

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE HUMANIDADES, CIÊNCIAS E EDUCAÇÃO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

FERNANDA FREDERICO GAVA

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO VENENO ESCORPIÔNICO DA *Tityus*
serrulatus (Lutz e Mello, 1922) SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

CRICIÚMA

2017

FERNANDA FREDERICO GAVA

AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO VENENO ESCORPIÔNICO DA *Tityus serrulatus* (Lutz e Mello, 1922) SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS BALB/c

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do grau de Bacharel em Biologia no curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientador(a): Prof. (a) Dra. Samira da Silva Valvassori

Coorientador(a): Prof. (a) Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila

CRICIÚMA

2017

FERNANDA FREDERICO GAVA

AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO VENENO ESCORPIÔNICO DA *Tityus serrulatus* (Lutz e Mello, 1922) SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS BALB/c

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Bacharelado em Biologia, no Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Neurociências.

Criciúma, 07 de novembro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Samira da Silva Valvassori - Doutora - (Universidade do Extremo Sul Catarinense)

Gustavo Colombo Dal Pont - Mestre - (Universidade do Extremo Sul Catarinense)

Daysiane de Oliveira - Mestre - (Universidade do Extremo Sul Catarinense)

Dedico este trabalho aos meus familiares, amigos e colegas de trabalho, que proporcionaram total apoio, aprendizado e paciência, sem eles esta conquista não seria possível.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Dra. Samira S. Valvassori, uma profissional e pessoa incrível, um exemplo ao qual pude e posso me espelhar para o futuro. Obrigada pelas orientações, parceria, amizade, aprendizado e principalmente por acreditar na minha capacidade de realizar este trabalho.

Ao meu coorientador, professor Ricardo Andrez Machado de Ávila, pela parceria, por esclarecer todas as dúvidas e por toda a ajuda necessária para que tudo desse certo.

A todo o pessoal do laboratório, especialmente a Daniela Vicente Bavaresco, Gustavo Colombo Dal Pont, Roger Bitencourt Varela e Wilson Rodrigues Resende, pelos ensinamentos nesses dois anos e meio de laboratório e pela amizade construída, quero levar para a vida toda.

Aos amigos da turma, Lucas, Mikaela, Natália e Samira Leila, principalmente a Elaine e a Maria Eduarda, por serem as melhores, pela parceria e amizade, pela troca de experiência, pelos campos sofridos, pelas conversas, conselhos e risadas durante o curso. Por sermos aquele trio que não se separa nunca, obrigada por esses quatro anos incríveis ao lado de vocês.

Ao melhor amigo Paraense Luiz Felipe Andrade Quadros vulgo Boi, pela amizade, pelas paçocas e o café de todo dia, por fazer meus dias mais alegres com sua imaginação fértil e pelas melhores fotos e vídeos espontâneos já tirados da minha pessoa.

Ao meu namorado Guilherme, por estar ao meu lado, me incentivando e falando todos os dias que tudo daria certo. Obrigada por estar presente nesse momento, pelo apoio, compreensão e por tornar meus dias mais agradáveis e incríveis ao seu lado.

A toda a minha família e, as pessoas mais importantes da minha vida, meu pais, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui, que são o meu porto seguro. Obrigada por tudo, pela educação, pelo exemplo de vida e por apoiarem a minha escolha. Vocês serão meu exemplo para a vida toda. O que sou hoje, foi porque vocês lutaram e muito, devo muito a vocês. Amo vocês.

Poderia escrever muito mais, mas ainda assim não seria o suficiente para descrever o quanto sou grata. Obrigada de coração a todos vocês!

“No semblante de um animal, que não fala, há um discurso que somente um espírito sábio realmente entende!”

Mahatma Ghandi

RESUMO

Acidente escorpiônico ou escorpionismo é o quadro de envenenamento provocado pela picada de escorpião. A espécie de escorpião *Tityus serrulatus* (*T. serrulatus*) é considerada a mais agressiva e possui uma ampla distribuição no Brasil. A maioria dos componentes identificados no veneno da *T. serrulatus* são as neurotoxinas; que, possuem uma ampla ação sobre o sistema nervoso central (SNC). Apesar de serem bem descritos na literatura, os efeitos do veneno deste escorpião sobre o SNC, não se sabe ao certo os efeitos comportamentais induzidos por essas toxinas. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos dessas neurotoxinas sobre o comportamento, o aprendizado e a memória. O objetivo pretendido com o presente estudo é avaliar os efeitos comportamentais após a administração do veneno escorpiônico da *T. serrulatus* em camundongos. Foram utilizados 60 camundongos Balb/c machos, adultos. Os animais foram submetidos a administração via intracerebroventricular (ICV) a mão livre do veneno da *T. serrulatus*, divididos em cinco grupos experimentais: LCRA (controle) e doses de 10 ng/μL, 100 ng/μL, 200 ng/μL e 300 ng/μL. Após 24h da administração do veneno, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto e de memória de habituação. A partir dos dados obtidos no teste de campo aberto foi observado que o veneno do escorpião não alterou a atividade locomotora, a atividade exploratória, os comportamentos estereotípicos e os comportamentos do tipo ansiosos em nenhuma das doses avaliadas. Entretanto, o veneno na dose de 100 ng/μL induziu dano na memória de habituação dos animais. Portanto, pode ser concluído que os efeitos neurotóxicos do veneno da *T. serrulatus*, apesar de não alterar movimentos livres e comportamento do tipo ansioso, pode levar a um dano cognitivo. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor caracterizar os efeitos do veneno da *T. serrulatus* sobre o comportamento e o SNC.

Palavras-chave: *Tityus serrulatus*. Neurotoxinas. Comportamento. Memória de habituação. Sistema nervoso central.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho experimental cronológico partindo da administração via ICV do veneno do escorpião <i>T. serrulatus</i>	21
Figura 2 - Efeitos da administração do veneno escorpiônico da <i>Tityus serrulatus</i> sobre o número de cruzamentos e número de levantamentos dos animais.....	22
Figura 3 - Efeitos da administração do veneno escorpiônico da <i>Tityus serrulatus</i> sobre o tempo de auto-limpeza e tempo de limpeza das vibrissas dos animais.....	23
Figura 4 - Efeitos da administração do veneno escorpiônico da <i>Tityus serrulatus</i> sobre o tempo de latência, número de visitas ao centro e número de bolo fecal dos animais.....	24
Figura 5 - Efeitos da administração do veneno escorpiônico da <i>Tityus serrulatus</i> sobre a memória de habituação dos animais.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
ICV	Intracerebroventricular
Kv	Canais Iônicos para Potássio Dependentes de Voltagem
LCRa	Líquido Cefalorraquidiano Artificial
Nav	Canais Iônicos para Sódio Dependentes de Voltagem
NO	Óxido Nítrico
SAAr	Soro Antiveneno Aracnídeo
SAV	Soro Antiveneno
SAE	Soro Antiveneno Escorpiônico
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 ESCORPIÕES	11
1.2 O GÊNERO <i>Tityus</i>	11
1.3 A ESPÉCIE <i>Tityus serrulatus</i>	11
1.4 ACIDENTE ESCORPIÔNICO	12
1.5 O ENVENENAMENTO POR <i>Tityus serrulatus</i>	13
1.6 TRATAMENTO.....	13
1.7 MECANISMOS DE AÇÃO DO VENENO.....	14
1.8 EFEITOS COMPORTAMENTAIS	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	19
3.2 ANIMAIS	19
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	19
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	20
3.4.1 Teste de campo aberto.....	20
3.4.2 Teste de memória de habituação.....	20
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	21
4 RESULTADOS	22
4.1 TESTE COMPORTAMENTAL	22
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30
ANEXOS	37
ANEXO I – PARECER DO CEUA	38
ANEXO II – CARTA ADENDO	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESCORPIÕES

Os escorpiões estão amplamente distribuídos pelo mundo. Existem aproximadamente 2.069 espécies registradas, com 15 famílias subdivididas em 197 gêneros. (DI et al., 2014). A família Buthidae apresenta cerca de 34 espécies consideradas potencialmente agressoras para os seres humanos, incluindo as espécies do gênero *Tityus* (CHIPPAUX; GOYFFON, 2008). Esses escorpiões são de extrema relevância para a medicina, sendo responsáveis por muitos casos de envenenamento (PRENDINI; WHEELER, 2005; CHIPPAUX; GOYFFON, 2008, BRASIL, 2009a; STOCKMAN; YTHIER, 2010; ISBISTE; BAWASKAR, 2014; SHARMA et al., 2015; STOCKMAN, 2015).

1.2 O GÊNERO *Tityus*

No Brasil, as principais espécies de importância para a saúde pública pertencentes ao gênero *Tityus* são a *Tityus serrulatus* (escorpião-amarelo) e a *Tityus bahiensis* (escorpião-marrom) no Sudeste, a *Tityus stigmurus* (escorpião-amarelo-do-nordeste) no Nordeste e a *Tityus obscurus* (escorpião-preto-da-amazônia) no Norte (BRASIL, 2009a; RECKZIEGEL; PINTO JR, 2014; BRASIL, 2016a). O gênero *Tityus* contém o maior número de espécies de escorpiões. Mais de 60% dos escorpiões encontrados em regiões tropicais e subtropicais pertencem a este gênero (BRASIL, 2001).

1.3 A ESPÉCIE *Tityus serrulatus*

A espécie *T. serrulatus* mede aproximadamente de 6 a 7 cm (adulto), apresenta um corpo marrom amarelado com pedipalpos e pernas amarelados (LUTZ; MELLO, 1922). Possui um prolongamento ao final do corpo denominado metassoma, onde localiza-se o télson, responsável por injetar o veneno na presa ou no predador. No interior do télson há um par de glândulas de produção de veneno (MARCUSI; ARANTES; SOARES, 2011). Essa espécie é considerada a espécie de escorpião mais agressiva, com uma ampla distribuição no Brasil (PUCCA et al., 2015a).

A distribuição da espécie *T. serrulatus* limitava-se ao estado de Minas Gerais, mas devido à boa adaptação aos ambientes urbanos, e a sua rápida e ampla proliferação, sua distribuição se expandiu para outros estados, como: Bahia, Ceará, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Pernambuco, Sergipe, Piauí, Rio Grande do Norte, Goiás, Distrito Federal e Santa Catarina (BRASIL, 2009b).

Um dos fatores que contribuem para a proliferação e dificuldade de controle da distribuição da *T. serrulatus* é a capacidade de se reproduzir por partenogênese. Neste tipo de reprodução, o embrião é desenvolvido a partir de um óvulo não fertilizado; portanto, não é necessária a presença de um macho para que haja reprodução (LOURENÇO, 2008). A partir da partenogênese, é possível originar cerca de 20 novos indivíduos em cada prole (MARCUSSE; ARANTES; SOARES, 2011). A reprodução por partenogênese combinada com a fácil adaptabilidade da espécie em áreas urbanas, contribui para o número crescente de indivíduos em todo o país. Isso explica também a razão pela qual a *T. serrulatus* é a responsável pelo maior número de acidentes por envenenamento em diferentes regiões do Brasil (CHIPPAUX; GOYFFON, 2008).

1.4 ACIDENTE ESCORPIÔNICO

Acidente escorpiônico ou escorpionismo é o quadro de envenenamento provocado pela inoculação de veneno através do aparelho inoculador (ferrão ou telson) dos escorpiões (BRASIL, 2009a). Picadas de escorpião são consideradas um problema médico-sanitário global em muitos países tropicais e subtropicais (CHIPPAUX; GOYFFON, 2008). Essas picadas podem levar a um quadro de envenenamento humano, cuja gravidade e evolução variam amplamente, havendo casos de sequelas temporárias ou, até mesmo, de morte (BRASIL, 2009a; PRENDINI; WHEELER, 2005; STOCKMAN; YTHIER, 2010; SHARMA et al., 2015; STOCKMAN, 2015)

No período entre 2000 e 2016, foram relatados no Brasil 827.644 casos de escorpionismo, com 1.153 óbitos (PUCCA et al., 2015b; BRASIL, 2016b; RECKZIEGEL e PINTO, 2014; CHIPPAUX, 2015). Neste mesmo período, o número de acidentes escorpiônicos notificados foi superior ao total de acidentes causados por abelhas, cobras e aranhas combinados (PUCCA et al., 2015b; BRASIL, 2016b)

Cerca de 70% dos casos de escorpionismo ocorrem dentro de áreas urbanas ou em torno de residências e, em sua maioria, em indivíduos entre 20 e 49 anos de idade. No entanto,

a maior proporção de mortes é observada em indivíduos menores de 14 anos de idade (BRASIL, 2001). Além disso, a combinação de altas temperaturas e umidade aumenta a taxa de incidência durante os meses de verão, quando os escorpiões se tornam mais ativos (BARBOSA et al., 2012).

1.5 O ENVENENAMENTO POR *Tityus serrulatus*

Os sintomas resultantes de picadas da *T. serrulatus* são variáveis e podem ser agrupados em três fases, dependendo da gravidade da intoxicação. Na maioria dos casos, o envenenamento inicial é benigno e atinge a fase I, caracterizada por dor intensa na maioria dos casos (Fase Ia); agitação, febre, suor, náuseas e a flutuação da pressão sanguínea (Fase Ib). Em casos moderados, há o progresso da fase I para a fase II (5-10% dos casos), onde os sintomas são caracterizados por sudorese, vômitos, cólicas, diarreia, hipotensão, bradicardia, obstrução pulmonar e dispneia. A última e mais perigosa é a fase III, a qual é caracterizada por complicações respiratórias, tais como o edema pulmonar, broncoespasmo e cianose. Essa última fase pode ser associada com hipertermia, arritmia cardíaca e isquemia do miocárdio (CHIPPAUX; GOYFFON, 2008). O envenenamento pela *T. serrulatus* pode causar vários sinais e sintomas diferentes de acordo com a composição do veneno, peso corporal da vítima, permeabilidade ao sangue, barreira cerebral, sexo, condições de saúde e local de picada (AMARAL; DE REZENDE; FREIRE-MAIA, 1993; NISHIOKA; SILVERIA; PEREIRA, 1993; AMITAI, 1998; NUNAN et al., 2003; BAHLOUL et al., 2010; BUCARETCHI et al., 2014; GUIDINE et al., 2014).

1.6 TRATAMENTO

A administração do soro antiveneno escorpiônico (SAE) ou o soro antiveneno aracnídeo (SAAr) é indicado para crianças menores de 7 anos, e para todos os pacientes com envenenamento grave (NOUIRA et al., 2005; MARCUSSI; ARANTES; SOARES, 2011). Entre as crianças com idade superior a 7 anos e os adultos com envenenamento moderado, a dor deve ser primeiramente tratada usando analgésicos orais e compressas de água quente no local afetado. No caso de dor mais severa, analgésicos parenterais e / ou infiltração local ou bloqueio usando agentes anestésicos sem vasoconstritor também podem ser utilizados. Se as manifestações sistêmicas persistirem mesmo após a analgesia, o soro antiveneno (SAV) é

indicado (CUPO, 2015). São recomendadas três ampolas de SAE para casos moderados e, seis ampolas de SAE para casos graves, administrados por via intravenosa durante um período de 15 a 20 minutos com monitoramento dos pacientes (NOUIRA et al., 2005; (MARCUSSE; ARANTES; SOARES, 2011).

O uso do SAV tem como objetivo neutralizar o veneno circulante e o veneno que está sendo absorvido no local da picada (uma vez que o escorpião não injetou seu veneno diretamente na circulação) (FREIRE-MAIA; CAMPOS, 1989), reduzindo ou interrompendo a liberação de mediadores, antes de produzir efeitos sobre órgãos alvo (CUPO, 2015). Os soros hiperimunes heterólogos são medicamentos que contém anticorpos produzidos por animais imunizados. Atualmente, no Brasil, o SAV é rotineiramente produzido em cavalos. Inicia-se o processo com a imunização de cavalos com antígenos específicos, que são preparados com os venenos de animais peçonhentos para produção dos soros hiperimunes (BRASIL, 2017.) Embora este antiveneno heterólogo tenha provado ser efetivo na redução da taxa de mortalidade em picadas da *T. serrulatus*, sua produção pode apresentar alguns problemas (PUCCA et al., 2015b). O soro heterólogo representa um risco de complicações graves, como anafilaxia e doença no soro (RONCOLATO et al., 2015). Além disso, em relação à sua produção, alguns dos obstáculos encontrados são o alto custo de manter os cavalos, a dificuldade em obter grandes quantidades de veneno e a produção de grandes quantidades de anticorpos não neutralizantes. Desta forma, vários esforços foram feitos para produzir um melhor antiveneno usando anticorpos humanos recombinantes, o que mitigaria esses efeitos colaterais. Um fragmento de anticorpo monoclonal humano, chamado Serrumab, mostrou neutralizar muitas toxinas presentes no veneno da *T. serrulatus*. Este anticorpo poderia ser considerado hoje a melhor alternativa para um anticorpo neutralizante para formular um soro anti-*T. serrulatus* humano no Brasil (PUCCA et al., 2012, 2014).

1.7 MECANISMOS DE AÇÃO DO VENENO

O veneno do escorpião *T. serrulatus* é uma mistura complexa, composta por lipídeos, nucleotídeos, proteínas (incluindo proteases e hialuronidases), mucopolissacarídeos e peptídeos (incluindo várias neurotoxinas) (GOMEZ; DINIZ, 1966; COLOGNA et al., 2009). As neurotoxinas presentes nos venenos de escorpião evoluíram para uma bioatividade específica, visando, atacar e imobilizar as presas, mas também servem como importante arma de defesa contra predadores (BOSMANS; TYTGAT, 2007).

A maioria dos componentes identificados do veneno da *T. serrulatus* são as neurotoxinas; portanto, uma grande quantidade de estudos sobre a *T. serrulatus* foca nos efeitos neurotóxicos do seu veneno. Os mecanismos de ação dessas neurotoxinas estão relacionados, principalmente, à ativação de canais iônicos para sódio dependentes de voltagem (Nav) e canais iônicos para potássio dependentes de voltagem (Kv). Esses canais levam ao potencial de ação, promovendo a permeabilidade aos íons, iniciando assim, o potencial de ação (FREIRE-MAIA; CAMPOS, 1989; GWEE et al., 2002). O potencial de ação é o sinal que nervos levam a outros neurônios ou outras células efetoras. Células excitáveis exibem um potencial de repouso negativo (entre -70mV para neurônios). Quando ocorre o influxo do íon de sódio e o efluxo do íon de potássio, o potencial de membrana atinge um limiar de 40mV, ocorre a despolarização da membrana, desencadeando o potencial de ação (CURI; ARAÚJO-FILHO, 2009).

As neurotoxinas da *T. serrulatus* se ligam aos canais iônicos pré- ou pós-sinápticos, levando a uma liberação maciça de neurotransmissores, incluindo catecolaminas e acetilcolina. Essas alterações dos canais iônicos, com conseqüente liberação anormal de neurotransmissores, levam a sintomatologia do envenenamento pela *T. serrulatus* (PUCCA et al., 2015b).

Diferentes neurotoxinas do veneno da *T. serrulatus* que ativam Nav e Kv foram descritas e caracterizadas. As toxinas que ativam especificamente os canais para Nav são formadas por longas cadeias de peptídeos e são categorizadas em duas classes: α - e β -toxinas. As α -neurotoxinas retardam a inativação dos canais para Nav e induzem um prolongamento da fase de despolarização do potencial de ação. Já as β -neurotoxinas alteram a ativação de voltagem dos canais para Nav, dando origem a uma maior tendência da célula a disparar espontaneamente e repetidamente, o potencial de ação (CESTÉLE; CATTERALL, 2000; BORDON et al., 2015).

Ainda dentro dessas duas classes, o veneno da *T. serrulatus* apresenta as seguintes toxinas: Ts1, Ts2, Ts3, Ts4, Ts5, Ts17 e Ts18 (BORDON et al., 2015). A Ts1 é a toxina encontrada em maior quantidade no veneno (16% do veneno solúvel bruto) e contribui significativamente para a sua toxicidade do veneno (VASCONCELOS et al., 2005). A Ts1 é, também, a toxina mais estudada do veneno da *T. serrulatus*, atuando de forma mais intensa sobre a cinética de ativação de Nav1.2, Nav1.4 e Nav1.6, causando a abertura desses canais durante o potencial de repouso (PEIGNEUR et al., 2015). Por sua vez, o mecanismo de ação da Ts2 está ligado a inibição da inativação de Nav1.2, Nav1.3, Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 (COLOGNA et al., 2012). A Ts3 induz a liberação de catecolaminas, de acetilcolina (ACh), de óxido nítrico (NO), de ácido Gama-aminobutírico (GABA), de aspartato e glutamato, devido a sua ação primária sobre os canais para Nav (BORDON et al., 2015; COLOGNA et al., 2009).

A Ts4 induz a liberação dose-dependente de GABA e glutamato a partir do sinaptosoma. Essa neurotoxina era previamente conhecida como um peptídeo não tóxico; entretanto, foi demonstrado que essa toxina induz uma reação alérgica com lacrimação e com espasmos (SAMPAIO et al., 1996). Recentemente foi descoberto que a Ts4 age sobre Nav1.6 (PUCCA et al., 2015a). A Ts5 possui efeito sobre a subunidade α de Nav, inibindo a rápida inativação de Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 (PUCCA 2015b). As neurotoxinas Ts17 e Ts18 foram recém-descobertas e também foram alocadas no grupo das toxinas que agem sobre os canais os canais de sódio, devido as suas semelhanças com outras toxinas desse grupo (ALVARENGA et al., 2012).

Existem também as neurotoxinas que afetam os canais para Kv. Essas componentes são extremamente importantes, pois trabalham em sinergia com outras neurotoxinas, potencializando o efeito do veneno. Os canais para Kv são responsáveis por manter o potencial de membrana em equilíbrio, ajudando na repolarização das células excitáveis durante o potencial de ação (MOUHAT et al., 2008). As toxinas da *T. serrulatus*, Ts6, Ts7, Ts8, Ts9, Ts15, Ts16, Ts19 e fragmentos da Ts19 são classificadas no grupo das toxinas que agem sobre os canais para Kv. A toxina Ts6 bloqueia, em baixas concentrações, Kv1.2, Kv1.3 e o canal shaker. A toxina Ts7 é um potente bloqueador de múltiplos subtipos de canais, incluindo Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4 e shaker (CERNI et al., 2014). A Ts8 bloqueia seletivamente Kv ativos (ROGWSKI et al., 1994). O mecanismo de ação da Ts15 está ligado ao bloqueio de Kv1.2 e Kv1.3 (COLOGNA et al., 2011). A neurotoxina Ts16 está sendo estudada; entretanto, foi incluída nesse grupo pois possui grande semelhança com as demais toxinas desse grupo (SAUCEDO et al., 2012). Um dos fragmentos da Ts19, chamado de Frag-II da Ts19, é um bloqueador específico de Kv1.2 (ALVARENGA et al., 2012; CERNI et al., 2014).

As toxinas dos escorpiões têm sido usadas como ferramentas para estudos dos mecanismos neurofisiológicos envolvendo canais iônicos dependentes de voltagem (principalmente Nav) e liberação de neurotransmissores (ARANTES et al., 1994). Todas essas ações das neurotoxinas da *T. serrulatus* sobre os canais para íons estão correlacionadas com os efeitos do veneno sobre os neurônios e músculo esquelético.

1.8 EFEITOS COMPORTAMENTAIS

Apesar dos efeitos do veneno da *T. serrulatus* sobre o SNC serem bem descritos na literatura, não se sabe ao certo os efeitos comportamentais induzidos por seus componentes.

Portanto, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos dessas neurotoxinas sobre o comportamento, o aprendizado e a memória.

No estudo de Santos-da-Silva e colaboradores (2017) relatou-se alterações comportamentais em ratos induzidas pelo veneno da *T. serrulatus*. Imediatamente após a injeção do veneno, os animais apresentaram sintomas caracterizados por agitação e vocalização, lacrimação, ptose palpebral, sialorréia e secreções nasais com sangue, dificuldade respiratória, alterações nos movimentos de mastigação, comportamentos estereotípicos, espasmos (membro posterior) e convulsões. Os efeitos iniciaram 5 minutos após a injeção do veneno e continuaram por aproximadamente 3 horas. O mesmo estudo demonstrou que na avaliação das atividades gerais e locomotoras realizadas 1 hora após a injeção do veneno do escorpião *T. obscurus*, os animais apresentaram uma diminuição significativa nas atividades gerais e locomotoras (SANTOS-DA-SILVA et al., 2017).

Como descrito anteriormente, o veneno de escorpião é neurotóxico, o que pode induzir danos a células do SNC. Entretanto, não se sabe ao certo quais os danos podem estar relacionados aos efeitos neurotóxicos do veneno do escorpião *T. serrulaus*. Estudos avaliando os efeitos comportamentais e neuroquímicos do veneno do escorpião *T. serrulatus* são necessários para o melhor entendimento dos mecanismos deste veneno.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração do veneno escorpiônico da *T. serrulatus* sobre parâmetros comportamentais em camundongos Balb/c.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da administração do veneno escorpiônico da *T. serrulatus* sobre a atividade locomotora, atividade exploratória, comportamentos estereotípicos e comportamentos do tipo ansiosos em camundongos Balb/c através do teste de campo aberto.

- Avaliar os efeitos da administração do veneno escorpiônico da *T. serrulatus* sobre a memória de habituação em camundongos Balb/c através do teste de memória de habituação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, o qual estabelece a Diretriz da Prática de Eutanásia e Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (Protocolo 005/2017-1).

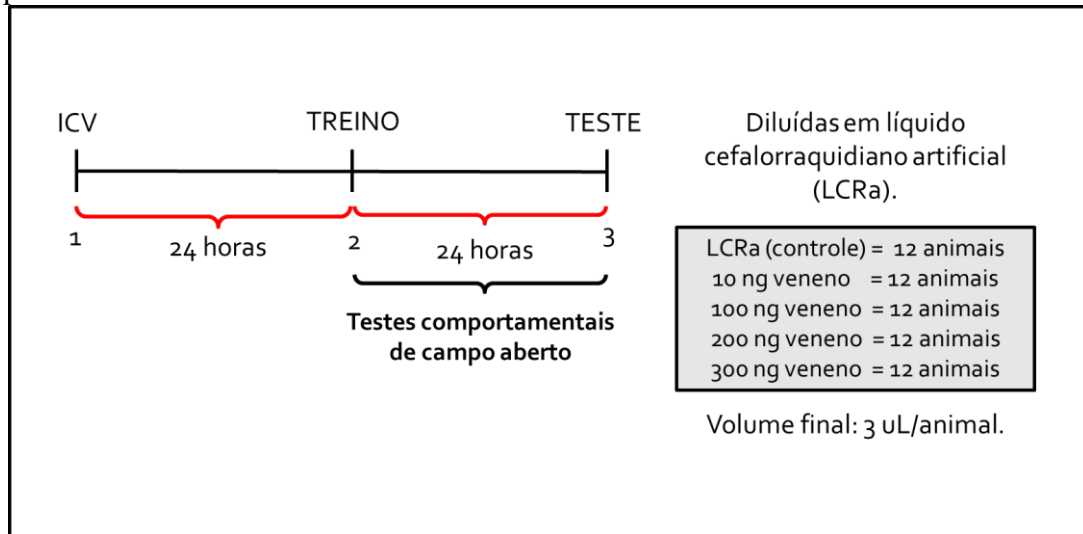
3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 60 camundongos Balb/c, machos adultos, com 60 dias, pesando entre 25 a 30g provenientes do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno (41x34x16 cm), distribuídos em 6 animais por caixa, sob um ciclo claro/escuro de 12h, água e comida *ad libitum* e temperatura de $23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: LCRa (controle), 10 ng/ μL , 100 ng/ μL , 200 ng/ μL e 300 ng/ μL de veneno da *T. serrulatus*. Todas as doses de veneno foram diluídas em líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa), com um volume final de 3 μL por camundongo. O grupo controle recebeu apenas (LCRa). Para cada grupo experimental foi utilizado um $n = 12$ animais por grupo, totalizando 60 animais. No primeiro dia foi realizada a administração via intracerebroventricular (ICV) a mão livre do veneno da *T. serrulatus*. Após 24 horas da administração do veneno, os animais foram submetidos aos testes comportamentais (**Figura 1**).

Figura 1. Desenho experimental cronológico partindo da administração via ICV do veneno do escorpião *T. serrulatus*.



Fonte: Do autor, 2017.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Teste de campo aberto

O teste de campo aberto foi realizado em um aparato de (40x40 cm) cercado por três paredes de madeira de 50 cm de altura e com um vidro frontal na mesma medida. A parte inferior do aparato é dividida em 16 quadrantes de linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante inferior esquerdo (IZQUIERDO; MEDINA 1997; TAUBENFELD et al., 1999; CAMMAROTA et al., 2000).

Foi avaliado, durante 5 min, o número de cruzamentos (momento que o animal cruza a linha), a atividade exploratória (momento que o animal fica apoiado sobre as patas trazeiras), a latência (tempo que o animal leva para sair do primeiro quadrante), as visitas ao centro do aparato (momento que o animal passa ou para no centro do aparato), o *grooming* (tempo de auto-limpeza), sniffing (tempo de limpeza das vibrissas) e bolo fecal (quantidade de fezes).

3.4.2 Teste de memória de habituação

O teste de memória de habituação foi realizado no mesmo aparato do teste do campo aberto. O teste foi dividido em duas etapas, na primeira etapa denominada habituação (treino), os animais foram colocados no aparato para que pudessem explorar o ambiente. O tempo de

exploração foi de 5 min, em que contabilizou-se o número de cruzamentos (momento que o animal cruza a linha) e a atividade exploratória (momento que o animal ergue-se sobre as patas trazeiras).

Após 24 horas realizou-se o teste, onde o mesmo animal foi colocado novamente por 5 min no aparato e foram avaliados os mesmos parâmetros. Avaliando-se, então, a memória de habituação, uma vez que é esperado que os animais se lembrem do ambiente, fazendo com que explorem menos o ambiente do aparato (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; TAUBENFELD et al., 1999; CAMMAROTA et al., 2000).

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

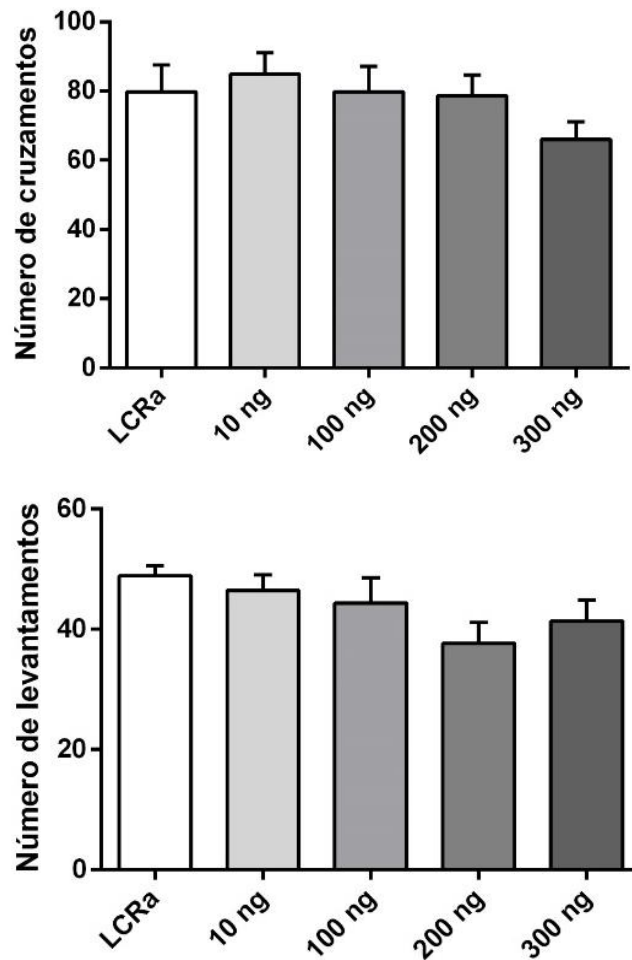
Para as análises estatísticas dos testes comportamentais foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguida pelo post hoc de Tukey para avaliação da atividade locomotora, atividade exploratória, latência, *grooming*, *sniffing*, visitas ao centro e bolo fecal. Para a avaliação da memória de habituação foi utilizado o teste T *student* para amostras dependentes. Foi considerado estatisticamente significativo quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 TESTE COMPORTAMENTAL

Na **figura 2** pode ser observado que não houve diferença significativa na atividade locomotora (número de cruzamentos) e na atividade exploratória (número de levantamentos) dos animais em nenhuma das doses avaliadas, quando comparadas com o grupo controle. ANOVA de uma via revelou efeitos não significativos da administração do veneno da *T. serrulatus* [*Crossings*: $p < 0,308$; *Rearings*: $p < 0,111$].

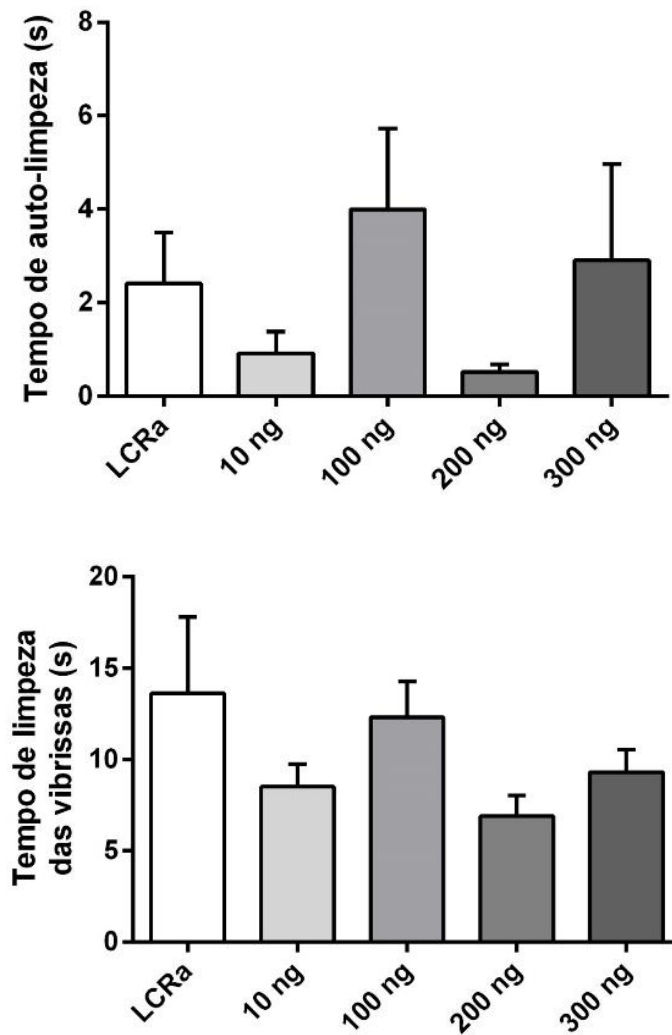
Figura 2. Efeitos da administração do veneno escorpiônico da *Tityus serrulatus* sobre o número de cruzamentos e número de levantamentos dos animais ($n = 12$ por grupo). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. As análises foram realizadas utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc de Tukey, considerando $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativo.



Fonte: Do autor, 2017.

Na **figura 3** pode ser observado que não houve diferença significativa no comportamento estereotípico dos animais, avaliado através do tempo de auto-limpeza e do tempo limpeza das vibrissas dos animais. ANOVA de uma via revelou efeitos não significativos da administração do veneno da *T. serrulatus* [*Groomings*: $p < 0,102$; *Sniffings*: $p < 0,312$].

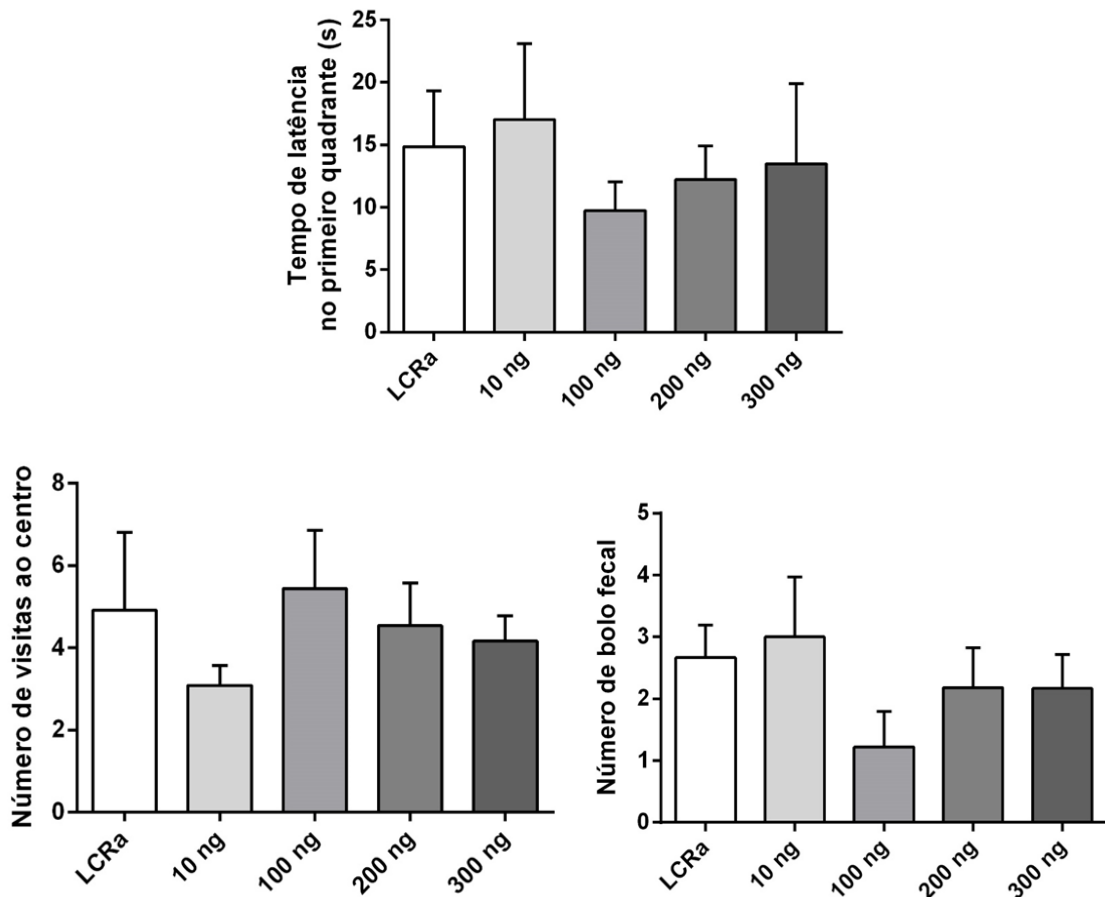
Figura 3. Efeitos da administração do veneno escorpionico da *Tityus serrulatus* sobre o tempo de auto-limpeza e tempo de limpeza das vibrissas dos animais (n = 12 por grupo). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. As análises foram realizadas utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc de Tukey, considerando $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativo.



Fonte: Do autor, 2017.

Na **figura 4** pode ser observado que não houve diferença significativa no comportamento do tipo ansioso dos animais, avaliado através dos seguintes comportamentos: tempo de latência no primeiro quadrante, número de visitas ao centro do campo aberto e número de bolo fecal dos animais. ANOVA de uma via revelou efeitos não significativos da administração do veneno da *T. serrulatus* [Latência: $p < 0,701$; Visitas ao centro: $p < 0,732$; Bolo fecal: $p < 0,475$].

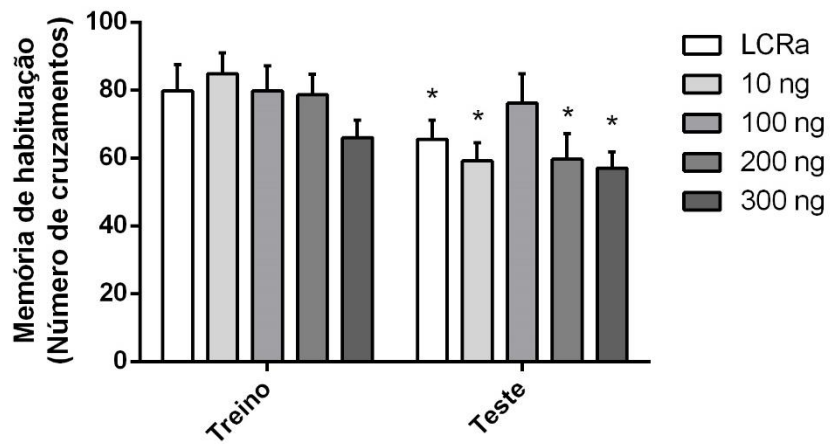
Figura 4. Efeitos da administração do veneno escorpionico da *Tityus serrulatus* sobre o tempo de latência, número de visitas ao centro e número de bolo fecal dos animais ($n = 12$ por grupo). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. As análises foram realizadas utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc teste de Tukey, considerando $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativo.



Fonte: Do autor, 2017.

Como pode ser observado na **figura 5** os animais do grupo controle ($p < 0,019$), do grupo 10 ng/ μL ($p < 0,001$), 200 ng/ μL ($p < 0,008$) e 300 ng/ μL ($p < 0,034$) de veneno diminuíram significativamente o número de cruzamentos quando comparado o treino e o teste, demonstrando aquisição de memória. Entretanto, os animais que receberam a dose de 100 ng/ μL ($p < 0,576$) não apresentaram diferença significativa no número de cruzamentos, durante o teste quando comparado o treino, demonstrando dano à memória de habituação.

Figura 5. Efeitos da administração do veneno escorpiônico da *Tityus serrulatus* sobre a memória de habituação dos animais ($n = 12$ por grupo). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. As análises foram realizadas utilizando o Teste *T Student* para amostras dependentes, considerando $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativo.



Fonte: Do autor, 2017.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração do veneno da *T. serrulatus* nas doses de 10 ng/ μ L, 100 ng/ μ L, 200 ng/ μ L ou 300 ng/ μ L de veneno não alterou as atividades locomotora e exploratória, e nem os comportamentos estereotípicos dos camundongos. Um estudo recente demonstrou que houve uma diminuição da atividade geral e da atividade locomotora de ratos após a administração do veneno da *T. obscurus* (SANTOS-DA-SILVA et al., 2017). Entretanto, essa diferença entre os estudos pode ser explicada pelo fato de que, além de serem venenos provenientes de espécies diferentes, houveram diferenças metodológicas entre os trabalhos. No estudo de Santos-da-Silva e colaboradores (2017) a avaliação da atividade locomotora foi 1h após a administração do veneno e o presente estudo avaliou esses efeitos 24h após a administração dessa substância. Além disso, as doses utilizadas no presente estudo foram de 10 ng/ μ L, 100 ng/ μ L, 200 ng/ μ L e 300 ng/ μ L do veneno da *T. serrulatus* administradas intracerebroventricularmente em camundongos e no estudo prévio (SANTOS-DA-SILVA et al., 2017) foram utilizadas as doses 0,5 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg ou 15 mg/kg do veneno da *T. obscurus* administradas em ratos intraperitonealmente pode afetar outros órgãos que não o SNC. O presente estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos do veneno da *T. serrulatus* 24 horas após a administração, com o intuito de verificar efeitos a longo prazo.

Lourenço e colaboradores (2002) demonstraram que 2 minutos após a administração intravenosa de algumas frações do veneno da *T. bahiensis* também diminuíram as atividades locomotora e exploratória dos animais. Em relação aos comportamentos estereotípicos, um estudo prévio demonstrou que a administração intrahipocampal de Ts2, uma toxina isolada do veneno da *T. serrulatus*, induziu vários tipos de comportamentos estereotípicos relacionados a convulsões em ratos, como: movimentos de maxilar intensos, movimentos de maxilar mastigatório, movimentos orofaciais repetidos e limpeza intensa das vibrissas (SANDOVAL; LEBRUN, 2003). Juntos esses estudos mostraram que, ao contrário do presente estudo, o veneno do escorpião do gênero *Tityus*, na maioria das vezes, induz alterações comportamentais, tanto relacionados aos movimentos livres, quanto aos comportamentos estereotípicos.

De acordo com a literatura, a excessiva liberação de neurotransmissores causada pelas neurotoxinas do veneno do escorpião do gênero *Tityus* é capaz de alterar a função neuronal (CARVALHO et al., 1998; NENCIONI; LEBRUN; DORCE, 2003; NENCIONI et al, 2009; OSSANAI et al., 2012, 2013), o que, consequentemente, pode levar a disfunção

comportamental. Além disso, o veneno desse gênero é capaz de agir sobre os canais para Nav e Kv. Esses canais são responsáveis por várias funções essenciais no SNC, como: controlar o potencial de ação, regular a atividade neuronal, modular secreção hormonal e liberação de neurotransmissores. Qualquer interferência sobre esses canais pode afetar o funcionamento normal do cérebro e levar a alterações comportamentais (BATISTA et al., 2000, 2002a, 2002b, 2004; MURGIA et al., 2004). No presente estudo as doses avaliadas do veneno da *T. serrulatus* não foram capazes de alterar a locomoção, exploração e comportamentos estereotípicos dos animais; portanto, mais estudos, utilizando outras doses, tempos e vias de administração são necessários para melhor caracterizar os efeitos dessa substância sobre o comportamento dos animais.

O presente estudo demonstrou que a administração ICV do veneno da *T. serrulatus* não induziu comportamentos do tipo ansiosos nos animais, avaliados através do número de visitas ao centro do campo aberto, tempo de latência no primeiro quadrante e quantidade de bolo fecal. Um estudo prévio demonstrou que a administração do veneno da *T. serrulatus* no período pré-natal induziu ansiedade na prole adulta dessas ratas expostas ao veneno (DORCE et al., 2017). Martins e colaboradores (2016) submeteram ratos em diversas fases do período pós-natal à administração de veneno da *Tityus bahiensis*. Esse grupo de pesquisadores demonstrou que a administração desse veneno no dia 2 do período pós-natal induz comportamento do tipo ansioso na vida adulta de fêmeas e machos de ratos. Já os animais, tanto machos quanto fêmeas, expostos ao veneno no dia 16 do período pós-natal não apresentaram alterações nesse tipo de comportamento. A exposição ao veneno do escorpião do gênero *Tityus* no período intrauterino ou no período pós-natal parece alterar o neurodesenvolvimento e parece estar ligada a alterações no comportamento do tipo ansioso em ratos. O presente estudo foi o primeiro a avaliar o efeito dessa substância administrada na vida adulta. Tendo em vista as contradições sobre os efeitos dos venenos do gênero *Tityus* sobre a ansiedade, mais estudos com outras doses e outros tempos de avaliação após a administração do veneno da *T. serrulatus* precisam ser considerados.

Neste estudo foi demonstrado que a administração da dose de 100 ng/ μ L do veneno de *T. serrulatus* induziu dano à memória de habituação dos animais. Este foi o primeiro estudo que avaliou o efeito do veneno de escorpião do gênero *Tityus* sobre a memória de animais experimentais. Um estudo prévio demonstrou que a região parahipocampal e parte da formação hipocampal são as regiões com maior quantidade de sítios de correntes de sódio ressurgente, o que tem sido associada a neurônios que disparam potencial de ação em alta frequência

(CASTELLI; NIGRO; MAGISTRETTI, 2007). Juntas, essas regiões hipocampal e parahipocampal formam o chamado sistema de memória do lóbulo temporal medial, que é bem conhecido por desempenhar um papel crucial em vários aspectos da formação da memória, incluindo orientação espacial (EICHENBAUM, 2000; WITTER e WOUNTERLOOD, 2002). Como descrito anteriormente, o veneno do escorpião *T. serrulatus* age sobre canais para Nav e de Kv, o que pode alterar o funcionamento normal do SNC (BATISTA et al., 2000, 2002a, 2002b, 2004; MURGIA et al., 2004). Sugere-se que a ação do veneno sobre os canais para Nav e Kv em estruturas cerebrais específicas, como hipocampal e parahipocampal, pode estar induzindo dano nessas estruturas cerebrais e, conseqüentemente, induzindo dano cognitivo nos animais. Desta forma, a alteração na capacidade cognitiva após a injeção do veneno da *T. serrulatus* poderia ser justificada pela presença de sítios de correntes de sódio ressurgente, uma vez que, grande parte das neurotoxinas presentes no veneno tem potencial de alterar fluxo/influxo de sódio nas células do SNC.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que os efeitos neurotóxicos do veneno da *T. serrulatus*, apesar de não alterarem movimentos livres e comportamentos do tipo ansiosos nos camundongos, pode levar a um dano cognitivo. Entretanto, mais estudos, utilizando outras doses e outros tempos de administração dessa substância, são necessários para melhor caracterizar os efeitos do veneno da *T. serrulatus* sobre o comportamento e o SNC.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, E. R.; MENDES, T. M.; MAGALHAES, B. F.; SIQUEIRA, F. F.; DANTAS, A.E.; BARROCA, T. M.; HORTA, C. C.; KALAPOTHAKIS, E. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **Open Journal of Genetics**, v. 2, n. 4, p. 210-220, 2012.
- AMARAL, C. F.; DE REZENDE, N. A.; FREIRE-MAIA, L. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. **American Journal of Cardiology**, v. 71, n. 2, p. 242–245, 1993.
- AMITAI, Y. Clinical manifestations and management of scorpion envenomation. **Public Health Reviews**, v. 26, n. 3, p. 257–263, 1998.
- ARANTES, E. C.; RICCIOPPO NETO, F.; SAMPAIO, S.V.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1199, n. 1, p. 69–75, 1994.
- BAHLOUL, M.; CHAARI, A.; DAMMAK, H.; ALGIA, N. B.; BOUAZIZ, M. Nosocomial scorpion envenomation: an unusual mode of scorpion sting. **Clinical Toxicology**, v. 48, n. 9, p. 962, 2010
- BARBOSA, A. D.; MAGALHÃES, D. F.; SILVA, J. A.; SILVA, M. X.; CARDOSO, M. F.; MENESES, J. N.; CUNHA, M. DA C. Caracterização dos acidentes escorpíonicos em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2005 a 2009. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 9, p. 1785-1789, 2012.
- BATISTA, C. V. F.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; LUCAS, S.; POSSANI, L. D. Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K⁺ channels. **FEBS Letters**, v. 486, n. 2, p. 117-120, 2000.
- BATISTA, C. V. F.; ZAMUDIO, F. Z.; LUCAS, S.; FOX, J. W.; FRAU, A.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L. D. Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na (+)-channels. **Toxicon**, v. 40, n. 5, p. 557-562, 2002a.
- BATISTA, C. V. F.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C.; HAJDU, P.; PANYI, G.; GASPARGAR, R.; POSSANI, L. D. Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K(+)- channels with distinctly different affinities. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1601, n. 2, p. 123 -131, 2002b.
- BATISTA, C. V. F.; POZO, L. D.; ZAMUDIO, F. Z.; CONTRERAS, S.; BECERRIL, B.; WANKE, E.; POSSANI, L. D. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 803, n. 1, p. 55–66, 2004.
- BORDON, K. C. F.; COLOGNA, C. T.; ARANTES, E. C. Scorpion venom research around the world: *Tityus serrulatus*. In: GOPALAKRISHNAKONE, P., POSSANI, L. D.;

SCHWARTZ, E. F.; DE LA VEGA, R. C. R. (Ed.) **Scorpion Venoms**. Springer Netherlands, 2015, 575 p.

BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 142–158, 2007.

BRASIL. INSTITUTO BUTANTAN. **Soros**. 2017. Disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/producao/soros/Paginas/default.aspx>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/COORDENAÇÃO DE CONTROLE DE ZONÓSES E ANIMAIS PEÇONHENTOS. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância em saúde - zoonoses**. Série B. Brasília, Textos Básicos de Saúde, Cadernos de Atenção Básica, 2009a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de controle de Escorpiões**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2009b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SISTEMA ÚNICO DA SAÚDE. **Animais peçonhentos - Escorpiões**. 2016a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br>>. Acesso em: 12 ago. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SISTEMA ÚNICO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica / Dados**. 2016b. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br>> Acesso em: 25 out. 2016.

BUCARETCHI, F.; FERNANDES, L. C.; FERNANDES, C. B.; BRANCO, M. M.; PRADO, C. C.; VIEIRA, R. J.; DE CAPITANI, E. M.; HYSLOP, S. Clinical consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* scorpion stings in the region of Campinas, southeastern Brazil. **Toxicon**, v. 89, n. 1, p. 17-25, 2014.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L. R. M.; ARDENGHI, P.; PARATCHA, G.; LEVI DE STEIN, M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: Abolition by NMDA receptor blockade. **Molecular Brain Research**, v. 76, n. 1, p. 36–46, 2000.

CARVALHO, F. F.; NENCIONI, A. L. A.; LEBRUN, I.; SANDOVAL, M. R. L.; DORCE, V. A. C. Behavioral, electroencephalographic and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from *Tityus serrulatus* venom in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 60, n. 1, p. 7–14, 1998.

CASTELLI, L.; NIGRO, M. J.; MAGISTRETTI, J. Analysis of resurgent sodium-current expression in rat parahippocampal cortices and hippocampal formation. **Brain Research**, v. 1163, n. 1, p. 44-55, 2007.

- CERNI, F.A.; PUCCA, M. B.; PEIGNEUR, S.; CREMONEZ, C. M.; BORDON, K. C .F.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. C. Electrophysiological characterization of Ts6 and Ts7, K_p channel toxins isolated through an improved *Tityus serrulatus* venom purification procedure. **Toxins**, v. 6, n. 3, p. 892-913, 2014.
- CESTÉLE, S.; CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxins action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v. 82, n. 9, p. 883–892, 2000.
- CHIPPAUX, J. P. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 13, p. 1-17, 2015.
- CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 71-79, 2008.
- COLOGNA, C. T.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M.; ARANTES, E. C. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, n. 8, 920-932, 2009.
- COLOGNA, C. T.; PEIGNEUR, S.; ROSA, J. C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; VARANDA, W. A.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. C. Purification and characterization of Ts15, the first member of a new alpha-KTx subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 58, n. 1, p. 54-61, 2011.
- COLOGNA, C. T.; PEIGNEUR, S.; RUSTIGUEL, J. K.; NONATO, M. C.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. C. Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom. *The FEBS Journal*. v. 279, n. 8, 1495-1504, 2012.
- CUPO P. Clinical update on scorpion envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 642-649, 2015.
- CURI, R.; ARAÚJO-FILHO, J. P. Fisiologia Básica. In: BEIRÃO, P. S. L. **Canais iônicos e eletrogênese nas células excitáveis**. Guanabara Koogan. 2009. 857 p.
- DI, Z. Y.; YANG, Z. Z.; YIN, S.J.; CAO, Z. J.; LI, W. X. History of study, updated checklist, distribution and key of scorpions (Arachnida: Scorpiones) from China. **Zoological Research**, v. 35, n.1, p. 3-19, 2014.
- DORCE, A. L. C.; MARTINS, A. D. N.; DORCE, V. A. C.; NENCIONI, A. L. A. Perinatal effects of scorpion venoms: maternal and offspring development. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 31, p. 1-7, 2017.
- EICHENBAUM, H. A cortical–hippocampal system for declarative memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 41–50, 2000.
- FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. (Ed.). **Natural Toxins: Characterization, Pharmacology and Therapeutics**. Pergamon Press, 1989. p. 139–159.

GOMEZ, M. V.; DINIZ, C. R. Separation of toxic components from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 33, n. 3, p. 899–902, 1966.

GUIDINE, P. A.; CASH, D.; DRUMOND, L. E.; DE SOUZA E REZENDE G. H.; MASSENSINI, A. R.; WILLIAMS, S. C.; MORAES-SANTOS, T.; MORAES M. F.; MESQUITA, M. B. Brainstem structures are primarily affected in an experimental model of severe scorpion envenomation. **Toxicology Science**, v. 137, n. 1, p. 147–157, 2014.

GWEE, M. C. E.; NIRTHANAN, S.; KHOO, H. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R. M.; CHEAH, L. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 9, p. 795-801, 2002.

ISBISTER G. K.; BAWASKAR H. S. Scorpion envenomation. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 1, p. 457-463, 2014.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997.

JOVER, E.; MARTIN-MOUTOT, N.; COURAUD, F.; ROCHA, T. H. Scorpion toxin: specific binding to rat synaptosomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 85, n.1, p. 377–382, 1978.

LEGROS, C.; CEARD, B.; VACHER, H.; MARCHOT, P.; BOUGIS, P. E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. Expression of the standard scorpion alpha-toxin AaH II and AaH II mutants leading to the identification of some key bioactive elements. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1723, n. 1, p. 91-99, 2005.

LOURENÇO, G. A.; LEBRUN, I.; DORCE, V. A. Neurotoxic effects of fractions isolated from *Tityus bahiensis* scorpion venom (Perty, 1834). **Toxicon**, v. 40, n. 2, p. 149-157, 2002.

LOURENÇO W. R. Parthenogenesis in scorpions: some history – new data. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 19-44, 2008.

LUTZ, A.; MELLO, O. Cinco novos escorpiões brasileiros dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. **Folha Médica**, v. 3, n. 4, p. 1-8, 1922.

MARCUSSI, S.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. **Escorpiões: Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2011. p.140.

MARTINS, A. N.; NENCIONI, A. L.; DORCE, A. L, PAULO, M. E.; FRARE, E. O.; DORCE, V. A. Effect of maternal exposure to *Tityus bahiensis* scorpion venom during lactation on the offspring of rats. **Reproductive Toxicology**, v. 59, n. 1, p.147-158, 2016.

MOUHAT, S.; ANDREOTTI, N.; JOUIROU, B.; SABATIER, J. M. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 24, p. 2503-2518, 2008.

MURGIA, A. R.; BATISTA, C. V.; GIANFRANCO, P.; POSSANI, L. D. Amino acid sequence and function of a new α -toxin from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei*.

Toxicon, v. 43, n. 6, p. 737-740, 2004.

NENCIONI, A. L. A.; LEBRUN, I.; DORCE, V. A. C. A microdialysis study of glutamate concentration in the hippocampus of rats after TsTx toxin injection and blockade of toxin effects by glutamate receptor antagonists. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 74 n. 2, p. 455–63, 2003.

NENCIONI, A. L. A.; LOURENÇO, G. A.; LEBRUN, I.; FLORIO, J. C.; DORCE, V. A. Central effects of *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* scorpion venoms after intraperitoneal injection in rats. **Neuroscience Letters**, v. 463, n. 3, p. 234-238, 2009.

NISHIOKA, S. A.; SILVERIA, P. V.; PEREIRA, C. A. Scorpion sting on the penis. **The Journal of Urology**, v. 150, n. 5, p. 1501, 1993.

NOUIRA, S.; ELATROUS, S.; BESBES, L.; BOUKEF, R.; DEVAUX, C.; AUBREY, N.; ELAYEB, M.; ABROUG, F. Neurohormonal activation in severe scorpion envenomation: correlation with hemodynamics and circulating toxin. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 208, n. 2, p. 111-116, 2005.

NUNAN, E. A.; MORAES, M. F.; 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, n. 3, p. 319–325, 2003.

OSSANAI, L. T.; LOURENÇO, G. A.; NENCIONI, A. L.; LEBRUN, I.; YAMANOUYE, N.; DORCE, V. A. Effects of a toxin isolated from *Tityus bahiensis* scorpion venom on the hippocampus of rats. **Life Sciences**, v. 91, n. 7, p. 230-236, 2012.

OSSANAI, L.T.; LOURENÇO, G.A.; LEBRUN, I.; NENCIONI, A. L. A.; DORCE, V. A. C. Convulsive and neurodegenerative effects in rats of some isolated toxins from the *Tityus bahiensis* scorpion venom. **Journal of Toxins**, v. 2013 , n. 1, p.1-10, 2013

PEIGNEUR, S.; COLOGNA, C. T.; CREMONEZ, C. M.; MILLE, B. G.; PUCCA, M. B.; CUYPERS, E.; ARANTES, E. C., TYTGAT, J. A gamut of undiscovered electrophysiological effects produced by *Tityus serrulatus* toxin 1 on Na-type isoforms. **Neuropharmacology**, v. 95, n. 1, p. 269-277, 2015.

PRENDINI, L.; WHEELER, W. C. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. **Cladistics**, v. 21, n. 5, p. 446-494, 2005.

PUCCA, M. B.; CERNI, F. A.; PEIGNEUR, S.; ARANTES, E. C.; TYTGAT, J.; BARBOSA, J. E. Serrumab: a novel human single chain-fragment antibody with multiple scorpion toxin-neutralizing capacities. **Journal of Immunotoxicol**, v. 11, n. 2, p. 133-140, 2014.

PUCCA, M. B.; CERNI, F. A.; PEIGNEUR, S.; BORDON, K. C. F.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. C. Revealing the function and the structural model of Ts4: insights into the “nontoxic” toxin from *Tityus serrulatus* venom. **Toxins**, v. 7, n. 7, p. 2534-2550, 2015a.

PUCCA M. B.; OLIVEIRA F. N.; SCHWARTZ EF, ARANTES EC, LIRA-DA-SILVA, R. M. Scorpionism and dangerous species of Brazil. In: GOPALAKRISHNAKONE P. (Ed.). **Scorpion Venoms**. Springer Netherlands, 2015b. p. 299–324.

PUCCA, M. B.; PEIGNEUR, S.; COLOGNA, C. T.; CERNI, F. A.; ZOCCAL, K. F.; BORDON, K. C. F.; FACCIOLI, L. H.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. C. Electrophysiological characterization of the first *Tityus serrulatus* alpha-like toxin, Ts5: evidence of a proinflammatory toxin on macrophages. **Biochimie**, v. 115, n. 1, p. 8-16, 2015c.

PUCCA, M. B.; ZOCCAL, K. F.; RONCOLATO, E. C.; BERTOLINI, T. B.; CAMPOS, L. B.; COLOGNA, C.T.; FACCIOLI, L. H.; ARANTES, E. C.; BARBOSA, J. E. Serrumab: a human monoclonal antibody that counters the biochemical and immunological effects of *Tityus serrulatus* venom. **Journal of Immunotoxicol**, v. 9, n. 2, p. 173-183, 2012.

RECKZIEGEL, G. C.; PINTO JR., V. L. Scorpionism in Brazil in the years 2000 to 2012. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 46, p. 20-46, 2014.

RONCOLATO, E. C.; CAMPOS, L. B.; PESSENDA, G.; SILVA, L. C. E.; FURTADO, G. P.; BARBOSA, J. E. Phage display as a novel promising antivenom therapy: a review. **Toxicon**, v. 93, n. 1, p. 79-84, 2015.

SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; PRADO, W. A.; RICCIOPPO-NETO, F.; GIGLIO, J. R. Further characterization of toxins T1IV (TsTX-III) and T2IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 663-672.

SANDOVAL, M. R.; LEBRUN, I. TSII toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom: behavioral, electroencephalographic, and histopathologic studies. **Brain Research Bulletin**, v. 62, n. 2, p. 165-72, 2003.

SANTOS-DA-SILVA, A. P.; CANDIDO D. M.; NENCIONI A. L.; KIMURA, L. F.; PREZOTTO-NETO J. P.; BARBARO K. C.; CHALKIDIS H. M.; DORCE, V. A. Some pharmacological effects of *Tityus obscurus* venom in rats and mice. **Toxicon**, v. 126, n. 1, p. 51-58, 2017.

SAUCEDO, A. L.; FLORES-SOLIS, D.; DE LA VEGA, R. C. R.; RAMIREZ-CORDERO, B.; HERNANDEZ-LOPEZ, R.; CANO-SANCHEZ, P.; NAVARRO, R. N.; GARCIA-VALDES, J.; CORONAS-VALDERRAMA, F.; DE ROODT, A.; BRIEBA, L. G.; POSSANI, L. D.; DEL RIO-PORTILLA, F. New tricks of an old pattern structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 15, p. 12321-12330, 2012.

SHARMA P. P.; FERNÁNDEZ, R.; ESPOSITO, L. A.; GONZÁLEZ-SANTILLÁN, E.; MONOD, L. Phylogenomic resolution of scorpions reveals multilevel discordance with morphological phylogenetic signal. **Proceedings Biological Science**, v. 282, n. 1804, p. 2014-2953, 2015.

STOCKMAN, R. Introduction to Scorpion Biology and Ecology. In: GOPALAKRISHNAKONE, P.; POSSANI, L. D.; SCHWARTZ, E. F.; DE LA VEGA, R. C. (Eds.). **Scorpion Venoms**. Toxinology, 2015, p. 25–59.

STOCKMAN, R.; YTHIER, E. **Scorpions of the World**. França: N.A.P Editions, 2010. p. 572.

TAUBENFELD, S. M.; WIIG, K. A.; BEAR, M. F.; ALBERINI, C. M. A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. **Nature Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 309–310, 1999.

VASCONCELOS, F.; LANCHOTE, V. L.; BENDHACK, L. M.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E. C. Effects of voltage-gated Na_v channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. **Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 85-92, 2005.

WITTER, M. P.; WOUTERLOOD, F. L. The Parahippocampal Region: organization and Role in Cognitive Function. **Oxford University Press Price**, v. 127, n. 1, p. 1211–1212, 2002.

ANEXOS

ANEXO I – PARECER DO CEUA



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



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **11/07/2017**, substituindo obrigatoriamente o certificado emitido em **07/03/2017**.

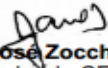
Título do projeto	AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO VENENO ESCORPIÔNICO DA <i>Tityus serrulatus</i> (Lutz e Mello, 1922) SOBRE A COGNIÇÃO E OS NÍVEIS DE NEUROTROFINAS EM CAMUNDONGOS
Project title	EVALUATION OF THE ADMINISTRATION OF THE SCORPIONIC VENOMS OF <i>Tityus serrulatus</i> (Lutz and Mello, 1922) ON COGNITION AND LEVELS OF NEUROTROPHINS IN MICE
Número do protocolo Protocol number	005/2017-1 - Adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	Samira da Silva Valvassori
Pesquisadores Researchers	Roger B. Varela, Wilson R. Resende, Daniela V. Bavaresco, Gustavo C. Dal-Pont, Bruna Peterlle, Fernanda Frederico Gava, Kerolen Trajano, Ricardo Andrez Machado de Ávila.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2017 a 01/03/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Balb/c
Nº de animais	170
Idade/Peso	30-40 dias / 18-22g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério UNESC

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

May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 11 de julho de 2017.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA


ANEXO II – CARTA ADENDO

Criciúma, 05 de julho de 2017

Carta adendo ao Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense

Eu, Samira da Silva Valvassori, CPF 060511009-38, pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, venho por meio deste pedir a alteração do projeto 005/2017-1. A alteração que se faz necessária é a troca de camundongos heterogênicos Black (C57BL/6) por camundongos Balb/C, pelo fato de que a reprodução do Black (C57BL/6) do Biotério da UNESC está muito baixa e não será suficiente para atender todos os pesquisadores. É importante salientar que todas as metodologias do projeto continuarão as mesmas, inclusive doses de substâncias - pelo fato de que ambas as espécies de camundongos possuem equivalência de peso e de comportamento. Entretanto, o projeto com as alterações e o projeto anterior foram anexados na plataforma para comparação.

Agradeço a atenção;


Samira da Silva Valvassori