidad en la práctica clínica. Monitorización disponible

invasiva y no invasiva. **Medicina Intensiva**, v. 35 (9), p- 552–561, 2011.

GARSKY, V. M.; LUMMA, P. K.; FREIDINGER, R. M.; PITZENBERGER, S. M.; RANDALL, W. C.; VEBER, D. F.; FRIEDMANT, P. A. Chemical synthesis of echistatin , a potent inhibitor of platelet aggregation from *Echis carinatus* : Synthesis and biological activity of selected analogs. **Biochemistry**, v. 86, p. 4022–4026, 1989.

GÓMEZ, J. P.; OTERO, R. Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. **Revista Facultad Nacional de Salud Pública**, v. 25 (1), p. 50–60, 2007.

GÓMEZ, J.; QUINTANA, J.; ARBELÁEZ, P.; FERNÁNDEZ, J.; SILVA, J. F.; BARONA, J.; OTERO, R. Picaduras por escorpión *Tityus asthenes* en Mutatá , Colombia : aspectos epidemiológicos , clínicos y toxicológicos. v. 30, p. 126-39, **Biomédica**, v. 30, p. 126-39, 2010.

GOUDET, C.; CHI, C.; TYTGAT, J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. **Toxicon**, v. 40, p. 1239–1258, 2002.

GUERON, M.; ADLOH, R.; GUPP, I.; GABEL, M.; GRUPP, G.; FOWLER, N. Hemodynamic and Myocardial Consequences of Scorpion Venom. **The American Journal of Cardiology**, v. 45, p. 979-986, 1980.

GUERON, M.; ILIA, R.; SOFER, S. The cardiovascular system after scorpion envenomation. **A review. Clinical Toxicology**, v. 30 (2), p- 245–258, 1992.

GUERRERO-VARGAS, J. A. Análise Proteômica Parcial da Peçonha do Escorpião Colombiano *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841). Universidade de Brasília. **Tese**, 2008.

GUERRERO VARGAS, J. A. Aislamiento, Purificación y Evaluación de Neurotoxinas del escorpión *Centruroides margaritatus* (Buthidae) del municipio del Patía. Departamento del Cauca, Colombia. Universidad del Cauca. **Trabalho de conclusão de curso**, 2002.

GUERRERO VARGAS, J. A.; RODRIGUEZ, J.; AYERBE, S.; FLOREZ, E.; BELTRÁN, J. Scorpions and dangerous species of Colombia. **In Handbook of Toxinology**. New York: Springer Publishing Company, 2014.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Guyton & Hall Tratado de Fisiología Médica**. (Elsevier Editora Ltda., Ed.) (13^a). Rio de Janeiro, 2017.

HAAG, S.; PETER, A.; HA, H.; HEYNE, N. Systemic haemodynamics in haemodialysis : intradialytic changes and prognostic significance, **Nephrology Dialysis Transplant**, v.1–9, 2018.

HASHEMZADEH, M.; FURUKAWA, M.; GOLDSBERRY, S.; MOVAHED, M. R. Chemical structures and mode of action of intravenous glycoprotein IIb / IIIa receptor blockers. **A review. Experimental Cardiology**, v. 13 (4), p. 192–197. 2008

ISBISTER, G. K.; BAWASKAR, H. S. Scorpion Envenomation. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, p. 457–463, 2014.

ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon**, v. 33 (7), p. 825–858, 1995.

ISMAIL, M.; ASAAD, N.; AL SUWAIDI, J.; AL KAWARI, M.; SALAM, A. Acute myocarditis and pulmonary edema due to scorpion sting. **Global Cardiol Science and Practice**, v. 10, p. 2–10, 2016.

- ISMAIL, M.; OSMAN, O. H.; EL-ASMAR, M. F. Pharmacological studies of the venom from the scorpion *Buthus minax* (L. Koch). **Toxicon**, v. 11, p. 15–20, 1973.
- JIMENEZ-VARGAS, J.; QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; GONZÁLES-MORALES, L.; ORTIZ, E.; POSSANI, L. D. Design and expression of recombinant toxins from Mexican scorpions of the genus *Centruroides* for production of antivenoms. **Toxicon**, p. 1-75, 2017.
- JIMÉNEZ-VARGAS, J. M.; POSSANI, L. D.; LUNA-RAMÍREZ, K. Arthropod toxins acting on neuronal potassium channels. **Neuropharmacology**. v. 128, p. 5-14, 2017.
- KHATTABI, A.; SOULAYMANI-BENCHEIKH, R.; ACHOUR, S.; SALMI, L. R. Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105 (7), p. 364–9, 2011.
- KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11 (11), p. 1469–1484, 2011.
- KLABUNDE, R. **Cardiovascular Physiology Concepts** (Book). In P. L. W. & Wilkins (Ed.), (2nd ed.), 2012.
- KOO, G. C.; BLAKE, J. T.; TALENTO, A.; NGUYEN, M.; LIN, S.; SIROTINA, A.; FEENEY, W. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. **Journal of Immunology**, v. 158 (11), p. 5120–8. 1997.
- KRISHNA MURTHY, K. The scorpion envenoming syndrome: The physiological basis of the role of insulin in scorpion. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6 (1), p. 1-56, 2000.
- KRISHNA MURTHY, K. Enzymes and toxins in scorpions of Buthidae family Insulin-Glucose Administration reverses metabolic , cardiovascular , ECG Changes and pulmonary oedema in scorpion envenoming syndrome. **International Journal of Medicine and Biosciences**, v. 3 (1), p. 9-25, 2014.
- LEBRETON, F.; DELEPIERRE, M.; RAMÍREZ, A. N.; BALDERAS, C.; POSSANI, L. D. Primary and N M R TDimensional Structure Determination of a Novel Crustacean Toxin from the Venom of the Scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karscht. **Biochemistry**, v. 33, p. 11135–11149, 1994.
- LEYTON-CASTRO, N. F.; RIASCOS-PALACIOS, J. F. Evaluación in-vivo del efecto tóxico genotóxico del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Escorpiones: Buthidae), en células de médula ósea de ratón, mediante la prueba de alteraciones cromosómicas (ACs). Universidad del Cauca. **Trabalho de conclusão de curso**, 2012.
- LOURENÇO, W. R. Scorpion incidents, misidentification cases and possible implications for the final interpretation of results. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 22 (1), p. 1–25. 2016.
- 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 (1), p. 1–12, 2018.
- MARCUSSI, S.; CANDIANI, E.; MARTINS, A., GIGLIO, J.; VENRURA, M. **Escorpiões: Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de sua toxinas**. (FUNPEC, Ed.) (1a ed.). São

Paulo, 2011.

MARINKELLE, C. J.; STAHNKE, H. L. Toxicological and clinical studies on *Centruroides margaritatus* (Gervais), a common scorpion in western Colombia. **Journal of Medical Entomology**, v. 2 (2), p. 197–199, 1965.

MARTIN, B. M.; RAMIREZ, A. N.; GURROLA, G. B.; NOBILE, M.; PRESTIPINOT, G.; POSSANIT, L. D. Novel K⁺ channel-blocking toxins from the *Centruroides limpidus limpidus* Karsch venom scorpion. **Biochemical Journal**, v. 304, p. 51–56, 1994.

MAURER, M. S.; KRONZON, I.; BURKHOFF, D. Ventricular Pump Function in Heart Failure with Normal Ejection Fraction: Insights from Pressure-Volume Measurements. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 49 (3), p. 182–195. 2006.

MCGIVERN, J. G. Ziconotide : a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Expert Opinion**, v. 3 (1), p. 69–85, 2007.

MEBS, D. **Venomous and poisonous animals : a handbook for biologists, and toxicologists and toxinologists, Physicians and pharmacists**, (Libraries Australia, Ed.). Boca Raton Press. 2002.

MEDJADBA, W.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; LARABA-DJEBARI, F. Involvement of Kallikrein-Kinin System on Cardiopulmonary Alterations and Inflammatory Response Induced by Purified Aah I Toxin from Scorpion Venom. **Inflammation**, v. 39 (1), p. 290–302, 2015.

MESQUITA, M. B. S.; MORAES-SANTOS, T.; MORAES, M. F. D. Centrally injected tityustoxin produces the systemic manifestations observed in severe scorpion poisoning. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 187(1), p. 58–66, 2003.

MILLER, C.; MOCZYDŁOWSKI, E.; LATORRE, R.; PHILLIPS, M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺ channels from mammalian skeletal muscle. **Nature**, v. 24, p. 316–8, 1985.

MOHRMAN, D. E.; HELLER, L. J. **Fisiología Cardiovascular** (6th ed.). México, Distrito Federal: McGrawHill, 2007.

MRUGALA, M. M.; ADAIR, P. J. E.; KIEM, H. Outside the Box V Novel Therapeutic Strategies for Glioblastoma. **The Cancer Journal**, v. 18 (1), p. 51–58, 2012.

NADERI, N. Hemodynamic Study. **In Practical Cardiology**, Elsevier Inc, p. 183–191, 2018.

NENCIONI, A. L. A.; NETO, E. B.; ALVES DE FREITAS, L.; DORCE, V. A. C. Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 24 (3), p. 1–11, 2018.

NOUIRA, S.; ABROUG, F.; HAGUIGA, H.; JAAFOURA, M.; BOUJDARIA, R.; BOUCHOUCHA, S. Right ventricular dysfunction following severe scorpion envenomation. **Clinical investigation**, v. 108 (3), p. 682–687, 1995.

NUNAN, E. A.; MORAES, M. F. D.; CARDOSO, V. N.; MORAES-SANTOS, T. Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Life Sciences**, v. 73 (3), p. 319–325, 2003.

OLAMENDI-PORTUGAL, T.; RESTANO-CASSULINI, R.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Peptides Functional and immuno-reactive characterization of a previously undescribed peptide from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus*. **Peptides**, v. 87, p. 34–40, 2017.

ORTIZ, E.; GURROLA, G. B.; SCHWARTZ, E. F.; POSSANI, L. D. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, v. 93, p. 125–35. 2015.

OSNAYA-ROMERO, N.; MEDINA-HERNÁNDEZ, T. DE J.; FLORES-HERNÁNDEZ, S. S.; & LEÓN-ROJAS, G. Clinical symptoms observed in children envenomated by scorpion stings, at the children's hospital from the State of Morelos, Mexico. **Toxicon**, v. 39 (6), p. 781–785, 2001.

PACHER, P.; NAGAYAMA, T.; MUKHOPADHYAY, P.; BÁTKAI, S.; KASS, D. Measurement of cardiac function using pressure–volume conductance catheter technique in mice and rats. **Nature Protocols**, v. 3 (9), p. 1422–1434. 2008.

PADILLA, A.; GOVEZENSKY, T.; POSSANI, L. D.; LARRALDE, C. Experimental envenoming of mice with venom from the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*: differences in mortality and symptoms with and without antibody therapy relating to differences in age, sex and strain of mouse. **Toxicon**, v. 41, p. 959–965. 2003.

PADILLA, A.; GOVEZENSKY, T.; POSSANI, L. D.; LARRALDE, C. Mortality and antibody responses of mice to three successive episodes of experimental scorpion (*Centruroides limpidus limpidus*) envenomation and immunological rescue. **Toxicon**, v. 46, p. 142–149, 2005.

PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J. Toxins in Drug Discovery and Pharmacology. **Toxins**, v. 10 (16), p. 1–4, 2018.

PETRICEVICH, V. L. Balance Between Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Mice Treated With *Centruroides noxius* Scorpion Venom. **Mediators of Inflammation**, p. 1–11. 2006.

PINTO, M. C.; BORBOLETA, L.; MELO, M.; LABARRÉRE, C.; MELO, M. *Toxicon Tityus fasciolatus* envenomation induced cardio-respiratory alterations in rats. **Toxicon**, v. 55, p. 1132–1137, 2010.

POLIS, G. A. **The Biology of Scorpions**. (S. U. Press, Ed.) (1 edição), 1990.

POSSANI, D. L.; MARTIN, B. M. The primary structure of noxiustoxin : A K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides*. **Carlsberg Research Communication**, v. 47, p. 285–289, 1982.

POSSANI, L. D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M.; TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 264 (2), p. 287–300, 1999.

POSSANI, L. D.; MERINO, E.; CORONA, M.; BOLIVAR, F.; BECERRIL, B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. **Biochimie**, v. 82 (9–10), p. 861–8, 2000.

QUEIROZ, A. M.; SAMPAIO, V. S.; MENDONÇA, I.; FÉ, N. F.; SACHETT, J.; FERREIRA, L. C.; MONTEIRO, W. Severity of Scorpion Stings in the Western Brazilian Amazon : A Case-Control Study. **PloS One**, v. 58, p. 1–14, 2015.

- QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; JIMÉNEZ-VARGAS, J.; GURROLA, G.; VALDIVIA, H. Scorpion venom components that affect ion-channels function. **Toxicon**, v. 72, p. 1–15, 2013.
- RADOVITS, T.; KORKMAZ, S.; LOGANATHAN, S.; BARNUCZ, E.; BOMICKE, T.; ARIF, R.; SZABÓ, G. Comparative investigation of the left ventricular pressure-volume relationship in rat models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. **American Journal Physiological Heart**, v. 297 (85), p- 125–133, 2009.
- RENDÓN-ANAYA, M.; DELAYE, L.; POSSANI, L. D.; HERRERA-ESTRELLA, A. Global Transcriptome Analysis of the Scorpion *Centruroides noxius*:New Toxin Families and Evolutionary Insights from an Ancestral Scorpion Species. **PLOS**, v. 7 (8), p. 1-12, 2012.
- RIVERA, C., FLORES, L.; PANTIGOSO, C. Isolation and characterization of antibacterial peptide from *Centruroides margaritatus* venom. **Revista Peruana de Biología**, v. 17 (1), p. 129–132, 2010.
- RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C.; GARCÍA, B. I.; AMBROSIO, C. D.; GARCÍA, D., SCALONI, A.; POSSANI, L. D. Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p- 1507–1519, 2004.
- SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, C. E.; FRANCKE, O. F.; URETA, C.; POSSANI, L. D. Scorpions from Mexico : From Species Diversity to Venom Complexity. **Toxins**, v. 8 (2), p. 1–18, 2016.
- SCHWARTZ, E. F.; MICHELLE CAPES, E.; DIEGO-GARCÍA, E.; ZAMUDIO, F. Z.; FUENTES, O.; POSSANI, L. D.; VALDIVIA, H. H. Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi* scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 157 (3), p. 392–403, 2009.
- SCHWARZWALD, C. C.; BONAGURA, J. D.; MUIR, W. **The Cardiovascular System. Equine Anesthesia**. Elsevier Inc. Cap. 3, p. 1-64, 2009.
- SELISKO, B.; GARCIA, C.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M.; POSSANI, L. D. An insect-specific toxin from *Centruroides noxius* Hoffmann cDNA , primary structure , three-dimensional model and electrostatic surface potentials. **European Journal of Biochemistry**, v. 242, p. 235–242, 1996.
- SELISKO, B.; GARCIA, C.; BECERRIL, B.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; GARAY, C.; POSSANI, L. D. Cobatoxins 1 and 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann constitute a subfamily of potassium-channel-blocking scorpion toxins. **European Journal of Biochemistry**, v. 254, p. 468–479, 1998.
- SINGH, S. K.; DESHPANDE, S. B. Intra-arterial injection of *Mesobuthus tamulus* venom elicits cardiorespiratory reflexes involving perivascular afferents. **Toxicon**, v. 46 (7), p. 820–826, 2005.
- SITGES, M., POSSANI, L. D.; BAYÓN, A. Noxiustoxin, a Short-Chain Toxin from the Mexican Scorpion *Centruroides noxius* , Induces Transmitter Release by Blocking K + Permeability. **The Journal of Neuroscience**, v. 6 (6), p. 1570–1574. 1982.
- SITPRIJA, V.; SITPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins. **Toxicon**, v. 60 (5), p. 943–53, 2012.

- SOLEGLAD, M. E.; FET, V. High-Level Systematics and Phylogeny of the Extant Scorpions (Scorpiones: Orthosterni). **Euscorpium: Occasional Publications in Scorpiology**, v. 11, 2003.
- SOUZA, J. M.; GONCALVES, B. D. C.; GOMEZ, M. V.; VIEIRA, L. B.; RIBEIRO, F. M. Animal Toxins as Therapeutic Tools to Treat Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1–25, 2018.
- STEVENS, M., PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. **Frontiers in Pharmacology**, v. 2, p. 1-12, 2011.
- SUNAGAR, K.; UNDHEIM, E.; CHAN, A.; KOLUDAROV, I.; MUÑOZ-GOMEZ, S., ANTUNES, A.; FRY, B. Evolution Stings: The Origin and Diversification of Scorpion Toxin Peptide Scaffolds. **Toxins**, v. 5, p. 2456–2487, 2013.
- TARASIUK, A.; SOFER, S.; SCHARF, M. Hemodynamic Effects Following Injection of Venom From the Scorpion *Leiurus quinquestriatus*. **Journal of Critical Care**, v. 9 (2), p. 134–140, 1994.
- TEIXEIRA, A L.; FONTOURA, B. F.; FREIRE-MAIA, L.; MACHADO, C. R.; CAMARGOS, E. R.; TEIXEIRA, M. M. Evidence for a direct action of Tityus serrulatus scorpion venom on the cardiac muscle. **Toxicon**, v. 39 (5), p. 703–9, 2001.
- TRESKATSCH, S.; FELDHEISER, A.; ROSIN, A. T.; SIFRINGER, M.; HABAZETTL, H.; MOUSA, S. A.; SPIES, C. D. A modified approach to induce predictable congestive heart failure by volume overload in rats. **PLoS ONE**, v. 9 (1), p. 1–7, 2014.
- TRIPLITT, C.; CHIQUETTE, E. Exenatide: From the Gila Monster to the Pharmacy. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 46 (1), p. 44–55, 2006.
- URIBE, J.; JIMÉNEZ, J.; FERREIRA, C.; ZAMUDIO, F., & POSSANI, L. Comparative proteomic analysis of female and male venoms from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus*: Novel components found. **Toxicon**, v. 125, p. 91–98, 2017.
- VALDIVIA, H. H.; MARTIN, B. M.; RAMIREZ, N.; FLETCHER, P. L.; POSSANI, D.; UNIT, M. N.; BUILDING, S. Isolation and Pharmacological Characterization Toxins from the Scorpion hoffmanni of Four *Centruroides* Novel Na + noxius. **Journal of Biochemistry**, v. 116, p- 1383–1391, 1994.
- VALVERDE, P.; KAWAI, T.; TAUBMAN, M. A. Selective blockade of voltage-gated potassium channels reduces inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19 (1), p. 155–164, 2004.
- VISWANATHAN, S.; PRABHU, C. Scorpion sting nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 4 (6), p. 376–382, 2011.
- WANG, R.; MOREAU, P.; DESCHAMPS, A.; CHAMPLAIN, J.; SAUVÉ, R.; FOUCART, S. Cardiovascular effects of *Buthus martensii* (karsch) scorpion venom. **Toxicon**, v. 32 (2), p. 191–200, 1994.
- XIAO, L.; GURROLA, G. B.; ZHANG, J.; VALDIVIA, C. R.; SANMARTIN, M.; ZAMUDIO, F. Z.; VALDIVIA, H. H. Structure–function relationships of peptides forming the calcin family of ryanodine receptor ligands. **The Journal of General Physiology**, v. 147 (5), p. 375–394,

2016.

ZEGHAL, K.; SAHNOUN, Z.; GUINOTB, M.; RICHERB, C.; GIUDICELLIB, J.
Characterization and mechanisms of the cardiovascular and haemodynamic alterations induced
by scorpion venom in rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 14, p. 351–361, 2000.