

Alterações hemodinâmicas e reatividade vascular e traqueal em resposta ao veneno do escorpião marrom (*Tityus bahiensis*)

Palavras-Chave: [veneno de escorpião (*Tityus bahiensis*)], [hemodinâmica e reatividade vascular], [reatividade traqueal] [edema pulmonar]

Autores/as:

BEATRIZ RIBEIRO MONTIN [Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas]

BEATRIZ BARROSO PEREIRA [Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas]

Prof. Dr. STEPHEN HYSLOP (orientador) [Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas]

INTRODUÇÃO:

No Brasil são notificados mais de 150.000 casos de escorpionismo por ano, sendo as regiões sudeste e nordeste as com maior número de casos (Brasil, 2019). A alta incidência em determinadas regiões, aliada ao potencial de induzir um quadro clínico grave, até fatal, especialmente em crianças, torna o escorpionismo um problema de saúde sério no Brasil (Cupo, 2015). O gênero de maior importância no cenário brasileiro é o *Tityus*, sendo a espécie *Tityus serrulatus* a principal responsável pelos casos de escorpionismo no Sudeste (Ministério da Saúde, 2009), seguido pelo *Tityus bahiensis* (Bucarechi *et al.*, 2014).

As manifestações decorrentes do envenenamento sistêmico por *Tityus* spp. são resultantes da ativação dos sistemas adrenérgico e colinérgico. Em quadros leves observa-se apenas efeitos locais como dor intensa, eritema e vermelhidão (Isbister *et al.*, 2014; Cupo, 2015). Quadros moderados apresentam taquicardia, vômito, agitação e sudorese. As manifestações mais graves incluem todos os sintomas já citados, acompanhados de edema pulmonar e manifestações cardíacas (Isbister *et al.*, 2014; Cupo, 2015). Os efeitos hemodinâmicos, vasculares e pulmonares são clinicamente relevantes devido principalmente à hipertensão arterial exacerbada decorrente da liberação excessiva de catecolaminas e à ação pulmonar caracterizada por edema pulmonar marcante, sendo esta última uma das principais causas de óbito, especialmente em crianças (Cupo *et al.*, 2009; Bucarechi *et al.*, 2014; Cupo, 2015; Pucca *et al.*, 2015).

Os efeitos locais e sistêmicos de peçonhas escorpiônicas são mediados por peptídeos e proteínas presentes nestas peçonhas (Gwee *et al.*, 2002). A peçonha de escorpiões da família Buthidae (que inclui o gênero *Tityus*) apresenta várias proteínas de baixa massa molecular que agem principalmente nos canais iônicos de sódio e potássio dependentes de voltagem, modulando a permeabilidade iônica e afetando assim o potencial de ação e a excitabilidade e contratilidade de tecidos excitáveis como neurônios e diversos tipos de músculo (Collaço *et al.*, 2019, 2020).

Neste projeto, propomos investigar a ação hemodinâmica da peçonha de *T. bahiensis* em ratos anestesiados e averiguar sua atividade *in vitro* na reatividade vascular e traqueal em tecido de ratos. Estes objetivos serão alcançados através de três abordagens: **1)** Avaliação do perfil de alterações hemodinâmicas causadas pela peçonha em ratos anestesiados; **2)** Avaliação da atividade da peçonha nos vasos sanguíneos e traqueia isolados, com ênfase no papel do endotélio vascular; **3)** Avaliação dos mecanismos envolvidos nas respostas observadas utilizando antagonistas específicos.

METODOLOGIA:

A reatividade vascular à peçonha (fornecida pelo Instituto Butantan) foi avaliada em aorta descendente torácica e artéria pulmonar. Após anestesia dos ratos com isoflurano, realizou-se uma toracotomia bilateral para obtenção dos vasos (aorta e artéria pulmonar). Para ambos os vasos, foram realizados experimentos com e sem endotélio (o endotélio foi removido

mecanicamente). A presença ou não de endotélio foi testada através da pré-contracção com fenilefrina (1 μ M) e posterior adição de acetilcolina (1 μ M): um relaxamento <20% indicou remoção adequada do endotélio e relaxamento >70% indicou a presença de endotélio; anéis com relaxamento entre 20% e 70% foram descartados da análise. Também foi colhida a traqueia para obtenção de anéis de traqueia. A eficácia dos antagonistas frente a agonistas e à peçonha foi avaliada pré-incubando-se os antagonistas com anéis de aorta com endotélio e de traqueia. Todos os tecidos foram montados, sob tensão de 10 mN (aorta e traqueia) e 5 mN (artéria pulmonar), em banho de órgão contendo solução fisiológico (Krebs) gaseificada com 95%O-5%CO₂ a 37 °C.

As alterações hemodinâmicas foram avaliadas em ratos anestesiados com isoflurano a 3% para o procedimento cirúrgico, com manutenção de anestesia com 1,5 % de isoflurano. A peçonha foi administrada pela veia femoral nas doses de 0,1, 0,3, 0,6 e 0,9 mg/kg em volume fixo de 0,1 ml.

Os resultados foram expressos como média \pm EPM do número de experimentos indicado e foram analisados estatisticamente usando análise de variância (ANOVA) de uma via ou de duas vias seguida pelo teste de Tukey ou Sidak, com um valor de $p < 0,05$ indicando significância. As análises foram feitas com o software Prism v. 5 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1. Atividade da peçonha em vasos sanguíneos e papel do endotélio

Na aorta torácica com endotélio, a peçonha sozinha (até 40 μ g/ml) não contraiu o vaso mas, em tecido pré-contráido com fenilefrina (1 μ M), a peçonha (0,01-30 μ g/ml) causou relaxamento (máximo de 60,2% com 0,1 μ g/ml); houve redução progressiva no relaxamento com concentrações maiores, o que resultou em uma 'curva de sino' na faixa de concentrações testada (Fig. 1). A remoção do endotélio atenuou o relaxamento visto anteriormente, indicando uma dependência deste fenômeno de mediadores liberados por células endoteliais. Na ausência de endotélio, o maior relaxamento (21-25%) foi observado com as duas menores concentrações, enquanto o relaxamento com as outras concentrações variou de 4,3% a 8,5%.

Assim como na aorta, a peçonha sozinha (até 40 μ g/ml) não contraiu a artéria pulmonar mas, em tecido pré-contráido com fenilefrina (1 μ M), ela causou relaxamento, com o máximo de relaxamento (~44%) ocorrendo na mesma faixa de concentrações (0,1-0,3 μ g/ml) observada em aorta. Embora o máximo de relaxamento neste vaso tenha sido menor do que em aorta esta diferença não foi significativa. Assim como na aorta, na artéria pulmonar também houve redução

no relaxamento nas concentrações maiores, porém este efeito não foi tão marcante quanto em aorta (Fig. 2). A remoção do endotélio atenuou o relaxamento causado pela peçonha, especialmente em concentrações $\geq 0,1$ μ g/ml, e.g., de ~44% para ~17% com a concentração de 0,1 μ g/ml (Fig. 2). Em ambos os tipos de vaso, o relaxamento observado com as duas menores concentrações (0,01 e 0,03 μ g/ml) foi menos afetado pela remoção do endotélio quando comparado com as concentrações maiores (em artéria pulmonar, a remoção do endotélio não afetou o relaxamento nas duas concentrações menores).

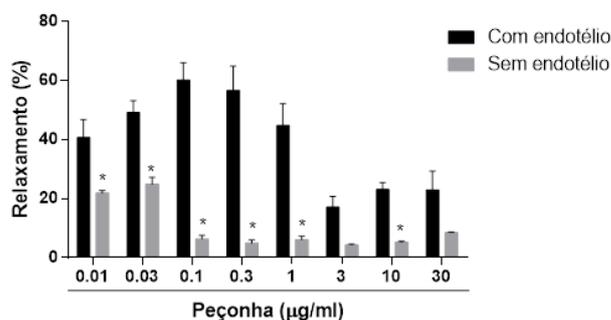


Figura 1 – Ação da peçonha de *T. bahiensis* no relaxamento de anéis de aorta torácica de ratos, com e sem endotélio. O relaxamento foi expresso em porcentagem da contração causada por fenilefrina (1 μ M). As colunas representam a média \pm EPM (n=5). * $p < 0,05$ comparado à coluna correspondente com endotélio (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Sidak)

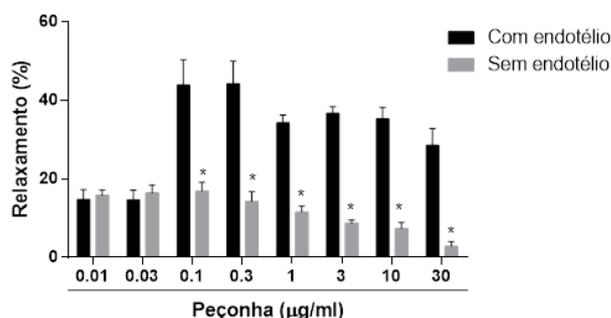


Figura 2 – Ação da peçonha de *T. bahiensis* no relaxamento de anéis de artéria pulmonar de ratos, com e sem endotélio. O relaxamento foi expresso em porcentagem da contração causada por fenilefrina (1 μ M). As colunas representam a média \pm EPM (n=5). * $p < 0,05$ comparado à coluna correspondente com endotélio (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Sidak)

2. Atividade da peçonha em anéis de traqueia

Ao contrário dos vasos sanguíneos em que não causou contração, na traqueia a peçonha causou forte contração sozinha, que foi dependente da concentração testada, até chegar a 100% com ≥ 1 μ g/ml (Fig. 3).

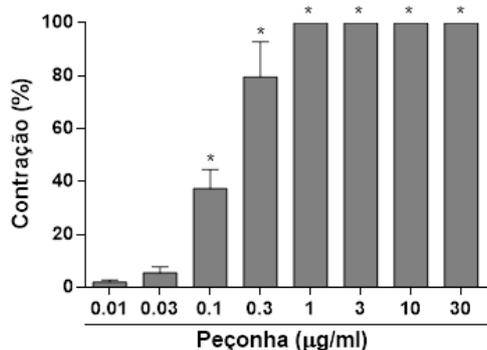


Figura 3 – Contração de anéis de traqueia de rato causada pela peçonha de *T. bahiensis*. Note que a resposta (contração) máxima foi atingida com concentrações $\geq 1 \mu\text{g/ml}$. A contração foi expressa como porcentagem da contração máxima obtida com KCl ($60 \mu\text{M}$). As colunas representam a média \pm EPM ($n=5$). * $p<0,05$ comparado com a tensão basal (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey)

3. Alterações hemodinâmicas causadas pela peçonha

Em ratos anestesiados, a peçonha de *T. bahiensis* produziu perfis de respostas diferentes, dependendo da dose. A dose de 0,1 mg/kg, i.v., não resultou em alterações significativas quando comparada com ratos tratados com salina 0,9% sozinha (controle). Por outro lado, doses $\geq 0,3$ mg/kg, i.v., causaram hipertensão dentro de 1 min após injeção de peçonha e com duração variável (de até 15 min com a dose de 0,3 mg/kg), seguida de hipotensão e morte dos ratos entre 10 e 60 min após a injeção de peçonha. A duração da hipotensão foi maior com a dose de 0,3 mg/kg e foi encurtada com doses maiores na medida em que a morte ocorria de forma mais precoce. Com doses $\geq 0,3$ mg/kg houve bradicardia (queda na frequência cardíaca) e bradipneia (queda na frequência respiratória) progressivas até a morte, sendo que as alterações foram mais marcantes e mais rápidas com doses maiores (Fig. 4)

Os resultados indicam que a peçonha relaxa vasos sanguíneos (sendo que parte deste relaxamento depende do endotélio vascular) e contrai tecido traqueal *in vitro*, além de causar uma série de alterações hemodinâmicas (hipotensão, hipertensão, bradicardia, e mudanças respiratórias) *in vivo* que variam conforme a dose. Este perfil de respostas se assemelha àquilo que é visto clinicamente (Cupo *et al.*, 2009; Bucarechi *et al.*, 2014; Cupo, 2015).

4. Avaliação dos mecanismos de relaxamento vascular e traqueal

Na aorta torácica com endotélio, a pré-incubação com atropina ($10 \mu\text{M}$; antagonista muscarínico) atenuou o relaxamento a acetilcolina $1 \mu\text{M}$ em de 50%, e o da peçonha ($3 \mu\text{g/ml}$) em $\sim 75\%$ (de $\sim 60\%$ até 15%) (Fig. 5). A cimetidina ($15 \mu\text{M}$; antagonista histamínico) inibiu o relaxamento causado pela peçonha em $\sim 67\%$ (de $\sim 60\%$ para

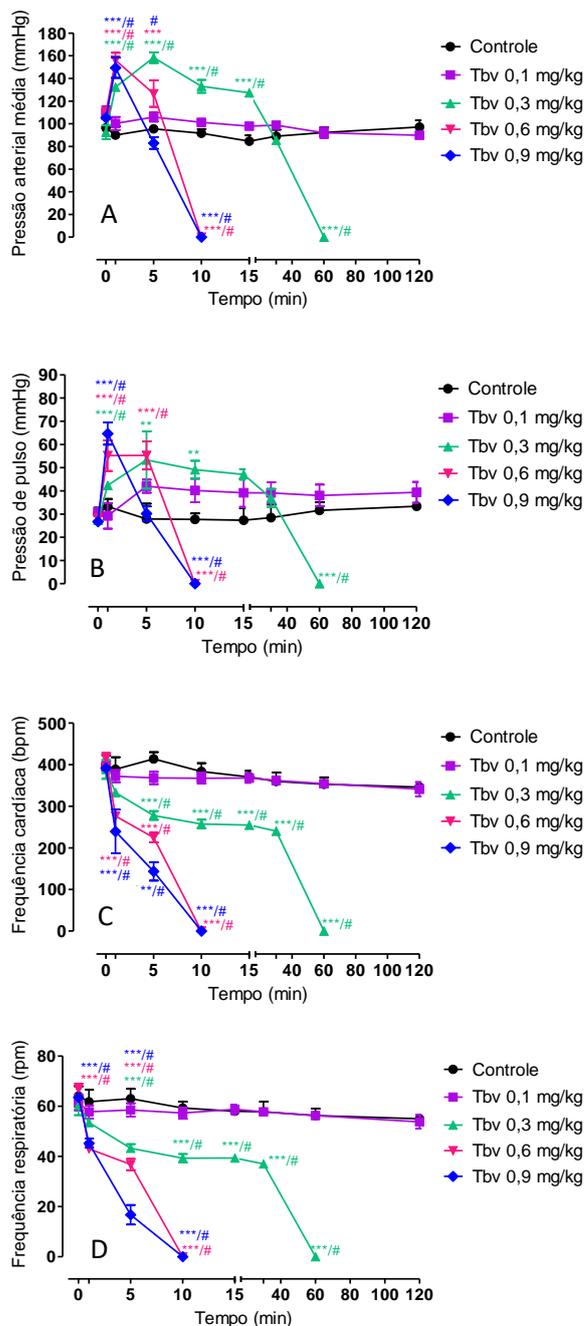


Figura 4. Alterações hemodinâmicas em resposta à injeção da peçonha de *T. bahiensis* (0,1-0,9 mg/kg, i.v.). **A** – pressão arterial média, **B** – pressão de pulso, **C** – frequência cardíaca, e **D** – frequência respiratória, em ratos anestesiados. Ratos controle receberam uma injeção ($100 \mu\text{l}$) de 0,9% NaCl. Os pontos representam a média \pm EPM ($n=4$). * $p<0,05$ comparado com controle (ratos injetados com salina 0,9%) do tempo correspondente (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Sidak) e # $p<0,05$ comparado com o basal de cada dose (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). bpm – batimentos por minuto; rpm – respirações por minuto.

$\sim 20\%$) (Fig. 6). A inibição da enzima óxido nítrico (NO) sintase, por meio da pré-incubação com L-NAME ($100 \mu\text{M}$), inibiu marcadamente o relaxamento causado pela ACh ($1 \mu\text{M}$) e aboliu quase totalmente o relaxamento causado pela peçonha (Fig. 7), achado este que indica um papel importante para o NO liberado pelas células endoteliais no relaxamento causado pela peçonha.

Na traqueia não houve resposta à serotonina (1-300 μ M) nem histamina (1-300 μ M), sendo assim, não foram testados os antagonistas serotoninérgico e histamínico. A pré-incubação de traqueia com atropina 1 μ M, aboliu a contração causada pelo carbacol (1 μ M, agonista muscarínico) e pela peçonha (0,3 μ g/ml) demonstrando a importância de receptores muscarínicos na contração da traqueia pela peçonha. A tetrodotoxina 20 nM (TTX, bloqueador de canais dependentes de voltagem) e o verapamil 1 μ M (bloqueador de canal de cálcio dependentes de voltagem) aboliram quase totalmente a atividade contrátil da peçonha em traqueia (Fig. 8).

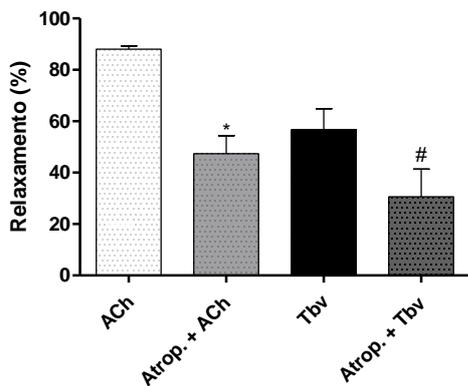


Figura 5 – Envolvimento de receptores muscarínicos no relaxamento de aorta torácica pela peçonha de *T. bahiensis* (Tbv). ACh – acetilcolina (1 μ M), atropina (10 μ M) e Tbv – peçonha de *T. bahiensis* (0,3 μ g/ml). O relaxamento foi expresso em porcentagem da contração causada por fenilefrina (1 μ M). As colunas representam a média \pm EPM (n=5). *#p<0,05 comparado com ACh sozinha (*) e peçonha sozinha (#) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey).

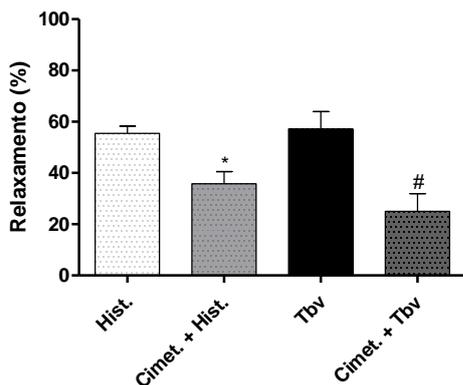


Figura 6 – Envolvimento de histamina no relaxamento de aorta torácica com endotélio pela peçonha de *T. bahiensis* (Tbv). Histamina (1x10⁻⁴ μ M), cimetidina (15 μ M) e Tbv – peçonha de *T. bahiensis* (0,3 μ g/ml). O relaxamento foi expresso em porcentagem da contração causada por fenilefrina (1 μ M). As colunas representam a média \pm EPM (n=5). *#p<0,05 comparado com histamina sozinha (*) e peçonha sozinha (#) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey).

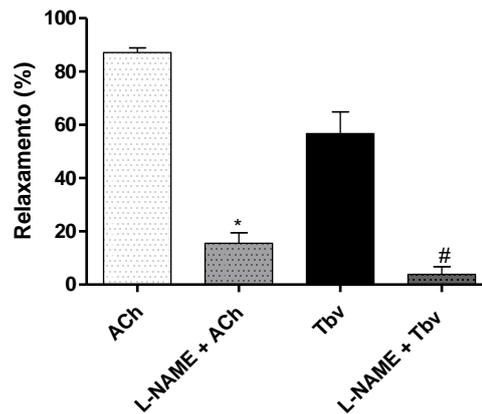
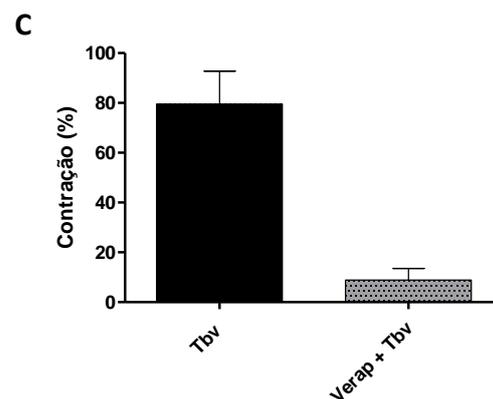
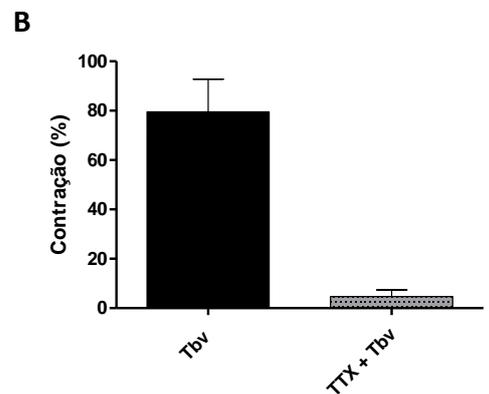
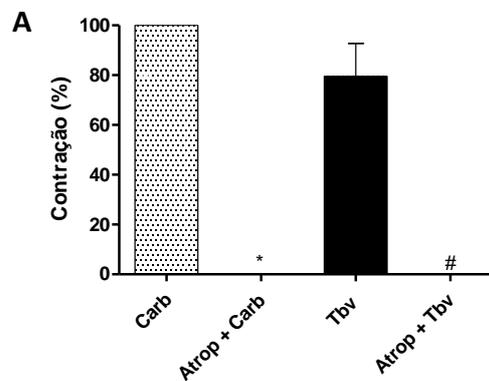


Figura 7 – Envolvimento do óxido no relaxamento de anéis de aorta com endotélio causado pela peçonha de *T. bahiensis* (Tbv – 0,3 μ g/ml). ACh – acetilcolina (1 μ M) e L-NAME (100 μ M). O relaxamento foi expresso em porcentagem da contração causada por fenilefrina (1 μ M). As colunas representam a média \pm EPM (n=5). *#p<0,05 comparado com ACh sozinha (*) e peçonha sozinha (#) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey).



B

Figura 8 – Envolvimento de receptores muscarínicos (A), de canais de sódio dependentes de voltagem (B) e de canais de cálcio dependentes de voltagem (C) na contração induzida pela peçonha de *T. bahiensis* (Tbv) e receptores muscarínicos na contração de anéis de traqueia de rato. Os receptores muscarínicos foram bloqueados com atropina 1 μ M (Carb – carbacol 1 μ M, agonista muscarínico), os canais de sódio foram bloqueados com tetrodotoxina 20 nM (TTX) e os canais de cálcio foram bloqueados com verapamil 1 μ M. O relaxamento foi expresso em porcentagem da contração causada por fenilefrina 1 μ M. As colunas representam a média \pm EPM (n=5). *#p<0,05 comparado com ACh sozinha (*) e peçonha sozinha (#) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey).

CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos nesta investigação indicam que a peçonha de *T. bahiensis* causa uma série de alterações cardiovasculares (hipotensão, hipertensão, bradicardia e bradipneia) em ratos anestesiados que variam conforme a dose e se assemelham às alterações vistas na clínica (Freire-Maia e Campos, 1989; Freire-Maia *et al.*, 1994; Cupo *et al.*, 2009; Bucarechi *et al.*, 2014; Cupo, 2015). Os mecanismos destas respostas ainda precisam ser investigados, mas provavelmente envolvem a ativação de vias adrenérgicas e colinérgicas, como ocorre com *T. serrulatus*. Os dados também indicam que a hipertensão não é devido à ativação direta da vasculatura uma vez que a peçonha não contraiu aorta torácica ou artéria pulmonar *in vitro*. Por outro lado, parte da hipotensão parece ser devido à capacidade da peçonha em causar relaxamento do músculo vascular liso por mecanismos dependentes do endotélio e do NO, com papel menor para vias colinérgicas e histaminérgicas. Já na traqueia, a peçonha contraiu fortemente este tecido por mecanismos muscarínicos envolvendo a ativação de canais de sódio e de cálcio dependentes de voltagem.

Este conjunto de dados representa uma contribuição relevante à toxinologia de *T. bahiensis* e uma contribuição importante para o nosso entendimento da ação cardiovascular desta peçonha.

REFERÊNCIAS

Brasil (2019) Situação Epidemiológica – **Dados Ministério da Saúde**, Brasília, DF. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos>. Data de acesso: 01 de maio de 2020.

Bucarechi F, Fernandes LCR, Fernandes CB, et al. (2014) **Clinical consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* scorpion stings in the region of Campinas**, southeastern Brazil. *Toxicon* 89, 17-25.

Collaço RCO, Hyslop S, Dorce VAC, et al. (2019) **Scorpion venom increases acetylcholine release by prolonging the duration of somatic nerve action potentials**. *Neuropharmacology* 153, 41-52.

Collaço RCO, Hyslop S, Rocha T, et al. (2020) **Neurotoxicity of *Tityus bahiensis* (brown scorpion) venom in sympathetic vas deferens preparations and neuronal cells**. *Arch. Toxicol.* 94, 3315-3327.

Cupo P (2015) **Clinical update on scorpion envenoming**. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48, 642-649.

Cupo P, Azevedo-Marques MM, Hering SE (2009) Escorpionismo. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V. (orgs.) **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2a. ed. Sarvier, São Paulo. pp. 214-224.

Freire-Maia L, Campos JA (1989) **Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning**. In: Ownby CL, Odell GV, eds. *Natural Toxins, Characterization, Pharmacology and Therapeutics*. Pergamon Press, Oxford. pp. 130-159.

Freire-Maia L, Campos JA, Amaral CF (1994) **Approaches to the treatment of scorpion envenoming**. *Toxicon* 32, 1009-1014.

Gwee MCE, Nirthan S, Khoo HE, et al. (2002) **Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins**. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 795-781.

Isbister GK, Bawaskar HS, Brown, SG (2014) **Scorpion envenomation**. *N. Engl. J. Med.* 371, 1559-1560.

Ministério da Saúde (2009) **Manual de Controle de Escorpiões**. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria Vigilância em Saúde, Brasília, DF: Ministério da Saúde.

Pucca MB, Cerni FA, Pinheiro Junior EL, et al. (2015) ***Tityus serrulatus* venom – a lethal cocktail**. *Toxicon* 108, 272-284.

Agradecimento: Agradecemos o apoio do programa PIBIC-CNPq (Beatriz Montin)