

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

NATHALIA CORAL GALVANI

**DANOS AO DNA DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM VENENO DE *Tityus*
serrulatus Lutz & Mello, 1922**

CRICIÚMA, SC

2016

NATHALIA CORAL GALVANI

DANOS AO DNA DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM VENENO DE *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922

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

Orientadora: Prof^a Dr^a. Vanessa Moraes de Andrade

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila

**CRICIÚMA, SC
2016**

NATHALIA CORAL GALVANI

DANOS AO DNA DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM VENENO DE *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922

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

Criciúma, 22 de Junho de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Vanessa Moraes de Andrade – Doutora em Genética e Biologia Molecular -
UNESC - Orientadora

Prof.^a Paula Rohr – Doutora em Genética e Biologia Molecular - UNESC

Prof.^a Flávia Karine Rigo – Doutora em Farmacologia Bioquímica e Molecular -
UNESC

Dedico este trabalho aos meus pais Alair Galvani e Bernardete Coral Galvani, por inúmeras vezes abdicarem de seus sonhos, para realizarem os meus, a minha família e aos que considero parte dela, por toda força, amor e compreensão durante todo este período.

AGRADECIMENTOS

Agradeço á Deus antes de tudo, por ter me dado forças e coragem para que eu pode-se realizar aquilo que sonhei a cada dia, com todo amor, carinho e dedicação. Ao meu pai Alaor Galvani, que me mostrou a essência da vida com seu amor, e todos os valores que alguém pode ter, estando presente e me levantando a cada suspiro difícil. A minha maior e melhor professora, minha mãe Bernardete Coral Galvani, por me inspirar a cada dia em ser um exemplo de profissional, de dedicação, e amor em todos os simples gestos. Dedico a eles, por terem me dado a maior educação possível, e a base fundamental para que eu soubesse como alcançar tudo aquilo que desejo, pelo amor e fortaleza, que me fizeram firme durante todo este período, nos momentos mais difíceis, me incentivando a cada segundo, desistindo de seus planos e sonhos incontáveis vezes, para que me fortalecessem e me dessem o melhor. Agradeço a eles, pois sem eles não teria chego até aqui.

Agradeço também a toda minha família e aos que considero parte dela, por sempre torcerem por mim, pelo amor, carinho e pela compreensão nos momentos em que estive ausente.

Ao meu namorado por ter me incentivado e motivado a cada tropeço, compreendendo a cada ausência, com o seu carinho.

Agradeço a minha orientadora Vanessa Moraes de Andrade e ao meu co-orientador Ricardo Andrez Machado de Ávila, por todo conhecimento que me foi transmitido, pela ajuda e total sabedoria.

Com todo meu carinho, agradeço a querida Adri (Adriani Paganini Damiani), pelas incontáveis vezes que me socorreu, nas minhas preocupações e desesperos, me ajudando incessantemente a cada pedido meu, por ter passado todo seu conhecimento com paciência. E á todos do laboratório de Biologia celular e molecular – LABIM, em especial a Indiani e a Valeska, pelas opiniões, ajudas, noites no laboratório e as infinitas risadas em todas as tardes.

Aos meus colegas de curso e amigos que estiveram presente em toda essa trajetória, em especial as “bioloucas” Lu, Ni e Paula, que graças a nossa união, nos fortalecemos e chegamos ao fim desta etapa, que é a primeira de muitas.

E agradeço ainda, aos queridos mestres, doutores e professores, e todos aqueles que passaram seu conhecimento, e fizeram parte desta conquista.

“É inútil falar de curas ou pensar em remédio até termos considerado as causas [...] as curas podem ser imperfeitas e não servir para nada enquanto as causas não tiverem sido pesquisadas”.

**Robert Burton,
The Anatomy of Melancholy, 1893.**

RESUMO

Os escorpiões habitam a terra a mais de 400 milhões de anos por sua hábil capacidade de adaptação, tendo sofrido poucas alterações na sua morfologia, permitindo-os adaptarem-se nos mais diversos habitats terrestres. A presença desses aracnídeos tem sido considerada bastante preocupante, sendo a espécie *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922, uma das que vem se destacando no Brasil pelos graves acidentes ocasionados e sua vasta e preocupante sintomatologia. O presente trabalho visa demonstrar além da capacidade de sintomas diversos causados pelo veneno, também seu grau genotóxico em nível de DNA. Sendo assim, caracteriza-se como seu objetivo, avaliar os danos ao DNA de camundongos inoculados com veneno de *T. serrulatus*. Foram utilizados para o estudo genotóxico, 30 camundongos *Swiss* machos adultos (18-22g com 28-35 dias), divididos em cinco grupos, com seis animais cada, incluindo um grupo controle de 0h com a administração de tampão fosfato-salino (PBS). Nos diferentes grupos administrou-se em cada animal via intraperitoneal, 0,5DL₅₀ de veneno de *T. serrulatus*. Este foi inoculado em todos os grupos, exceto o de 0h, em mesmo período, sendo a eutanásia realizada por deslocamento cervical após horários diferentes: 1hr, 2hrs, 6hrs e 12hrs. Antes da eutanásia foi realizada a coleta de sangue por punção na veia caudal e depois então foram retiradas as estruturas córtex, estriado, hipocampo, fígado, pulmão, rim e coração. Para posterior análise das células através do ensaio cometa. Os resultados mostram que o veneno da espécie de escorpião *T. serrulatus* possui alta genotoxicidade, apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo 0h, levando a elevados danos em DNA em todas as estruturas analisadas neste estudo. Isso nos leva a concluir que o escorpião em questão, possui muito além de uma vasta sintomatologia, mas também é capaz de lesar o material genético da vítima, tendo ação já em suas primeiras horas após inoculação. Nossos resultados demonstram a importância de tal modelo de estudo na geração de novos conhecimentos e indicam que outros estudos com diferentes períodos de análise ou utilizando substâncias que possibilitem minimizar ou reverter os efeitos do veneno em nível de dano em DNA devem ser feitos.

Palavras-chave: DNA. Ensaio cometa. Genotoxicidade. *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922. Veneno.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Morfologia do Escorpião <i>T. serrulatus</i>	12
Figura 2 - Etapas experimentais do Ensaio Cometa, até a leitura em microscópio óptico.....	20
Figura 3 – Visualização dos danos no DNA através do microscópio óptico, obtidos pelo ensaio cometa.	22
Figura 4 - Frequência e índice de danos no DNA de células do coração de camundongos tratados com veneno de <i>T. serrulatus</i>	23
Figura 5 - Frequência e índice no DNA de células do pulmão de camundongos tratados com veneno de <i>T. serrulatus</i>	23
Figura 6 - Frequência e índice no DNA de células do rim de camundongos tratados com veneno de <i>T. serrulatus</i>	24
Figura 7 - Frequência e índice no DNA de células do sangue de camundongos tratados com veneno de <i>T. serrulatus</i>	25
Figura 8 - Frequência e índice no DNA de células do fígado de camundongos tratados com veneno de <i>T. serrulatus</i>	25
Figura 9 - Frequência e índice de danos no DNA de células do córtex em camundongos tratados com veneno de <i>T. serrulatus</i>	26
Figura 10 - Frequência e índice de danos no DNA de células do hipocampo de camundongos tratados com veneno de <i>T. serrulatus</i>	26
Figura 11 - Frequência e índice no DNA de células do estriado de camundongos tratados com veneno de <i>T. serrulatus</i>	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esquema dos grupos de animais que foram inoculados com o veneno de <i>T. serrulatus</i> para realização de ensaio cometa.....	18
Tabela 2 - Classes de Danos obtidas pelo Teste Cometa.	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	17
3.2 VENENO	17
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	18
3.4 ENSAIO COMETA	18
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4 RESULTADOS	22
4.1 DETERMINAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO VENENO DE <i>Tityus serrulatus</i> LUTZ & MELLO, 1922	22
5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
ANEXO	38
ANEXO – CERTIFICADO DO CEUA	39

1 INTRODUÇÃO

Nos reinos biológicos existentes, estão presentes na natureza algumas espécies de organismos com capacidade de produzir substâncias tóxicas, que quando em contato com outros seres vivos podem desencadear diversas reações, e até mesmo a morte. Tais substâncias são desenvolvidas como forma de autodefesa, ou até mesmo, para a caça de organismos utilizados para alimentação (FERREIRA JUNIOR, 2003).

De acordo com Wolff (2012), são frequentes as dúvidas em relação à diferença de animais peçonhentos e venenosos, que se diferenciam pela forma de inoculação de substâncias usadas como autodefesa. A principal forma de distinguir um animal “peçonhento” de um animal “venenoso” é a presença ou não do aparelho inoculador de veneno. Os peçonhentos são aqueles que produzem uma substância tóxica e possuem um aparelho inoculador especializado para inserir o veneno em outro indivíduo, através de glândulas que se comunicam com ferrões, agulhões ou até mesmo outras estruturas onde o veneno passará ativamente. Já os animais venenosos, produzem o veneno, porém sem presença da estrutura inoculadora, provocando assim, um envenenamento passivo por contato (LIMA, 2014).

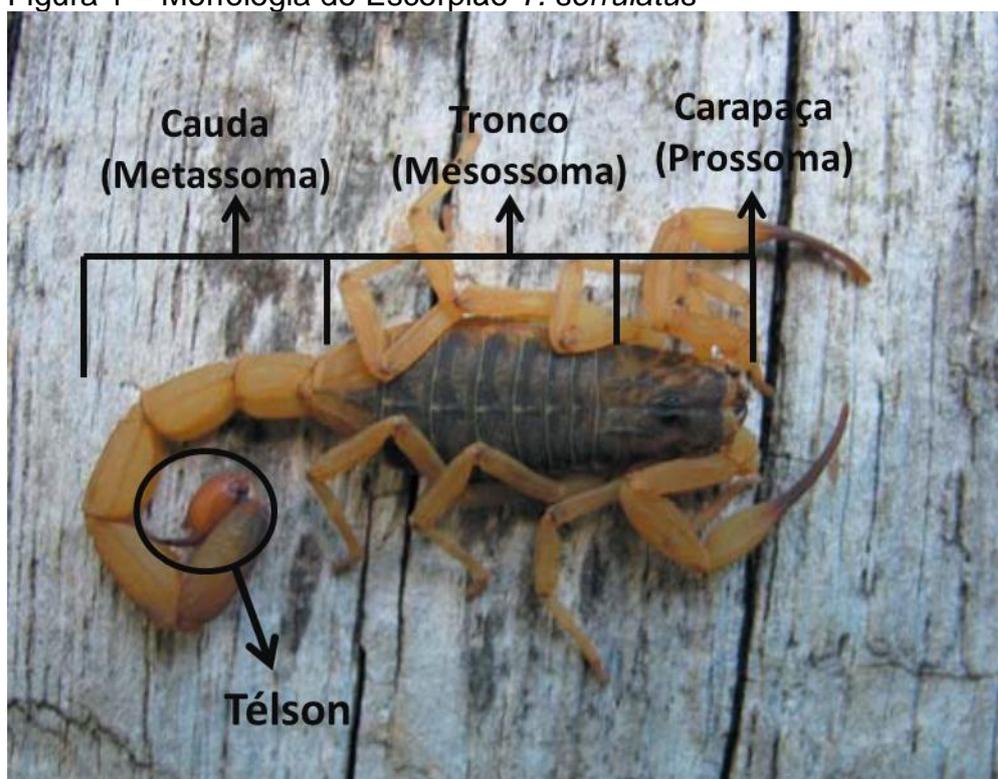
Segundo Brazil e Porto (2010), para os seres humanos, os aracnídeos são conhecidos como animais de grande importância médica, devido ao fato de transmitirem doenças e em alguns casos, pela capacidade de ação do veneno como algumas espécies de aranhas e escorpiões.

A presença desses aracnídeos tem sido considerada bastante preocupante, dentre as espécies existentes, o escorpião *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (figura 1), vem se destacando como principal causador de acidentes escorpiônicos no Brasil. Tal fato tem feito do escorpionismo um grande problema de saúde pública (LARA, 2012).

Os escorpiões são considerados um dos animais mais antigos encontrados na natureza. Devido a sua hábil capacidade de adaptação, este aracnídeo habita a terra há mais de 400 milhões de anos, tendo sofrido poucas alterações na sua morfologia, permitindo-os a adaptarem-se nos mais diversos habitats terrestres, como florestas tropicais, equatoriais e temperadas, savanas, cavernas e até mesmo montanhas (LOURENÇO, 2001).

T. serrulatus pode ser identificado por apresentar características físicas, como: presença de tronco escuro, pernas e cauda amarelas e falsa cauda serrilhada (Figura 1), sendo predominante nos estados de: Minas Gerais, Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e Goiás. Esta ampla distribuição se dá por sua reprodução partenogenética e fácil adaptação ao meio urbano (MARCUSSI et al., 2011).

Figura 1 – Morfologia do Escorpião *T. serrulatus*



Fonte: BRAZIL et al., 2009, com adaptações da autora, 2016.

Segundo Pazelli (2013), a imprudência do homem o fez responsável pelo desequilíbrio no meio ambiente, reduzindo dessa forma os habitats de muitos animais, e conseqüentemente os trazendo ao meio urbano, fato este que classifica muito dos peçonhentos, assim como os escorpiões, de seres sinantrópicos, ou seja, animais que habitam ambientes urbanos. Este fato levou a um grande problema relacionado ao risco de transmissão de diversas doenças, além de uma maior preocupação com a saúde pública, pelo fato de que os acidentes com estes animais estão aumentando. Esta espécie destaca-se como de maior preocupação, devido ao potencial de gravidade do envenenamento e pela expansão de sua distribuição geográfica no país (BRASIL, 2014a).

Nos últimos anos, o Ministério da Saúde do Brasil registrou um aumento de acidentes causados por picadas de escorpião, sendo considerado um problema de saúde pública (BRASIL, 2014b). A maior parte dos casos registrados no país é da espécie *T. serrulatus*, tornando-o principal agente etiológico entre os acidentes escorpiônicos no Brasil e, responsável por envenenamentos fatais, principalmente em crianças (SILVA, 2005).

Anualmente os números de acidentes ultrapassam a faixa de 1 milhão de casos no mundo, dos quais 50 a 75% requerem tratamento para evitar a morte, amputações ou sequelas permanentes (BRASIL, 2014b).

No ano de 2015, o Ministério da Saúde realizou uma estimativa onde observou que aproximadamente 74 mil pessoas sofreram acidentes por picadas de escorpiões em todo Brasil, demonstrando um aumento de 20% nos últimos quatro anos (BRASIL, 2016). Segundo os dados coletados pelas fichas de notificações do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no período entre 2000 a 2010 foram registrados 316 acidentes ocasionados por escorpiões, destes, cerca de 32 foram registrados na Região Serrana de Santa Catarina no período de um ano (QUADROS et al., 2014).

No entanto, a real incidência do escorpionismo ainda é desconhecida, uma vez que grande parte dos acidentados não procuram os centros de saúde especializados para atendimento, ou os casos não são identificados como causados por animais peçonhentos tendo apenas os sintomas tratados. Além disso, devido aos conhecimentos populares, muitos dos acidentados se automedicam com soluções caseiras produzidas a partir de extratos de plantas, como as do gênero *Ottonia* (ANTUNES et al., 2001; CUNICO et al., 2003; CUNICO, 2007), mesmo não existindo comprovação científica validando a efetiva neutralização do veneno (CUNICO, 2007).

O desenvolvimento de uma sintomatologia mais branda ou mais severa em um acidente escorpiônico, depende diretamente da quantidade de veneno inoculado e também de características da vítima, como sexo, status imunológico, contatos anteriores e idade, sendo que, crianças e idosos apresentam maior risco de virem a desenvolver um quadro clínico grave (SOARES et al., 2002; PADILLA et al., 2003; DUARTE, 2007).

As manifestações clínicas apresentadas por vítimas de escorpionismo são geralmente atribuídas à liberação de neurotransmissores, em especial, a acetilcolina

e noradrenalina das terminações nervosas pós-ganglionares, e adrenalina pela medula adrenal (ISMAIL, 1995; ARANTES et al., 2010).

No veneno escorpiônico, encontram-se como principais componentes tóxicos, proteínas e enzimas, as quais estão diretamente relacionadas com os hábitos alimentares e comportamentais de defesa do animal (FERREIRA JUNIOR, 2003). Este veneno é na verdade uma mistura complexa de proteínas básicas de baixo peso molecular, associadas a pequenas quantidades de aminoácidos e sais, sendo desprovido de atividade hemolítica, proteolítica, colinesterásica, fosfolipásica, além de não consumir fibrinogênio (FERREIRA JUNIOR; BARRAVIEIRA, 2002). Os venenos escorpiônicos são fontes de diferentes classes de peptídeos que representam ferramentas úteis para a pesquisa biológica.

A inoculação do veneno de escorpião em animais de laboratório produz efeitos sistêmicos com sinais e sintomas semelhantes aos observados no envenenamento humano, tais como febre, agitação psicomotora, salivação, lacrimejamento, aumento da mobilidade do trato gastrointestinal, arritmias cardíacas e respiratórias, hipertensão arterial seguida de hipotensão, falha cardíaca, edema pulmonar, choque (FREIRE-MAIA; CAMPOS, 1989; ARANTES et al., 2010) e alteração dos níveis de eletrólitos de plasma, começando com um decréscimo nos níveis de sódio, potássio e cálcio, provavelmente devido à perda excessiva de fluidos corporais causadas por salivação e lacrimejamento (ISMAI; ABD-ELSALAM, 1988, ANDRADE et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2004; ARANTES et al., 2010).

Devido aos múltiplos efeitos gerados pelo veneno, levantam-se dúvidas em relação à questão molecular, ressaltando-se a possibilidade de que além da vasta sintomatologia, o veneno e suas toxinas podem levar a danos a nível celular, afetando o conteúdo genético da vítima. A genotoxicidade da substância se manifesta em forma de doses sub-tóxicas. Como forma de avaliar os efeitos genotóxicos, utiliza-se o ensaio cometa um teste sensível, que analisa os danos presentes no DNA, caso não ocorra o reparo desses danos pelo sistema celular, poderá acarretar em mutações futuras que possivelmente serão responsáveis pelo desencadeamento de inúmeras doenças (RIBEIRO, 2010). Além da exposição a substâncias tóxicas, tais danos celulares podem ser gerados em nosso dia a dia de acordo com nossos hábitos e o ambiente em que estamos expostos.

É sabido que, com o passar do tempo cresce a produção de inúmeros produtos e diversas substâncias sintetizadas que são conseqüentemente liberadas

ao meio ambiente, onde se torna praticamente impossível não obter contato, evitando tal exposição (HOSHINA et al., 2013).

Diversos estudos já foram realizados com as toxinas do veneno da espécie de escorpião *T. serrulatus*, sendo *que* a maioria delas já foram sequenciadas e caracterizadas. Todavia, estudos de avaliação genotóxica em relação ao veneno, que possibilitem um maior conhecimento, além da sintomatologia por ele causada, mas também avaliando seus diversos danos, incluindo aqueles ocasionados a conteúdo genético da vítima, são ainda muito escassos. Dessa forma, este é o primeiro trabalho com avaliação da ação genotóxica do veneno desta espécie de escorpião em diferentes órgãos.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar danos ao DNA de camundongos inoculados com veneno de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a genotoxicidade causada pela inoculação do veneno de *T. serrulatus* nos diferentes órgãos, como: coração, pulmão, rim, sangue, fígado, córtex, hipocampo e estriado.
- Analisar a cinética do envenenamento nas horas de 1h, 2h, 6h e 12h de ação do veneno em camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os testes e procedimentos técnicos foram realizados conforme a literatura sugere, com total padronização. A realização dos métodos foi feita no Laboratório de Biologia Molecular – LABIM da UNESC pelos grupos de pesquisa de Genética toxicológica e Biotecnologia.

3.1 ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Foram utilizados 30 camundongos *Swiss* machos adultos (18-22g com 28-35 dias), provenientes do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). O peso dos animais seguiu conforme o que preconiza a Portaria nº 174, de 11 de novembro de 1996, do ministério da saúde. Os animais foram alojados em caixas de polietileno, com comida e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo de 12 horas claro-escuro (a luz é ligada às 7h da manhã), com temperatura controlada de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Este estudo foi aprovado e todos os procedimentos realizados passaram por aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UNESC) conforme o protocolo número 076/2015-1, que segue a 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foram posteriormente conduzidos de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 VENENO

O veneno de escorpião da espécie *T. serrulatus* foi cedido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), de Belo Horizonte – Brasil. As amostras foram constituídas de um pool de venenos coletados de escorpiões já adultos, da região sudeste do Brasil. Posterior à coleta, as amostras foram devidamente liofilizadas e mantidas em temperatura de 20°C para serem inoculadas nos camundongos no laboratório.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Para o estudo genotóxico do veneno os camundongos foram divididos em cinco grupos com seis animais cada. A administração do veneno foi via intraperitoneal, com 0,5 DL₅₀ de veneno, esta que foi definida com base em estudo previamente realizado por Domingos (2016), pelo Laboratório de Biologia Molecular – LABIM da UNESC pelos grupos de pesquisa de Genética toxicológica e Biotecnologia, que nos deram embasamento para seguir o estudo com mesma dose já determinada. O mesmo foi inoculado nos grupos ao mesmo tempo, porém cada grupo foi eutanasiado por deslocamento cervical em horários diferentes: após, 1hr, 2hrs, 6hrs e 12hrs, a definição dos horários de atuação do veneno foi embasada em outros estudos, onde é sabido que a maior ação e auge do veneno se dão em suas primeiras horas. Antes da eutanásia foi realizada a coleta de sangue por punção na veia caudal e após foram dissecadas as seguintes estruturas: córtex, estriado, hipocampo, fígado, pulmão, rim e coração.

Tabela 1 - Esquema dos grupos de animais que foram inoculados com o veneno de *T. serrulatus* para realização de ensaio cometa.

Tempo de morte após aplicação	Inoculação	Nº de animais
0h	PBS	6 camundongos
1h	0,5 DL ₅₀ de veneno	6 camundongos
2h	0,5 DL ₅₀ de veneno	6 camundongos
6h	0,5 DL ₅₀ de veneno	6 camundongos
12h	0,5 DL ₅₀ de veneno	6 camundongos

Fonte: Da autora, 2016.

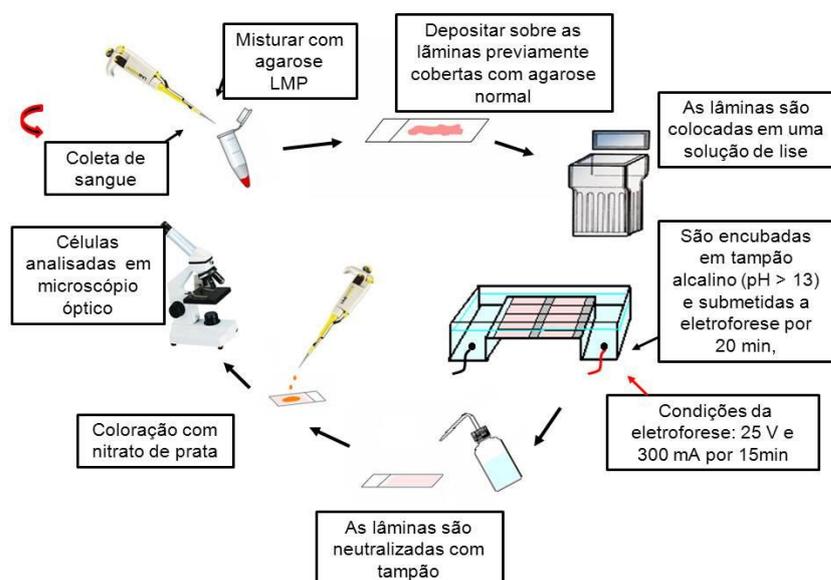
3.4 ENSAIO COMETA

Para a realização do ensaio cometa, foram utilizadas as seguintes estruturas biológicas: Córtex, estriado, hipocampo, fígado, pulmão, rim, sangue e coração.

O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). O sangue foi coletado e colocado em micro tubos heparinizados e refrigerados, e as amostras de córtex, hipocampo, estriado, fígado, rim, pulmão e coração, foram dissecadas e imersas em tampão fosfato (PBS) refrigerado. Em seguida foram individualmente homogeneizadas com o auxílio de uma seringa, através do movimento de vai e vem, a fim de obter uma suspensão celular.

As células do sangue (alíquotas de 5 μ L) e as células obtidas da dissociação de tecidos (alíquotas de 25 μ L) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0,75%, w/v, 95 μ L ou 75 μ L, respectivamente) e a mistura adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 2 semanas. Após este período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300m MNaOH e 1m M EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com 10 mg/mL de solução de prata (Sigma Brasil, 1239-45-8) para posterior análise em microscópio com aumento de 400x. (Figura 2).

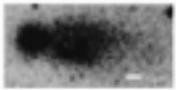
Figura 2 - Etapas experimentais do Ensaio Cometa, até a leitura em microscópio óptico.



Fonte: Damiani, 2010.

Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação para ausência de cauda, até 4 para o comprimento máximo de cauda (COLLINS et al., 1997). Desta forma, tem-se um Índice de Danos (ID) para cada animal variando de zero ($100 \times 0 = 0$; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 ($100 \times 4 = 400$; 100 células observadas com dano máximo). Calcula-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda. As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideram que o escore visual de cometas é um método de avaliação bem validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (COLLINS et al., 1997). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas. (Tabela 2).

Tabela 2 - Classes de Danos obtidas pelo Teste Cometa.

Danos observados no DNA	Cabeça (núcleo)/Cauda (Fragmento do DNA)	Classe dos Danos
	Sem cauda	0
	≤ 1	1
	1-2	2
	≥ 2	3
	Sem cabeça	4

Fonte: Villela et al., 2006.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

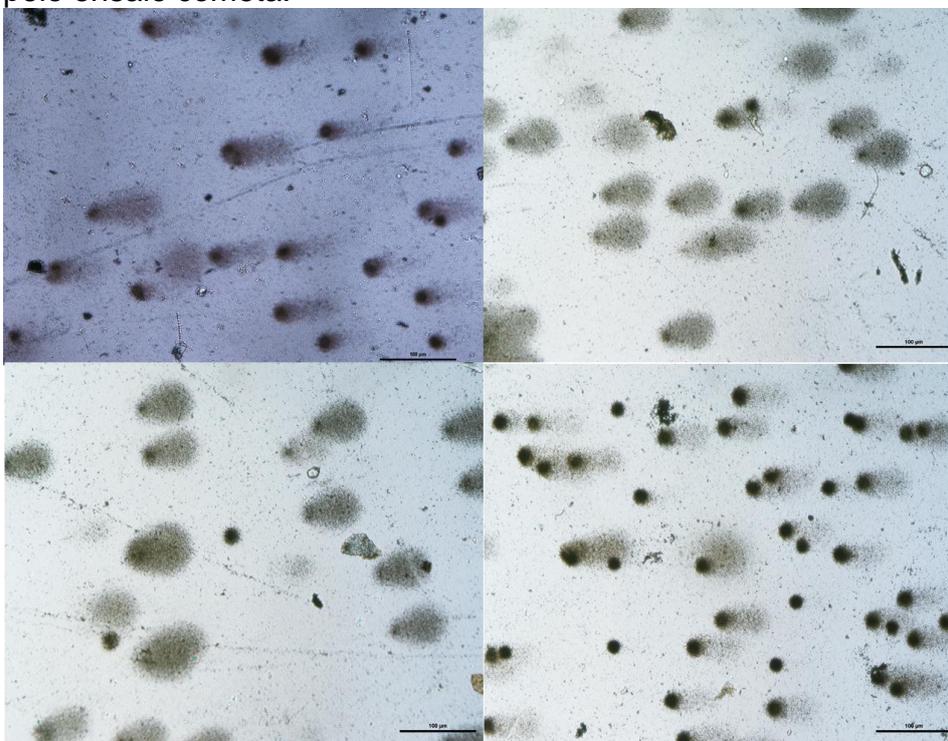
Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do post-hoc de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO VENENO DE *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922

Conforme as análises feitas neste estudo obtiveram-se resultados a partir da visualização de danos no DNA por meio de microscópio óptico, para que se fosse possível quantificar os dados avaliados (figura 3).

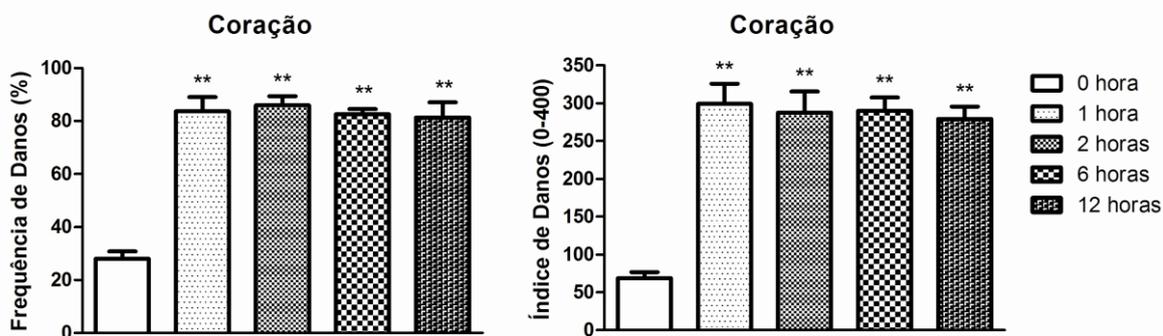
Figura 3 – Visualização dos danos no DNA através do microscópio óptico, obtidos pelo ensaio cometa.



Fonte: Da autora, 2016.

A figura 4 representa a frequência e índice de danos (FD e ID) no coração de camundongos *Swiss* machos adultos, ocasionados pelo veneno de *T. serrulatus*, administrado via intraperitoneal, e eutanasiados por deslocamento cervical em diferentes horas.

Figura 4 - Frequência e índice de danos no DNA de células do coração de camundongos tratados com veneno de *T. serrulatus*.

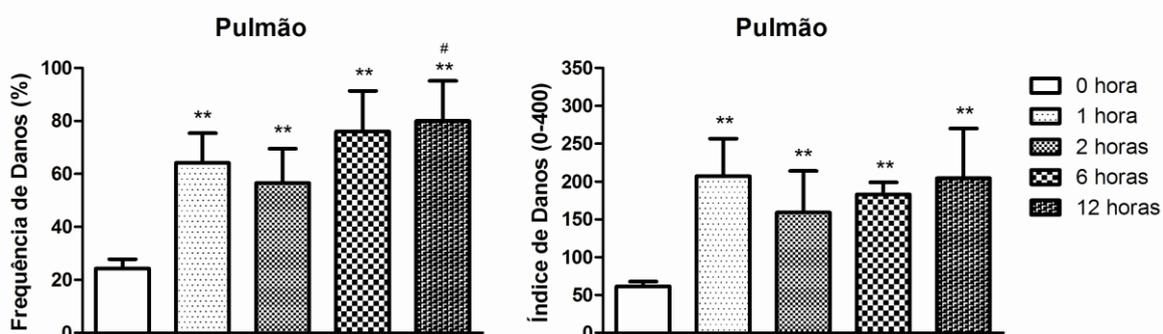


Dados expressos em média \pm desvio padrão. **Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,01$.

Foram observados danos significativos em células do coração de camundongos inoculados com veneno em relação ao grupo controle em todas as horas tanto em FD quanto em ID.

A figura 5 demonstra a avaliação de danos em DNA nas células do pulmão de camundongos inoculados com veneno de *T. serrulatus*, mostrando que houve diferença significativa em relação ao controle em ambos os parâmetros avaliados pelo ensaio cometa (FD e ID).

Figura 5 - Frequência e índice no DNA de células do pulmão de camundongos tratados com veneno de *T. serrulatus*.

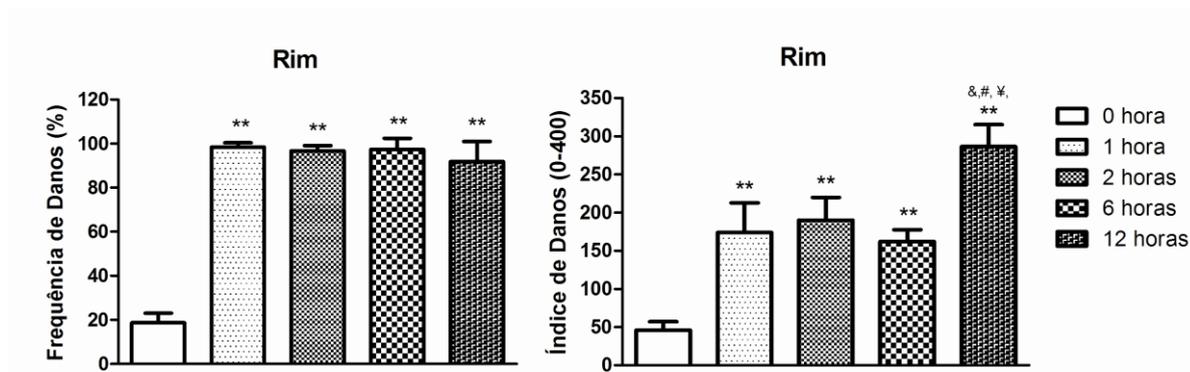


Dados expressos em média \pm desvio padrão. ** Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,01$; # Diferença significativa em relação ao grupo 2 horas, $p < 0,01$

Ressalta-se ainda que em 12 horas de exposição apenas na FD, foi observada diferença significativa em relação às 2 horas de exposição.

A figura 6 representa a avaliação dos danos no DNA em células renais de camundongos inoculados com veneno de *T. serrulatus*, demonstrando diferenças significativas quando comparados ao controle em todas as horas, tanto em FD quanto ID.

Figura 6 - Frequência e índice no DNA de células do rim de camundongos tratados com veneno de *T. serrulatus*.

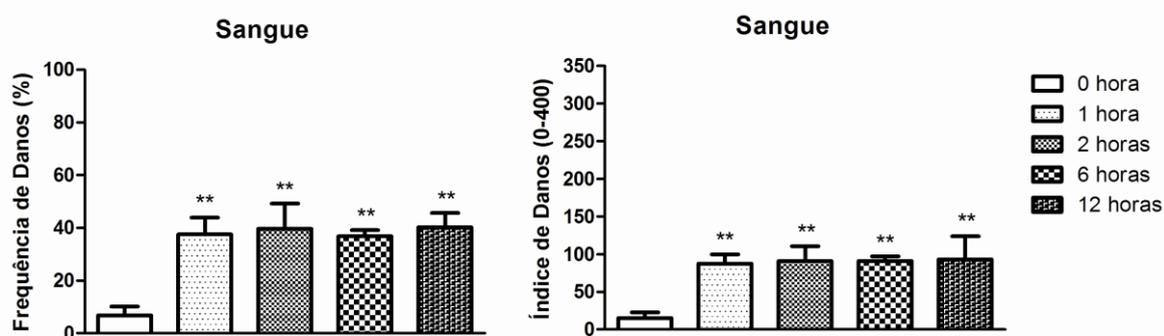


Dados expressos em média \pm desvio padrão. ** Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,01$; & Diferença significativa em relação ao grupo 1 hora, $p < 0,01$; # Diferença significativa em relação ao grupo 2 horas, $p < 0,01$; ¥ Diferença significativa em relação ao grupo 6 horas, $p < 0,01$.

No entanto, o ID apresentou maior incidência de danos na última hora, diferindo significativamente quando comparado ao grupo 1 hora, 2 horas e 6 horas. Demonstrando que quanto maior o tempo que o veneno fica no organismo aumenta significativamente os danos no tecido renal.

Em relação aos danos causados no DNA nas células sanguíneas de camundongos inoculados com veneno de *T. serrulatus* demonstrados na figura 7, observamos aumento significativo quando comparado ao controle.

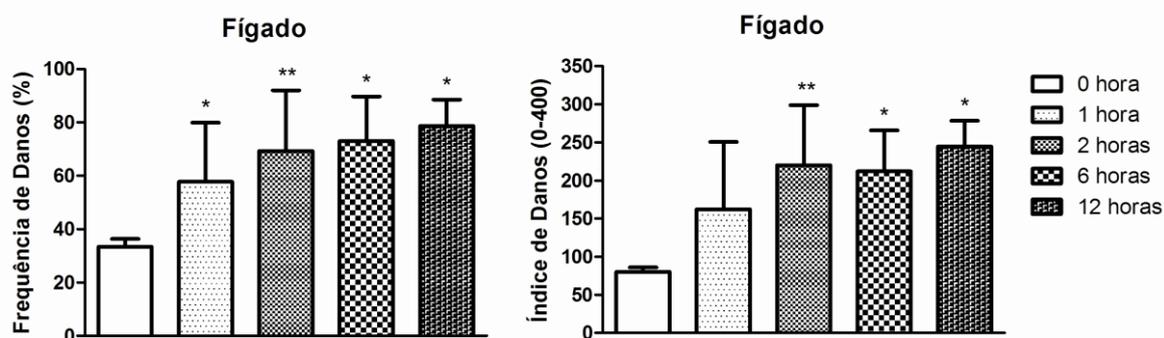
Figura 7 - Frequência e índice no DNA de células do sangue de camundongos tratados com veneno de *T. serrulatus*.



Dados expressos em média \pm desvio padrão. ** Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,01$.

A figura 8 demonstra a avaliação de danos ao DNA em células hepáticas de camundongos inoculados com veneno de *T. serrulatus*, em FD todos os grupos diferiram significativamente do grupo controle com ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). Neste parâmetro não foi observada diferença entre os tempos de ação do veneno. Ao analisarmos o ID, todos os grupos foram significativamente diferentes do grupo controle com $p < 0,05$ ou $p < 0,01$, com exceção do grupo 1 hora que não apresentou diferença significativa do grupo controle. Todavia quando se analisou a ação do veneno entre os diferentes períodos não foram encontradas diferenças significativas.

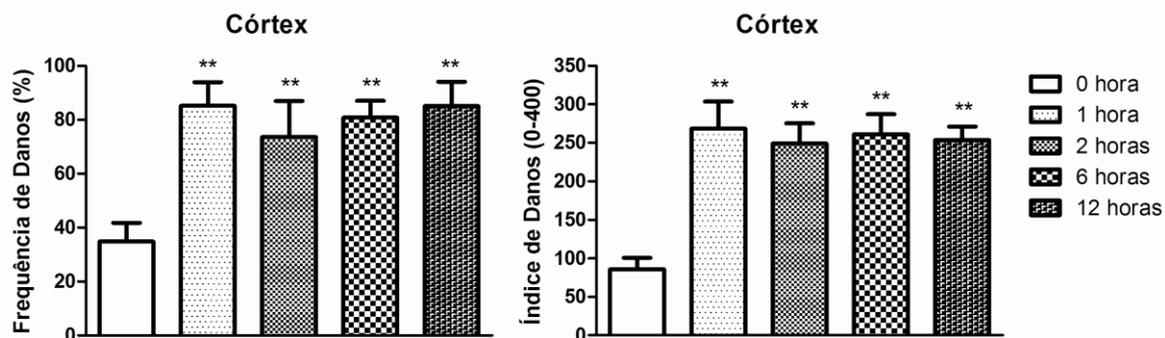
Figura 8 - Frequência e índice no DNA de células do fígado de camundongos tratados com veneno de *T. serrulatus*.



Dados expressos em média \pm desvio padrão. *Diferença significativa ao grupo controle, $p < 0,05$; **Diferença significativa ao grupo controle, $p < 0,01$.

Na avaliação de danos ao DNA causados no córtex de camundongos expostos ao veneno de *T. serrulatus*, na figura 9 observou-se diferença significativa em relação ao controle tanto em FD quanto em ID em todos os tempos analisados.

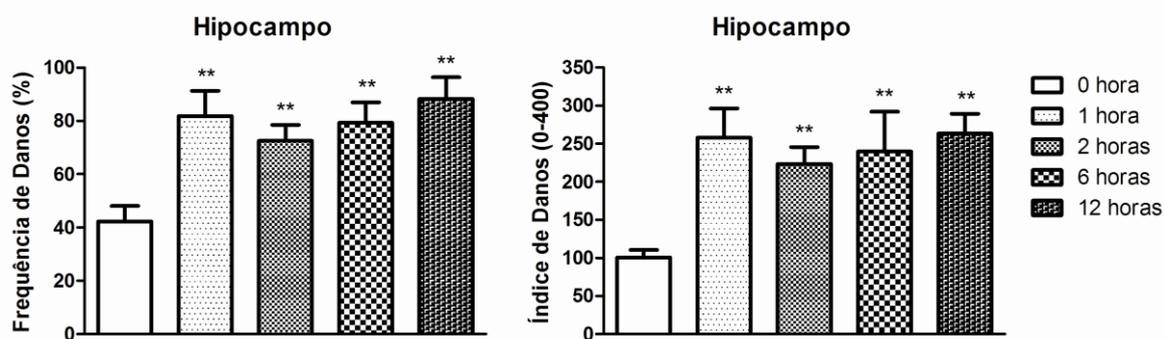
Figura 9 - Frequência e índice de danos no DNA de células do córtex em camundongos tratados com veneno de *T. serrulatus*.



Dados expressos em média \pm desvio padrão. ** Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,01$.

A figura 10 demonstra os danos no DNA em hipocampo de camundongos inoculados com o veneno de *T.serrulatus* onde se observa uma diferença significativa em relação ao controle, demonstrando-se efetivamente genotóxico neste tecido cerebral.

Figura 10 - Frequência e índice de danos no DNA de células do hipocampo de camundongos tratados com veneno de *T. serrulatus*.

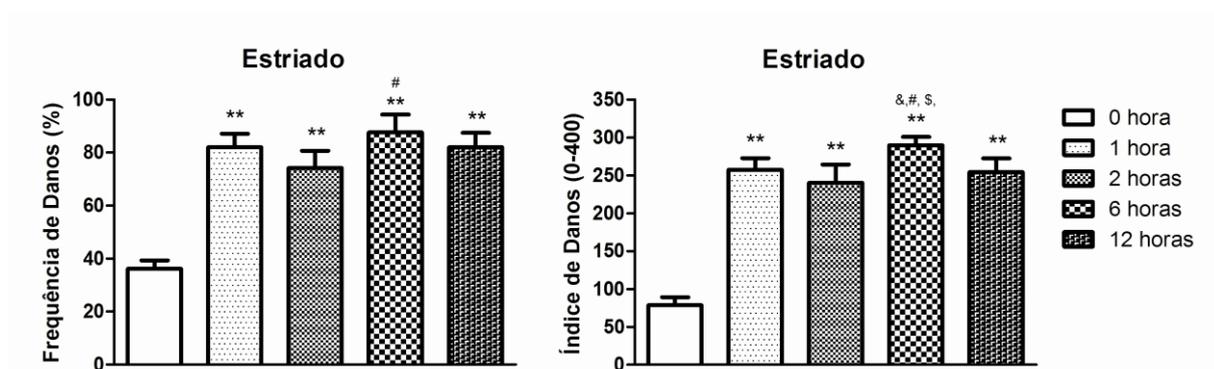


Dados expressos em média \pm desvio padrão. ** Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,01$.

Na figura 11 podemos observar os danos causados no DNA de células do estriado de camundongos inoculados com veneno de *T. serrulatus*. Em ambos os parâmetros do ensaio cometa (FD e ID) os resultados apresentaram danos significativos em relação ao grupo controle em todas as horas, demonstrando alta genotoxicidade do veneno nas células do estriado. Além disso, na FD houve aumento

significativo de danos no grupo de 6 horas quando comparado ao grupo de 2 horas e em relação ao ID, o grupo de 6 horas apresentou maior quantidade de danos quando comparado ao grupo de 1, 2 e 12 horas após inoculação do veneno.

Figura 11 - Frequência e índice no DNA de células do estriado de camundongos tratados com veneno de *T. serrulatus*.



Dados expressos em média \pm desvio padrão. ** Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,01$; & Diferença significativa em relação ao grupo 1 hora, $p < 0,01$; # Diferença significativa em relação ao grupo 2 horas, $p < 0,01$; \$ Diferença significativa em relação ao grupo 12 horas, $p < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

Os acidentes por animais peçonhentos vêm crescendo cada vez mais e ganhando destaque no Brasil, onde se tem demonstrado valores alarmantes quanto à incidência de casos de envenenamento, principalmente por escorpiões da espécie *T. serrulatus* (BRASIL, 2016). Isto pode ser devido ao fato, desta ser uma das espécies de escorpiões mais encontradas no Brasil e arredores e ser de grande importância médica, uma vez que seu veneno é composto por substâncias tais como sais orgânicos e inorgânicos, enzimas, proteínas de alto peso molecular e neurotoxinas, que apresentam ação farmacológica sobre o envenenamento, além dos efeitos adversos ocasionados pelo veneno (PUCCA et al., 2015). Ainda de acordo com Pucca et al. (2015), as toxinas do veneno de *T. serrulatus* proporcionam uma alta liberação de neurotransmissores com potencial que afetam direta ou indiretamente, inúmeros sistemas do corpo, tais como nervoso, imunológico, distúrbios cardíacos, edema pulmonar, disfunções digestivas além de distúrbios renais, como diminuição do fluxo urinário.

Vários estudos como o citado anteriormente relatam os possíveis efeitos e consequências do envenenamento do escorpião *T. serrulatus* e também outras espécies de preocupação a saúde pública. No entanto, trabalhos que buscam verificar o grau do dano gerado pelo veneno ao nível de DNA em diferentes órgãos são escassos, fazendo deste estudo o primeiro trabalho a avaliar efeitos genotóxicos ocasionados pelo veneno da espécie de escorpião *T. serrulatus*. Sendo assim, a aplicação da técnica do ensaio cometa para avaliação genotóxica, se justifica pela sua ampla utilização na detecção de efeitos genotóxicos de substâncias, podendo ser aplicada para a detecção de quebras de fita simples e dupla, sítio álcali-lábeis e ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína (SINGH, 1988; FAIRBAIRN et al., 1995).

Pelo fato de sua alta toxicidade, o veneno de *T. serrulatus*, quando inoculado no homem ou mesmo em camundongos, leva a diversos quadros clínicos. De forma que o agravamento dos sintomas varia conforme a quantidade inoculada e o tempo de ação permanente no indivíduo, assim como qualquer substância, as diferenças estarão na dose administrada (DUARTE, 2007).

Um estudo realizado em camundongos com a aplicação do veneno de *T. serrulatus* por Revelo et al., (1996), mostrou que os sintomas são mais evidentes nas primeiras 2 horas, apresentando grande dificuldade respiratória, irritabilidade e transpiração nos animais, e ainda uma maior quantidade de óbitos com um total de 6 animais nas primeiras 1 e 2 horas após injeção. Em relação aos termos proteicos o veneno de *T. serrulatus* não se encontra presente nos órgãos após no máximo 2 horas, deixando apenas as sequelas ocasionadas pela sua sintomatologia e ação das toxinas. Estes achados corroboram com os nossos, uma vez que mesmo 12 horas posteriores à injeção ainda foram detectados danos no DNA, o que nos leva a pensar na necessidade de testes em um período mais longo de tempo, acerca de até 72 horas como um período necessário para possíveis reparações e onde constataria se tal cinética diminuiria.

O envenenamento por escorpiões caracteriza-se como um dos principais responsáveis pela maior taxa de mortalidade devido à insuficiência cardíaca e o edema pulmonar (DUARTE, 2007). Esses dados assemelham-se aos nossos resultados, pois nas células de coração e pulmão de camundongos, observamos altos níveis de FD e ID, demonstrando alta genotoxicidade nessas estruturas.

Em estudo realizado por Cupo (2002), avaliaram-se crianças de 2 a 9 anos de idade com sinais de acidente escorpiônico. Nestes pacientes, foram observadas manifestações de disfunções cardíacas através de eletrocardiograma, onde também apresentaram alterações na ecocardiografia, indicando lesão no miocárdio agudo. Além disso, das oito crianças estudadas, cinco delas desenvolveram edema pulmonar.

Estudos demonstram que o veneno possui capacidade de induzir a migração de células inflamatórias para regiões pulmonares, além de causar hemorragias alveolares e edema, com um avanço rápido de até duas horas (LARA, 2012). Em nosso presente trabalho, as células do pulmão foram danificadas em nível de DNA em todos os períodos e com um destaque nas últimas horas, o que pode ser justificado pelo fato de o edema ser ocasionado com o agravamento das toxinas no organismo. Estudos ainda ressaltam e evidenciam que uma das vias de eliminação da toxina é a via respiratória, fazendo do pulmão um dos maiores alvos dos distúrbios do envenenamento (ISMAIL, 1995).

Quanto às células renais dos animais avaliados neste estudo, mostrou-se um padrão de alta FD no DNA durante todas as horas avaliadas. Já no parâmetro de

ID, observamos um valor elevado na última hora de exposição, mostrando ação ainda mais forte do veneno após 12h de inoculação no organismo. Outros estudos realizados na espécie *Tityus discrepans* Karsch, 1879, corroboram com os resultados acima descritos, em que rins de ratos envenenados desenvolveram distensão tubular e necrose das células, além de congestão glomerular, trombose e hemorragia intertubular (RODRÍGUEZ, 2013). Os danos observados nesta estrutura podem ainda ser justificados pelo fato de que a via renal é também uma das principais vias de excreção do veneno (ISMAIL, 1995).

Já nas células sanguíneas observamos visualmente baixos danos no DNA quando comparado às outras estruturas, no entanto, mantendo-se elevados em relação há 0 hora durante todas as horas de ação do veneno testadas, assim como nas estruturas. Pelo fato de não haverem outros estudos sobre a genotoxicidade do veneno do escorpião *T. serrulatus* se torna difícil fazer comparações com o nosso trabalho. No entanto, outros estudos que avaliaram alterações em células sanguíneas tiveram resultados mais agravantes sobre as mesmas. Como mostrado nos estudos realizados por Guimarães (2001), onde foi administrado o veneno de *Tityus fasciolatus* Pessa, 1935, em camundongos e através de exames hematológicos foi observado policetemia relativa e leucocitose com linfocitose, além de um aumento da concentração de hemoglobina e do volume globular após um período de oito horas posterior a inoculação do veneno. Ainda no mesmo estudo foram feitas comparações com a espécie *T. serrulatus* e ambos se assemelharam nos resultados. Tarasiuk e Sofer (1999) relatam ainda, que aumentos na hemoglobina, volume globular e aumento de eritrócitos, podem ser justificados pela dor causada pela inoculação do veneno e o estresse que foi ocasionado.

Ainda através de outros estudos experimentais, é possível comprovar que o veneno de escorpião apresenta uma rápida distribuição do sangue para os tecidos (ISMAIL; ABD-ELSALAM, 1988). Fazendo-nos explicar a FD e ID menor nas células de sangue, que são devido à velocidade de distribuição, fazendo com que não ocorram maiores concentrações, como nas demais estruturas.

Às células hepáticas apresentadas neste estudo, assim como as outras estruturas, também apresentaram danos ao DNA, porém com ID menores principalmente na primeira hora. Esta questão pode ser justificada pelo motivo do veneno chegar rapidamente ao fígado e sendo metabolizado na mesma velocidade (REVELO et al.,1996). Ainda conforme Revelo et al. (1996), em níveis proteicos,

observaram que o veneno quando injetado em camundongos, se manteve no fígado somente entre os primeiros 15 á 30 minutos após aplicação, não sendo detectado após 1 hora.

De acordo com os dados apresentados nas estruturas cerebrais (córtex, hipocampo e estriado) em nosso estudo observamos a ação do veneno como altamente genotóxica. Corroborando com Rodriguez (2012), onde observaram que as modificações nas concentrações cerebrais de neurotransmissores deve-se a algumas das toxinas do veneno possuírem capacidade de alterar o comportamento e ainda levar a alterações eletrográficas em ratos, além de influenciar em diversas vias inflamatórias, que levam a convulsões. As citocinas são um dos componentes do veneno, que exercem respostas inflamatórias em diversos processos tanto no sistema nervoso central como no periférico, e no sistema neural, estando envolvidas nessas inúmeras alterações (SCHAFERS; SORKIN, 2008). Ainda no estudo de Schafers e Sorkin (2008), eles afirmam que essas citocinas envolvidas em vias inflamatórias atuam nos canais iônicos e conseqüentemente contribuem com alterações na excitabilidade neuronal. Apesar destes estudos, há na literatura trabalhos que indicam que as toxinas do veneno de *T. serrulatus* não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) (OLIVEIRA, 2011). Outros autores já trazem que a resposta inflamatória está envolvida no mecanismo fisiopatológico do escorpionismo, levando a favorecer manifestações sistêmicas (ISMAIL, 1995).

Quanto á níveis proteicos a eliminação do veneno nos órgãos se dá após 2 horas, tal fato pode ser explicado também pela efetiva ação do sistema de reparo das células no organismo. Os achados de Purschke et al. (2002), corroboram com esta ideia, onde por meio de testes de viabilidade, testes mutagênicos e o ensaio cometa *in vitro*, analisaram células de fibroblastos humanos que foram induzidas a danos no DNA por peróxido de hidrogênio, onde a reparação total dos danos por H₂O₂ se deu após 6 horas. Mostrando assim uma alta capacidade de reparo no sistema celular dentro de 24 horas.

São inúmeras as vias de atuação do veneno de *T. serrulatus* e também são vastos os trabalhos que descrevem as ações, efeitos e principalmente quanto às toxinas presentes neste preocupante veneno e em outros do mesmo gênero, sabe-se ainda que boa parte destas toxinas já foram descritas e continuam sendo estudadas. O que nos leva a ressaltar que este é o primeiro trabalho em que se estudou a ação genotóxica do veneno de *T. serrulatus*. Os resultados aqui descritos

reforçam a importância de tal modelo de estudo na geração de novos conhecimentos e até mesmo de outros estudos e produtos farmacêuticos, que possibilitem minimizar ou ainda reverter os efeitos e sintomas pelo veneno da espécie de escorpião *T. serrulatus* ocasionados á vitima.

6 CONCLUSÃO

Os dados por fim obtidos neste trabalho, demonstram a efetiva ação do veneno já nas suas primeiras horas e permanecendo por até 12 horas após a inoculação em camundongos. Isto nos leva a afirmar que o veneno do escorpião *T. serrulatus*, além de sua vasta sintomatologia por ele desenvolvida, também levou a danos severos em níveis de DNA tanto em FD quanto em ID, parâmetros avaliados pelo ensaio cometa, em todas as estruturas analisadas (coração, pulmão, rim, sangue, fígado, córtex, hipocampo e estriado).

É de fundamental importância à realização de outros estudos adicionais, que possibilitem ampliar ainda mais a visão da forma de ação do veneno de *T. serrulatus*, ou ainda trabalhos que avaliem em um período maior de tempo os efetivos danos ao DNA ocasionados pelo veneno e suas toxinas nele presentes.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M.V.; et al. Lung compliance, plasma electrolytes levels and acid–base balance are affected by scorpion envenomation in anesthetized rats under mechanical ventilation. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. Endocrinol.** v. 138, p.97– 104, 2004.
- ANTUNES, P. A; CHIERICEB, G. O; CONSTANTINO, C. J. L; AROCA, R. F. Spectroscopic characterization of Nisobutyl-6-(p-methoxyphenyl) 2E-4E-hexadieneamide extracted from *Ottonia propinqua* Vibrational Spectroscopy, **Budapeste.** v. 27, n.2, p.75-181, 2001.
- ARANTES, E.C.; et al. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon.** v. 56, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde Brasil.** 2014. Disponível em:<<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/animais/bases/animaisbrnetdef>> Acesso em 13 de Jul.de 2015b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Incidência de acidentes por animais peçonhentos. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2015.** 2016. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/614-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/l1-acidentes-por-animais-peconhentos/13931-situacao-epidemiologica-peconhentos>>. Acesso em 26 de Jan. de 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Descrição do agravo.** 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1019-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos-escorpioes/l2-animais-peconhentos-escorpioes/13693-descricao-da-doenca>>. Acesso em 11 de Mar. de 2015a.
- BRASIL. *Portaria nº 174*, de 11 de novembro de 1996. Aprova as normas técnicas de produção e controle de qualidade dos soros antiofídicos, antitóxicos e antirábicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 nov. 1996.
- BRAZIL, T. K. PORTO, T. J. **Os escorpiões.** Salvador: EDUFBA, 2010. 15 p.
- BRAZIL, TANI K. et al. Escorpiões de importância médica do estado da Bahia, Brasil. **Gazeta Médica da Bahia.** V. 79, p.38-42, 2009.
- COLLINS, A; DUSINSKA, M; et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environ Mol Mutagen.** v. 30, p. 139-146,1997.
- CUNICO, M. M. **Ottonia martiana miq piperaceae: um estudo fitoquímico com enfoque multidisciplinar.** 2007. Tese de doutorado. Universidade Federal Do Paraná, Curitiba/PR.

CUNICO, M.M; et al. Estudo da atividade antifúngica de *ottonia martiana* miq, piperaceae: um teste in vivo. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v. 4, n.2, p. 77-82, 2003.

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

DAMIANI, ADRIANI PAGANINI. **Metais pesados e danos no DNA de células sanguíneas de morcegos insetívoros em áreas de mineração de carvão da Bacia Carbonífera Catarinense**. 61 f. Trabalho de Conclusão de curso. Área de concentração: Genética Toxicológica Ambiental. UNESC – Criciúma – SC, 2010.

DOMINGOS, ANGELINO CHITOMA. **Caracterização imunoquímica e genotóxica do veneno do escorpião *Tityus serrulatus***. 2016.89 f. Dissertação (Mestrado). Área de concentração: Ciências da saúde – UNESC – Criciúma–SC.

DUARTE, C. G. **Identificação, síntese e caracterização de um epitopo descontínuo da TsNTxP: uma anatoxina natural do veneno do escorpião *Tityus serrulatus***. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado). Área de concentração: Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FAIRBAIRN, D.W; OLIVE, P.L; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Res. Mutat**. V. 339. n.1. p. 37-59, 1995.

FERREIRA JUNIOR, Rui Seabra. **Avaliação da resposta humoral e da capacidade de neutralização do soro de camundongos Swiss inoculados com venenos nativos e irradiado com cobalto-60 de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni***. 2003. 125 f. Dissertação (Mestrado). Área de concentração: Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista – UNESP.

FERREIRA JUNIOR, Rui Seabra; BARRAVIERA, Benedito. **Artrópodes: de importância médica**. Rio de Janeiro: EPUB, 2002. 50 p.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: Ownby, G.V., Odell, C.L. (Eds.), *Natural Toxins: Characterization, Pharmacology and Therapeutics*. **Pergamon Press, Oxford**. p. 139–159, 1989.

GUIMARÃES, P, T, C; PINTO, M.C.L; MELO, M. M. Perfis clínico e hematológico de camundongos submetidos ao envenenamento escorpiônico experimental por *Tityus fasciolatus*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.6, p.1382-1390, 2001.

HOSHINA, Márcia M.; SANTOS, Lucilene D.; PALMA, Mario S.; MARIN-MORALES, Maria A. Cytotoxic, genotoxic/antigenotoxic and mutagenic/antimutagenic effects of the venom of the wasp *Polybia paulista*. **Toxicon**. v. 72. P. 64-70. 2013.

ISMAIL M; ABD-ELSALAM. A. Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration? **Toxicon**.v.26, n.3, p. 233-266. 1988.

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

LARA, P. G. **Efeito do veneno de *Tityus serrulatus* em camundongos selecionados geneticamente para máxima ou mínima resposta inflamatória**. 2012. 33 f. Dissertação (Mestrado). Área de concentração: Imunologia – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIMA, P. C. **Isolamento e caracterização estrutural e funcional de uma nova toxina da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***. 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado). Área de concentração: Toxicologia – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

LOURENÇO W.R. The scorpion families and their geographical distribution. **Venom Anim Toxins**. Botucatu, v. 7, n.1, p. 7, 2001.

MARCUSSI, S. et al. **Escorpiões: Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas**. FUNPEC, São Paulo, v.1, n.1, p. 3-119, 2011.

OLIVEIRA F.N. **Toxicidade da peçonha de *Tityus serrulatus* procedente do distrito federal por meio da avaliação da DL50, efeitos da peçonha e edema pulmonar induzido**. [Dissertação Mestrado]. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Brasília; 2011.

PADILLA, A.; GOVEZENSKY, T.; POSSANI, LD.; LARRALDE, C. Experimental envenoming of mice with venom from 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.

PAZELLI, PEDRO EUGÊNIO GOMES. **Animais sinantrópicos**. Rio de Janeiro: Interciência – 1º Ed., 2013. p.107.

PUCCA, M. B; CERNI, F.A; et al. *Tityus serrulatus* venom - A lethal cocktail. **Toxicon**. v. 108, p.272-284, 2015.

PURSCHE M; JACOBI H; WITTE I. Differences in genotoxicity of H₂O₂ and tetrachlorohydroquinone in human fibroblasts. **Mutation Research**. v. 513, p. 159–167, 2002.

QUADROS, Rosiléia Marinho de; VARELA, Arlindo Rodrigo; CAZARIN, Maira Godinho; MARQUES, Sandra Márcia Tietz. Acidentes escorpiônicos notificados pelo SINAN na região Serrana de Santa Catarina, Brasil, 2000-2010. **REB**. v. 7, n. 1, p. 96-108, 2014.

REVELO MP, BAMBIRRA LA, FERREIRA AP, DINIZ CR, CHÁVEZ-OLORTEGUI C. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. **Toxicon**. V. 10 p. 1119-1125. 1996.

RIBEIRO, Ilda Patricia; GAIVÃO, Isabel. Efeito genotóxico do etanol em neuroblastos de *Drosophila melanogaster*. **Rev. Port Saúde Pública**. V. 28, n. 2. P. 199-204. 2010.

RODRIGUEZ, A.; ZERPA. H.; RUIZ. A., BERMÚDEZ, V.; GARCIA F.; SILVA A.; GUTIÉRREZ L.; VILLASMIL S. Effect of clonidine in mice injected with *Tityus discrepans* scorpion venom. **Toxicon**. v. 63, n. 1.p.70-77. 2013.

RODRIGUEZ, Renan Volner. **Efeitos da toxina TsTX-I isolada do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* sobre o hipocampo de ratos**. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado). Área de concentração: Toxinologia - Instituto Butantan. São Paulo.

SCHAFERS, M.; SORKIN, L. Effect of cytokines on neuronal excitability. **Neurosci. Lett.**, V. 437, p. 188–193, 2008.

SILVA, Tiago F.; LIRA-DA-SILVA, Rejâne M.& Luciana L. Casais -e- Silva. Avaliação da dl50 e edema pulmonar induzido pelo veneno de *Tityus serrulatus* (scorpiones; buthidae) procedente da Bahia, Brasil. **Biota Neotropica**. v. 5, 2005.

SINGH, N. P; MCCOY, M. T; et al. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**. v. 175, n. 1, p. 184-91, 1988.

SOARES, MRM; AZEVEDO CSD, & MARIA MD. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35, n.4, p. 359-363, 2002.

TARASIUK, A.; SOFER, S. Effects of adrenergic-receptor blockade and ligation of spleen vessels on the hemodynamics of dogs injected with scorpion venom. **Crit. Care Med.**, v.25, p.365-372, 1999.

TICE, R. R; AGURELL E; ANDERSON, D; BURLINSON, B; et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environ Mol Mutagen**. v. 35, n.3, p. 206-21, 2000.

VASCONCELOS, F.; SAMPAIO, S.V.; GARÓFALO, M.A.R.; GUIMARÃES, L.F.L.; GIGLIO, J.R.; ARANTES, E.C. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract up on *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **J. Ethnopharmacol**. v. 95, p. 385–392, 2004.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.DE.; SILVA, J.DA.; HENRIQUES, J. A.P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research**,v.605, p.78-86, 2006.

WOLFF, Delmira; BARROSO, Lidiane. Acidentes causados por animais peçonhentos no Rio Grande do Sul. **Engenharia Ambienta – Espírito Santo do Pinhal**. v. 9, n.3, p. 078 – 086, 2012.

ANEXO

ANEXO – Certificado do CEUA



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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Análise imunológica, genotóxica e da ação antiveneno contra o veneno do escorpião Tityus serrulatus do extrato alcoólico de Piper miquelianum C.DC., Petiveria alliacea L. e Aristolochia triangularis Cham. & Schltd.” Protocolo nº 076/2015-1 sob a responsabilidade de Ricardo Andrez Machado de Ávila e equipe: Luiza Macarini Bosa, Rahisa Scussel, Ana Paula Ribeiro, Valeska Paulo Fernandes, Nathalia Coral Galvani, Angelino Chitoma Domingos, Mirian Ivens Fagundes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESCO – Universidade do Extremo Sul Catarinense, em reunião de: 15/06/2015.

Vigência do Projeto	01/07/2015 a 30/12/2017
Espécie/linhagem	Mus musculus – Camundongos Swiss
Nº. De animais	180
Peso/Idade	18g a 22g / 28 a 35 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESCO

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 076/2015-1

Principal Investigator: Ricardo Andrez Machado de Ávila

Researchers: Luiza Macarini Bosa, Rahisa Scussel, Ana Paula Ribeiro, Valeska Paulo Fernandes, Nathalia Coral Galvani, Angelino Chitoma Domingos, Mirian Ivens Fagundes

Project title: *Immunoassay, genotoxic and antivenom action against scorpion venom Tityus serrulatus the alcoholic extract of Piper miquelianum C.DC., Petiveria alliacea L. and Aristolochia triangularis Cham. & Schltd*

*The project 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/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 16 de junho de 2015.


JAIRO JOSÉ ZOCCHE
 Coordenador da CEUA