

Comunicação

[Communication]

Proteínas do soro sanguíneo de cães inoculados com veneno de *Tityus serrulatus*

[Serum proteins in dogs inoculated with *Tityus serrulatus* venom]

E.L. Ribeiro, M.M. Melo*

Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

O escorpionismo desponta, no Brasil, como um dos maiores problemas de saúde pública, assumindo perfil epidemiológico grave em certas áreas e sob certas condições. Além do clima tropical e de estações chuvosas, os escorpiões têm a seu favor a alta adaptabilidade ao ambiente urbano, onde têm alimentação farta e não têm os competidores que teriam no meio silvestre (Soares *et al.*, 2002). Ocorrem cerca de 8000 acidentes por ano, no Brasil, e cerca de 50% dos acidentes são diagnosticados nos estados de Minas Gerais e São Paulo, sendo o escorpião-amarelo (*Tityus serrulatus*) a espécie mais envolvida (Soares *et al.*, 2002). Os dados epidemiológicos acerca de acidentes escorpiônicos em medicina veterinária são raros.

O veneno de escorpiões é caracterizado pela variedade e complexidade de toxinas, sendo composto por proteínas de baixo peso molecular, com cadeias curtas de aminoácidos, mucopolissacarídeos, pequenas quantidades de hialuronidases e neurotoxinas, sem atividade hemolítica, proteolítica, colinesterásica, fosfolipásica e fibrinogenolítica. O mecanismo de ação do veneno envolve primordialmente a ligação de toxinas em canais de sódio pós-ganglionares, estimulando a entrada de sódio na célula, mas também a ligação de outras a canais de potássio pós-ganglionares, ao contrário, com função bloqueadora. Ocorre, dessa forma, a despolarização da membrana, potencial de ação e liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e acetilcolina pelas terminações neuronais nas sinapses. Entre os efeitos sistêmicos mais graves, causados pela descarga anormal de neurotransmissores, destacam-se as

alterações cardiovasculares, com miocardite e insuficiência cardíaca congestiva, edema pulmonar e hipertensão arterial, sinais que fazem parte de uma grande síndrome (Gazarian *et al.*, 2005).

A investigação sobre a atuação de mediadores inflamatórios nos mecanismos patofisiológicos sistêmicos na síndrome do envenenamento escorpiônico (SEE) tem relatado presença aumentada, no plasma de crianças acidentadas, de óxido nítrico (NO), um importante modulador farmacológico, das interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, do fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon- γ e antitripsina α -1, uma proteína de fase aguda produzida pelo fígado em quadros inflamatórios. Esses mediadores estão diretamente relacionados com resposta pró-inflamatória e indução de liberação de outras citocinas (Meki e El-dean, 1998; Fukuhara *et al.*, 2003). A participação de bradicinina, NO e IL-1 foi também constatada experimentalmente por Pessini *et al.* (2006) na indução de febre em ratos inoculados com veneno de *T. serrulatus* por via intraperitoneal, mostrando-se esses mediadores os mais importantes na resposta febril da SEE. Os mecanismos exatos dos mediadores inflamatórios e farmacológicos no envenenamento escorpiônico não estão definidos a contento, mas tais resultados lhes dão lugar de destaque e poderão explicar, conjuntamente à liberação de neurotransmissores, muitos sinais clínicos causados pelo veneno de escorpião e auxiliar a terapêutica da SEE.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de proteínas séricas, discriminadas de acordo com a

Recebido em 11 de agosto de 2011

Aceito em 28 de novembro de 2011

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail:marilia@vet.ufmg.br

separação eletroforética, em cães inoculados experimentalmente com veneno do escorpião-amarelo, a fim de se elucidar a participação de proteínas de fase aguda e processos inflamatórios no envenenamento escorpiônico.

Foram usados 12 cães sem raça definida, machos, adultos, hígdos, vacinados contra Raiva, e com sorologia negativa para leishmaniose (ELISA e RIFI – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – Escola de Veterinária – UFMG), cedidos pelos Centros de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte e Betim. Formaram-se dois grupos, por sorteio, com seis cães em cada: grupo I (placebo), peso médio de 12,9±3,4kg, e grupo II (veneno), peso médio de 15,5±7,0kg. A dose de 250µg/kg de veneno de *T. serrulatus* utilizada neste experimento, determinada previamente no experimento-piloto, foi diluída em 0,5mL de solução salina (PBS). A inoculação foi feita por via subcutânea na face interna da coxa esquerda dos cães do grupo II com seringa hipodérmica descartável de 1,0mL para insulina (BD Plastipak®), com dispositivo de esparadrapo adaptado à agulha para mimetizar o agulhão do escorpião (4mm).

Os cães do grupo-controle receberam 0,5mL de PBS, como placebo. Amostras de sangue foram coletadas antes do envenenamento (T zero) e após duas horas (T1), seis horas (T2), 12h (T3), 24h (T4), 48h (T5) e 72h (T6). As coletas foram feitas por punção das veias jugular ou cefálica com agulha para coleta a vácuo (LABOR IMPORT® – Osasco-SP) e tubos de 3mL (VACUETTE®, Greiner Bio-One Brasil – Americana-SP) sem anti-coagulante, para obtenção de soro. Foram realizadas dosagens séricas de proteínas totais (PT) por método colorimétrico cinético (SYNERMED® – Synermed International Inc.) em aparelho analisador bioquímico (Cobas Mira –Roche – GMI, Global Medical Instrumentations, Inc. – Ramsey, EUA). O proteinograma foi feito por meio de eletroforese com tampão Tris em filmes de agarose (CELMGEL® – CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri-SP), e as bandas eletroforéticas foram lidas e

quantificadas pelo *software* SE-250 (Software SE-250) para determinar a porcentagem de albumina e globulinas alfa (α), beta(β) e gama(γ) (Ribeiro *et al.*, 2010).

Para os dados numéricos foram realizados os testes de normalidade (Lillifors, Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk), e para as variáveis que apresentaram distribuição normal, algumas delas após sofrer transformação logarítmica ($\log 10x+1$), foram realizadas a análise de variância e a comparação de médias pelo teste Tukey.

As concentrações de PT, albumina e a relação albumina/globulina (A/G) estão representadas na Tab. 1. Não houve diferença estatística de PT entre os tempos e entre os grupos I e II ($P>0,05$), e os valores médios encontrados estão dentro da margem de referência para cães, 5,4–7,7g/dL (Jain, 1993). Não houve alterações nas concentrações de albumina e nas relações A:G. A relação A:G, no entanto, foi ligeiramente menor no grupo II, em todos os tempos, se comparado ao grupo I, e está relacionada aos valores maiores de γ -globulinas dos animais envenenados (Tab. 2). Ismail e Abd-Elsalam (1988) relataram um aumento de PT em cobaias uma hora após a aplicação de veneno de *Leiurus quinquestriatus*, *Androctonus amoreuxi* e *Buthotus judaicus* em função de hemoconcentração, e diminuição após quatro horas, por aumento de permeabilidade renal. Neste trabalho não houve alteração semelhante, indicando que não ocorreu desidratação. A Tab. 2 mostra os valores médios obtidos de albumina e globulinas α , β e γ . Não houve diferenças estatísticas ($P>0,05$) entre tempos e grupos.

As proteínas podem ser separadas por eletroforese em duas frações principais: albumina e globulinas. A albumina, também conhecida como soroalbumina, é a mais abundante das proteínas séricas, é produzida pelo fígado e corresponde, em animais, de 35 a 50% do total de proteínas do plasma. Suas principais funções são a ligação e o transporte de proteínas no sangue, a solubilização de compostos insolúveis ou parcialmente solúveis e a atividade osmótica (Rocha *et al.*, 2010).

Tabela 1. Valores séricos médios de proteínas, albumina e relação albumina:globulina (A:G) de cães inoculados com placebo (grupo I) e com veneno de *T. serrulatus* (grupo II) em diferentes tempos

Tempo	Proteínas totais (g/dl)		Albumina (g/dl)		Relação A:G	
	Grupo I	Grupo II	Grupo I	Grupo II	Grupo I	Grupo II
T zero	6,22±0,75	7,08±0,95	2,99±0,49	2,89±0,72	1,03±0,40	0,73±0,27
T1-2h	5,95±0,83	7,10±1,06	2,95±0,57	2,80±0,59	1,20±0,70	0,69±0,24
T2-6h	6,32±0,76	7,22±1,17	2,96±0,55	2,98±0,61	1,02±0,52	0,76±0,29
T3-12h	6,20±0,70	7,12±0,94	2,90±0,68	2,94±0,54	1,10±0,76	0,75±0,25
T4-24h	6,10±0,72	6,95±0,91	3,03±0,38	2,71±0,46	1,06±0,36	0,65±0,14
T5-48h	5,82±0,30	6,90±1,56	2,92±0,62	2,57±0,27	1,01±0,48	0,63±0,15
T6-72h	6,23±0,77	6,97±1,47	2,87±0,46	2,65±0,42	0,98±0,49	0,63±0,11

Não houve diferença significativa entre os tempos e os grupos, submetidos à transformação logarítmica e à análise de variância e ao teste Tukey, com $P>0,05$.

Tabela 2. Valores séricos médios de globulinas alfa, beta e gama de cães inoculados com placebo (grupo I) e inoculados com veneno de *T. serrulatus* (grupo II) em diferentes tempos

Tempo	Alfa (g/dL)		Beta (g/dL)		Gama (g/dL)	
	Grupo I	Grupo II	Grupo I	Grupo II	Grupo I	Grupo II
T zero	0,71±0,22	0,70±0,17	0,62±0,18	0,49±0,29	1,88±0,78	2,99±0,70
T1-2h	0,65±0,29	0,84±0,20	0,48±0,23	0,57±0,10	1,85±0,84	2,87±0,89
T2-6h	0,69±0,28	0,78±0,14	0,51±0,13	0,47±0,23	2,14±0,95	2,97±0,98
T3-12h	0,65±0,30	0,74±0,25	0,49±0,28	0,50±0,17	2,11±0,96	2,92±0,78
T4-24h	0,66±0,15	0,79±0,30	0,46±0,14	0,62±0,28	1,81±0,99	2,81±0,74
T5-48h	0,65±0,18	0,79±0,14	0,52±0,34	0,46±0,19	1,91±0,71	3,06±1,45
T6-72h	0,74±0,18	0,70±0,15	0,51±0,27	0,51±0,31	2,10±1,04	3,08±1,29

Não houve diferença significativa entre os tempos e os grupos, submetidos à transformação logarítmica e à análise de variância e ao teste Tukey ($P>0,05$).

A fração globulínica é uma mistura muito complexa de proteínas, sendo dividida em três subfrações: α , β e γ . Todas as proteínas dessa fração são produzidas no fígado, à exceção das γ -globulinas, que são produzidas por linfócito. Sob influência de IL-1, TNF- α , e, especialmente, IL-6, o fígado aumenta a produção de certas proteínas plasmáticas em resposta a uma variedade de estresses, como inflamações, infecções bacterianas, radiações, intoxicações e isquemia. Esta síntese de proteínas está associada com infecções e inflamações agudas. Sua resposta começa dentro de poucas horas após a injúria e declina dentro de 24 a 48h, sendo, assim, chamada de proteínas de fase aguda.

Bertazzi *et al.* (2003), ao avaliarem os efeitos de veneno bruto de *T. serrulatus* e de sua toxina TsTX-I sobre as vias clássica e alternativa do sistema complemento de ratos, *in vivo*, observaram aumentos expressivos em sua atividade e relacionaram-nos ao aumento de interleucinas e à produção hepática das proteínas de fase aguda. Diferentemente, as globulinas plasmáticas dos cães, neste trabalho, não apresentaram alterações entre os grupos I e II.

Foram descritas leucocitose e policitemia transitórias duas e seis horas após o envenenamento em cães (Ribeiro *et al.*, 2009). Os resultados de proteínas totais e globulinas obtidos neste trabalho reforçam a possibilidade de essas alterações serem decorrentes da ação das catecolaminas sobre o compartimento marginal de leucócitos dos vasos e sobre o baço, causando vasoconstrição, e excluem o estímulo à produção de citocinas e proteínas de fase aguda hepáticas frente aos antígenos do veneno. A concentração média de γ -globulinas nos cães do grupo II foi maior que a do grupo I, embora sem diferença estatística, devido à variação individual de um dos cães, o qual apresentou os maiores valores de γ -globulinas (4,08 a 5,8g/dL).

Concluiu-se, portanto, que não houve indução de proteínas de fase aguda em cães mediante a inoculação de veneno bruto de *Tityus serrulatus*, na dose de 250 μ g/kg.

Palavras-chave: cão, proteína total, albumina, globulinas, *Tityus serrulatus*

ABSTRACT

Protein profile of twelve healthy adult dogs averaging 14.2 ± 5.4 kg was evaluated after the inoculation of yellow scorpion venom (*Tityus serrulatus*). The animals were randomly divided in two experimental groups (G) (n= 6): GI control, which received 0.5mL of phosphate buffered saline (PBS) subcutaneously in the medial side of the left thigh (MSLT), and GII which received T. serrulatus venom (250 μ g/kg), diluted in 0.5mL of PBS subcutaneously in the MSLT. Blood samples were collected before the venom inoculation (time zero) and after 2, 6, 12, 24, 48 and 72h to obtain serum for measurement of total proteins. The fractionated protein profile was done by electrophoresis on agarose films using Tris and Amido Black staining and quantification of albumin and globulin fractions by software. The results showed no changes in the levels of total proteins, albumin and α , β and γ globulin or reversal of the albumin:globulin ratio between the groups, concluding that the dose of 250 μ g/kg of *Tityus serrulatus* venom did not induce acute phase proteins in dogs.

Keywords: dog, total protein, albumin, globulins, *Tityus serrulatus*

REFERÊNCIAS

BERTAZZI, D.T.; ASSIS-PANDOCHI, A.I.; SEIXAS, A.E.C. *et al.* Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon*, v.41, p.501-508, 2003.

FUKUHARA, Y.D.M.; REIS, M.L.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R. *et al.* Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*, v.41, p.49-55, 2003.

GAZARIAN, K.G.; GAZARIAN, T.; HERNÁNDEZ, R. *et al.* Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine*, v.23, p.3357-3368, 2005.

ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, M.A. Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration? *Toxicon*, v.26, p.233-256, 1988.

JAIN, N. C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

MEKI, A.R.M.A.; EL-DEAN, Z.M.M. Serum interleukin-1 β , interleukin-6, nitric oxide and α 1-antitrypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon*, v.36, p.1851-1859, 1998.

PESSINI, A.C.; SANTOS, D.R.; ARANTES, E.C. *et al.* Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Toxicon*, v.48, p.556-566, 2006.

RIBEIRO, E.L.; MELO, M.M.; LABARRÈRE, C.R. *et al.* Hemograma de cães submetidos ao envenenamento experimental por *Tityus serrulatus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, p.135-143, 2009.

RIBEIRO, E.L.; PINTO, M.C.L.; LABARRÈRE, C.R. *et al.* Biochemical profile of dogs experimentally envenomed with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v.55, p.1125-1131, 2010.

ROCHA, T.C.; FRANCIOSI, C.; NOCITI, R.P. *et al.* Hemograma e proteínas do soro sanguíneo de bezerros Canchim-Nelore e da raça Holandesa nos primeiros 30 dias de vida. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, p.1250-1254, 2010.

SOARES, M.R.M.; AZEVEDO, C.S.; MARIA, M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.35, p.359-363, 2002.