

Proteinograma de ovelhas imunizadas com veneno detoxificado do escorpião *Tityus serrulatus*

Proteinogram of Immunized Sheep with Detoxified *Tityus serrulatus* Scorpion Venom

Marina Guimarães Ferreira¹, Ana Flávia Ribeiro Michel², Lílian de Paula Gonçalves Reis¹, Ana Flávia Machado Botelho³, Clara Duarte⁴, Carlos Chávez-Olórtegui⁴ & Marília Martins Melo¹

ABSTRACT

Background: Scorpionism is a worldwide medical issue, especially relevant in the tropical and subtropical countries. *Tityus serrulatus* is the species responsible for most cases in Brazil. Antivenom administration to victims is the sole specific therapy obtained from donor animals. Most of these donors suffer with symptoms of the poisoning, debilitating their health and reducing their life expectancy. The aim of the present research was to evaluate whether the immunogens prepared from the crude and detoxified venom of *T. serrulatus* promoted different changes in fractionated sheep plasma proteins, during a scorpion antivenom serum production.

Materials, Methods & Results: Twelve sheep, healthy, mean weight of 30 kg, were distributed into 3 groups (n = 4): G1 (control), G2 (crude venom) and G3 (detoxified venom). The adopted immunization protocol (first cycle) had 6 doses, 3 using Freund's adjuvant, with a 21-day interval between each one (day 0, 22 and 43), and 3 doses with no adjuvant (booster) and 0.2 mg of antigen (reinforcement), spaced 3 days between each other (day 50, 53 and 56). Group control (G1) received 6 immunizations with phosphate buffered saline (PBS) associated with Freund's adjuvant (1:1), while the other 2 groups received 0.5 mg of venom (G2) and detoxified venom (G3), respectively, diluted in PBS, associated with the Freund adjuvant. The boosters were 1/3 of the initial dose, diluted only PBS. At baseline (T0) and at 24 and 48 h after immunization, all animals underwent clinical examinations. Blood samples were collected at day 0, 22, 43, 53 and 56 for proteinogram analysis. Total protein, albumin and globulins fractions were measured. Plasma albumin concentration at T0 ranged from 3.41-4.86 g/dL, with a mean value of 4.12 g/dL. There was no statistical difference between the 3 experimental groups. The normal values determined for α -globulin range from 0.14 to 0.54 g/dL, with a mean of 0.31 g/dL (T0). There was a significant increase in the 3rd immunization and its respective interval (24-48 h), with values above normal in all groups: G1 (0.66 g/dL), G2 (0.62 g/dL) and G3 (0.65 g/dL). The β -globulin was subdivided into β_1 and β_2 globulin. At T0, the normal values of β_1 ranged from 0.45 to 1.05 g/dL, with a mean of 0.664 g/dL, and no significant change was observed in this classification. On the other hand, there was an abrupt increase in β_2 in all groups after the first immunization, compared to the baseline value in T0 (0.37 g/dL mean value). From the third to the 6th immunization, there was an important reduction in β_2 fraction when compared with baseline value. The γ -globulins fraction ranged from 0.80 g/dL to 76 g/dL. In the 6th immunization, there was a significant difference between G1 and the groups that received venom (G2 and G3). Therefore, all animals presented an acute inflammatory response, evidenced by the significant reduction of plasma albumin and an increase in α -globulin and β_2 -globulin. It is important to point out that *T. serrulatus* detoxified venom did not cause alterations in ovine proteinogram during the first cycle of immunization.

Discussion: The fact that both groups (G2 and G3) presented acute inflammatory response, indicates that this alteration is caused by the adjuvant present in the immunization protocol. *Tityus serrulatus* venom detoxified with glutaraldehyde did not cause significant alterations in ovine proteinogram in the early stages, suggesting that it may be used as an alternative antigen for the production of antivenom, improving clinical conditions of donor animals.

Keywords: scorpion, clinical pathology, ruminants, inflammation, antiserum.

Descritores: escorpião, patologia clínica, ruminantes, inflamação, antisoro.

DOI: 10.22456/1679-9216.120543

Received: 27 November 2021

Accepted: 31 January 2022

Published: 25 February 2022

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária & ⁴Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil. ²Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, Brazil. ³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brazil. CORRESPONDENCE: M.M. Melo [mariliamm@ufmg.br]. Av. Antônio Carlos n. 6627. Campus UFMG. CEP 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o escorpião *Tityus serrulatus* é o responsável por graves acidentes [18]. O tratamento consiste na soroterapia com anticorpos específicos, obtidos de animais produtores [13] que podem ter sua expectativa de vida reduzida, em função da imunização com repetidas doses de material tóxico [9,17].

O uso de imunógenos sem toxicidade ao animal é de grande relevância [8,18,20]. A detoxificação química do veneno com glutaraldeído é uma alternativa, reduzindo seus efeitos tóxicos e letais [12,17].

O veneno escorpiônico possui aminoácidos livres, sais inorgânicos, lipídios, aminas bioativas, enzimas [2,15,18], mucoproteínas, peptídeos, citocinas, bradiginina, entre outros [6]. Suas neurotoxinas afetam os mecanismos de permeabilidade de membranas excitáveis através da interação com canais iônicos (Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+}) [3,28,29], promovendo sua despolarização e liberação excessiva de neurotransmissores na fenda sináptica, sendo vistos efeitos adrenérgicos e colinérgicos de intensidade variável em diversos órgãos [18].

Os efeitos se relacionam com a liberação sistêmica de altos níveis de mediadores inflamatórios, principalmente IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e óxido nítrico [7,19,23-25,33], eicosanóides, fator de ativação plaquetária e fator de aumento da permeabilidade [25].

Animais expostos ao veneno podem apresentar alterações no perfil bioquímico sanguíneo [25], com padrão de resposta inflamatória aguda [22].

O objetivo do trabalho foi avaliar se os imunógenos obtidos do veneno bruto e detoxificado de *Tityus serrulatus* promoveram alterações nas proteínas plasmáticas fracionadas de ovinos submetidos a um ciclo de imunização na produção de antisoro escorpiônico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Para o desenvolvimento do presente estudo foram utilizados 12 ovinos sem raça definida, com 7 meses de idade, peso médio de 30 kg, clinicamente saudáveis, oriundos de uma propriedade rural localizada no Município de Baldim - MG. Administrou-se por via oral cloridrato de levamisol à 5% [Ripercol L Solução^{®1} - 5 mg/kg - dose única] e por via subcutânea

vacina polivalente contra as principais clostridioses [Poli-Star^{®2} - 2 mL - dose única]. Os animais permaneceram alojados durante o experimento em baias coletivas (4 m x 4 m), receberam dieta à base de ração granulada comercial (300 gramas/animal/dia), sal mineral para a espécie ovina em fase de crescimento, feno e água *ad libitum*.

Formaram-se, por sorteio, 3 grupos com 4 ovinos em cada: Grupo 1 (G1 - controle), Grupo 2 (G2 - imunizados com veneno bruto de *T. serrulatus*) e Grupo 3 (G3 - imunizados com veneno detoxificado de *T. serrulatus*). Cada grupo foi alojado em uma baia para facilitar a identificação e manuseio dos animais. Antes do início do processo de imunização, os ovinos permaneceram 60 dias em período de adaptação, com objetivo de reduzir o estresse e possíveis interferências no estudo.

Protocolo de imunização

Para preparação dos imunógenos, escorpiões da espécie *T. serrulatus* foram coletados na região de Belo Horizonte e mantidos no Laboratório de Imunoquímica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG. O veneno foi obtido por estimulação elétrica do telson (20 V) e posteriormente armazenado sob a forma líquida, no escuro e na temperatura de -20°C até seu uso.

O imunógeno veneno detoxificado foi preparado através do método de ligação cruzada por glutaraldeído em apenas um passo, conforme método descrito [17]. Para acoplamento via glutaraldeído, 10 mg do veneno bruto foram diluídos em 1,0 mL de salina tamponada em fosfato estéril (PBS) (NaCl 137 mM, 10 mM de fosfato, KCl 2,7 mM e 7,4 pH). Um total de 1,0 mL de solução de glutaraldeído 1% foi lentamente adicionada à solução com o veneno, mantida sob agitação constante por 1 h em temperatura ambiente. O veneno conjugado foi congelado a -20°C até sua utilização.

O protocolo de imunização foi composto por 6 doses, 3 associadas ao adjuvante de Freund³, com espaço de 21 dias entre elas (dia 0, dia 22 e dia 43) e 3 sem adjuvante (reforço), espaçadas em 3 dias (dia 50, dia 53 e dia 56). Nas 3 doses iniciais utilizou-se 0,5 mg de veneno total⁴ ou detoxificado⁴ e nos reforços utilizou-se 0,2 mg do imunógeno sem adjuvante.

Na primeira imunização os imunógenos preparados com solução salina tamponada em fosfato estéril (PBS) foram diluídos na proporção de 1:1 em adjuvante de Freund completo: G1(1,5 mL de adjuvante + 1,5 mL de PBS), G2 (1,5 mL de adjuvante + 1,5 mL de veneno bruto) e G3 (1,5 mL de adjuvante

+ 1,5 mL de veneno detoxificado). As 2 imunizações subsequentes consistiram do emprego de adjuvante incompleto de Freund associado aos imunógenos, seguindo a mesma proporção da primeira dose.

A emulsão completa do antígeno com o adjuvante foi garantida com auxílio do banho ultrassônico⁵ por aproximadamente 20 min, sendo precedida pela transferência das 2 substâncias em volumes iguais para tubos de ensaio esterilizados. Após obtenção de uma mistura homogênea, o material foi transferido para seringas estéreis⁶ de 5 mL, mantidas acondicionadas em caixa de material isotérmico com gelo reutilizável até o momento da aplicação nos animais.

Desafios e grupos experimentais

O local de inoculação nos animais foi a região dorso-lombar, dividido em 2 pontos, pela via subcutânea, precedido do uso de algodão embebido com álcool iodado.

As 3 doses de reforço (sem adjuvante) contaram com a associação do veneno bruto ou detoxificado (0,2 mL numa concentração de 0,2 mg) com PBS, totalizando 1,2 mL de volume final, aplicado por via subcutânea em apenas 1 ponto no dorso próximo ao pescoço do animal.

Os grupos foram submetidos às coletas de sangue antes de iniciarem as imunizações (tempo zero), 20 min, 24 e 48 h após cada inoculação, nos dias 0, 22, 43, 50, 53 e 56, totalizando 19 coletas/animal. As amostras foram coletadas por punção da veia jugular com agulha vácuo⁶ (25 x 8 mm) em frascos à vácuo⁷ contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%, para obtenção de plasma após centrifugação⁸ por 10 min (1.800 g). As amostras foram aliqüotadas em microtubos⁹ e armazenadas na temperatura de -20°C até seu processamento.

Perfil proteico fracionado

O perfil proteico fracionado foi obtido por eletroforese horizontal com kit¹⁰ contendo gel de agarose a 12% e tampão TRIS. Foram utilizadas amostras de plasma congeladas, com tempo de corrida de 30 min. Os géis foram corados com amido negro e descorados em uma série de etanol e ácido acético. A leitura foi feita por um “scanner” com software SE-250¹⁰, sendo a concentração proteica (g/dL) determinada através da multiplicação do percentual de cada fração pela concentração da proteína total, previamente obtida por refratometria¹¹.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo de parcelas sub-subdivididas,

conforme preconizado. Nas variáveis que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação de dados (logaritmo), sendo a comparação de médias através do teste de Tukey [31]. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

O traçado eletroforético das proteínas plasmáticas dos ovinos revelou 5 bandas distintas: albumina, α -globulina, β 1-globulina, β 2-globulina e γ -globulina.

Como na literatura são escassos os trabalhos com proteinograma de ovinos hípidos com idade semelhante aos animais deste estudo, utilizou-se como referência os valores encontrados nos animais antes das imunizações, ou seja, determinou-se intervalo de normalidade para cada fração no tempo zero (T0).

A concentração de albumina plasmática em T0 variou de 3,41-4,86 g/dL, com valor médio de 4,12 g/dL. A maioria dos valores encontrados durante todo protocolo de imunização permaneceu dentro dos limites, com exceção da terceira imunização, marcada por redução significativa em todos os grupos e todos os tempos avaliados (24 e 48 h). Não houve diferença estatística entre os 3 grupos experimentais (Tabela 1).

Os valores de normalidade estabelecidos para as α -globulinas variaram de 0,14 a 0,54 g/dL, com média de 0,31 g/dL (T0) [Tabela 2]. Houve aumento significativo na terceira imunização e seus respectivos tempos de coleta (24-48 h), com valores acima da normalidade nos 3 grupos: G1 (0,66 g/dL), G2 (0,62 g/dL) e G3 (0,65 g/dL).

A fração β -globulina se subdividiu em β 1 e β 2 globulina. Em T0, os valores de normalidade da β 1 foram de 0,44 a 1,05 g/dL, com média de 0,66 g/dL (Tabela 3), não sendo observada qualquer alteração significativa nesta fração. Por outro lado, houve aumento abrupto de β 2 em todos os grupos 48 h após a primeira imunização, comparado aos valores de referência estabelecidos [0,19-0,85 g/dL, com média de 0,37 g/dL] (Tabela 4).

Da terceira à sexta imunização houve elevada concentração da fração β 2, com diferença significativa entre o valor basal e os dias das inoculações dos imunógenos.

Os valores em T0 para a fração γ -globulina foram de 0,80 g/dL a 2,76 g/dL (Tabela 5). Na sexta imunização houve diferença significativa entre o G1 (controle) e os 2 grupos que receberam veneno (G2 e G3).

Tabela 1. Concentração plasmática de albumina (g/dL) de ovinos produtores de antisoro escorpiônico antes de iniciar o protocolo de imunização (T0) e em diferentes momentos da imunização adotada, com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3).

Grupos	T0	1ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	4,10*	5,08 ^B	5,02 ^{Bb}	3,32 ^A
G2- Veneno	4,14*	5,31 ^C	4,41 ^{Bab}	3,07 ^A
G3-Detoxif.	4,12*	5,51 ^B	3,97 ^{Ba}	3,34 ^A
	T0	2ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	4,10	3,65	3,94	3,00
G2- Veneno	4,14	4,43 ^B	3,94 ^{AB}	2,92 ^A
G3-Detoxif.	4,12	3,94	3,38	2,82
	T0	3ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	4,10*	2,73	2,65	2,93
G2- Veneno	4,14*	2,85	2,75	2,91
G3-Detoxif.	4,12*	3,11	3,40	2,81
	T0	4ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	4,10	3,94 ^B	3,91 ^B	3,20 ^A
G2- Veneno	4,14	3,71	3,14	3,45
G3-Detoxif.	4,12	3,29	3,38	3,57
	T0	5ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	4,10*	3,48	3,59	3,39
G2- Veneno	4,14*	3,18	3,18	3,48
G3-Detoxif.	4,12*	3,31	3,18	3,24
	T0	6ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	4,10*	3,89 ^{AB}	3,50 ^A	4,49 ^B
G2- Veneno	4,14*	2,91 ^A	2,94 ^A	4,28 ^B
G3-Detoxif.	4,12*	3,46 ^{AB}	2,79 ^A	3,88 ^B

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$. Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Tabela 2. Concentração plasmática de α -globulina (g/dL) de ovinos produtores de antisoro escorpiônico antes de iniciar o protocolo de imunização (T0) e em diferentes momentos da imunização adotada, com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3).

Grupos	T0	1ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,15 ^A	0,27 ^{AB}	0,39 ^B
G2- Veneno	0,31	0,24 ^A	0,31 ^{AB}	0,37 ^B
G3-Detoxif.	0,34	0,26	0,37	0,36
	T0	2ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,37 ^{AB}	0,22 ^A	0,51 ^B
G2- Veneno	0,31	0,21 ^A	0,32 ^A	0,55 ^B
G3-Detoxif.	0,34	0,21 ^A	0,29 ^A	0,58 ^B
	T0	3ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28*	0,57	0,66 ^b	0,56
G2- Veneno	0,31*	0,62	0,52 ^{ab}	0,56
G3-Detoxif.	0,34*	0,46	0,42 ^a	0,65
	T0	4ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,25 ^A	0,27 ^A	0,42 ^{Bb}
G2- Veneno	0,31	0,21 ^{AB}	0,29 ^B	0,21 ^{Aa}
G3-Detoxif.	0,34	0,18 ^A	0,24 ^{AB}	0,28 ^{Bab}
	T0	5ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,36	0,39	0,40
G2- Veneno	0,31	0,26	0,41	0,32
G3-Detoxif.	0,34	0,29	0,40	0,35
	T0	6ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,28	0,41	0,44	0,42
G2- Veneno	0,31	0,36	0,33	0,37
G3-Detoxif.	0,34	0,31	0,42	0,42

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$. Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Tabela 3. Concentração plasmática de β_1 -globulina (g/dL) de ovinos produtores de antisoro escorpiônico antes de iniciar o protocolo de imunização (T0) e em diferentes momentos da imunização adotada, com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3).

Grupos	T0	1ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,62*	0,43 ^A	0,51 ^{Aa}	0,83 ^B
G2- Veneno	0,73*	0,41	0,64 ^{ab}	0,75
G3-Detoxif.	0,63*	0,51 ^A	0,84 ^{Bb}	0,67 ^{AB}
	T0	2ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,62	0,85	0,69 ^{ab}	0,97
G2- Veneno	0,73	0,76	0,98 ^b	0,86
G3-Detoxif.	0,63	0,82	0,54 ^a	0,83
	T0	3ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,62	0,86	1,02 ^b	0,91
G2- Veneno	0,73	0,87	0,84 ^{ab}	0,90
G3-Detoxif.	0,63	0,70 ^A	0,67 ^{Aa}	0,92 ^B
	T0	4ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,62	0,59 ^A	0,78 ^B	0,81 ^{Bb}
G2- Veneno	0,73	0,51	0,69	0,55 ^a
G3-Detoxif.	0,63	0,56	0,65	0,59 ^a
	T0	5ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,62	0,71	0,77	0,71
G2- Veneno	0,73	0,56 ^A	0,79 ^B	0,68 ^{AB}
G3-Detoxif.	0,63	0,59	0,67	0,76
	T0	6ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,62	0,65	0,75	0,62
G2- Veneno	0,73	0,69	0,71	0,60
G3-Detoxif.	0,63	0,53	0,75	0,71

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$. Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Tabela 4. Concentração plasmática de β_2 -globulina (g/dL) de ovinos produtores de antisoro escorpiônico antes de iniciar o protocolo de imunização (T0) e em diferentes momentos da imunização adotada, com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3).

Grupos	T0	1ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,41	0,46 ^A	0,29 ^A	1,24 ^B
G2- Veneno	0,25	0,40 ^A	0,51 ^A	1,57 ^B
G3-Detoxif.	0,45	0,18 ^A	0,35 ^A	1,42 ^B
	T0	2ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,41	0,51 ^A	1,02 ^{ABab}	1,33 ^B
G2- Veneno	0,25	0,24 ^A	0,38 ^{Aa}	1,67 ^B
G3-Detoxif.	0,45	0,29 ^A	1,65 ^{Bb}	1,78 ^B
	T0	3ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,41*	1,48	1,44	1,25
G2- Veneno	0,25*	1,57	1,64	1,76
G3-Detoxif.	0,45*	1,05	1,13	1,35
	T0	4ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,41*	0,82 ^{Aa}	1,09 ^{AB}	1,28 ^B
G2- Veneno	0,25*	1,43 ^{ab}	1,51	1,41
G3-Detoxif.	0,45*	1,85 ^{ABb}	1,94 ^B	1,54 ^A
	T0	5ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,41*	1,10	1,23	1,14
G2- Veneno	0,25*	1,50	1,52	1,31
G3-Detoxif.	0,45*	1,61	1,59	1,75
	T0	6ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	0,41*	1,03 ^B	1,16 ^B	0,42 ^A
G2- Veneno	0,25*	1,46 ^B	1,61 ^B	0,28 ^A
G3-Detoxif.	0,45*	1,38 ^B	1,64 ^B	0,37 ^A

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$. Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

Tabela 5. Concentração plasmática de γ -globulinas (g/dL) de ovinos produtores de antisoro escorpiônico antes de iniciar o protocolo de imunização (T0) e em diferentes momentos da imunização adotada, com PBS (G1), veneno bruto (G2) e veneno detoxificado de *Tityus serrulatus* (G3).

Grupos	T0	1ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,27*	0,62	0,80	1,11
G2- Veneno	1,56*	0,66 ^A	1,06 ^{AB}	1,32 ^B
G3-Detoxif.	1,49*	0,88	1,39	1,13
Grupos	T0	2ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,27	1,30 ^B	0,86 ^{Aa}	0,99 ^{AB}
G2- Veneno	1,56	1,65 ^B	1,77 ^{Bb}	1,13 ^A
G3-Detoxif.	1,49	1,58 ^B	0,82 ^{Aa}	1,01 ^A
Grupos	T0	3ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,27	0,93	1,26	1,09
G2- Veneno	1,56	1,43	1,48	1,41
G3-Detoxif.	1,49	1,11	1,02	1,36
Grupos	T0	4ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,27	1,10	1,05	1,22
G2- Veneno	1,56	1,61	1,61	1,52
G3-Detoxif.	1,49	1,21	1,37	1,15
Grupos	T0	5ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,27	1,08	1,11	1,19
G2- Veneno	1,56	1,59	1,57	1,69
G3-Detoxif.	1,49	1,24	1,35	1,39
Grupos	T0	6ª Imunização	24 h	48 h
G1- Controle	1,27	0,89 ^a	1,12	0,98
G2- Veneno	1,56	1,77 ^b	1,60	1,65
G3-Detoxif.	1,49	1,15 ^{Ab}	1,27 ^{AB}	1,51 ^B

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os tempos de coleta (linhas) e seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$. Médias seguidas de * se diferem entre o momento zero e a imunização (linhas), submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, com $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

O traçado eletroforético, revelando 5 bandas distintas, foi semelhante ao encontrado em cordeiros mestiços saudáveis do nascimento ao desmame [32], além de ovelhas em diferentes fases fisiológicas (gestação, pós-parto, lactação e período seco) [26].

A hipoalbuminemia observada na terceira imunização possivelmente foi resultado da resposta inflamatória aguda pelo uso do adjuvante de Freund, uma vez que se trata de uma proteína de fase aguda negativa e sua concentração diminui frente às respostas inflamatórias [11,16,21]. O veneno de *T. serrulatus*, na sua forma bruta ou detoxificada, não foi capaz de induzir a liberação de mediadores inflamatórios nos animais, comportamento semelhante ao observado em cães [30] e ratos [27] após envenenamento experimental com a mesma espécie de escorpião.

A diminuição da albumina se relaciona com doenças hepáticas, gastrointestinais, má nutrição dos

animais, perda de sangue ou plasma [10], o que não ocorreu no presente estudo, uma vez que os animais se encontravam clinicamente saudáveis.

O aumento das α -globulinas coincidiu com o tempo de redução da albumina, reforçando que este foi decorrente da resposta inflamatória gerada pelo uso do adjuvante de Freund. Além disso, os valores acima da normalidade foram detectados nos 3 grupos, o que permite excluir alguma relação com o veneno escorpiônico.

Sabe-se que os adjuvantes atuam como reservatório de antígeno no tecido, permitindo a liberação de forma lenta e gradual, o que estimula a produção de anticorpos. Como inconveniente podem produzir efeitos colaterais indesejáveis devido a reação inflamatória local [5].

A fração α -globulina é composta por uma série de proteínas de fase aguda positiva, como glicoproteína ácida α_1 , ceruloplasmina, antitripsina α_1 , antiqumotripsina α_1 , α_2 macroglobulina e haptoglobina α , esta

última considerada uma das principais proteínas de fase aguda em ovinos e bovinos, podendo aumentar em até 100 vezes sua concentração depois do estímulo [10,14]. Assim, o aumento desta fração foi em função da elevação de uma dessas proteínas citadas anteriormente.

A não observação de alteração significativa da fração β_1 nos ovinos imunizados corrobora os resultados obtidos em outro estudo [30]. Ressalta-se que o aumento abrupto de β_2 nos 3 grupos experimentais (acima de 300% do valor inicial) 48 h após a primeira imunização, exclui ação do veneno escorpiônico (bruto ou detoxificado), uma vez que o grupo controle exibiu o mesmo padrão.

A elevada concentração da fração β_2 da terceira à sexta imunização, possivelmente ocorreu em decorrência do processo inflamatório gerado pelas imunizações, com elevação da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelo fígado. Sabe-se que existem várias proteínas na fração beta-globulina, tais como proteína do complemento (C3 e C4), proteína C reativa, ferritina e fibrinogênio, todas positivas de fase aguda [1,10,11].

Em ruminantes o fibrinogênio é um importante indicativo de resposta inflamatória [14] e, como o proteinograma foi realizado com plasma, possivelmente o aumento encontrado nesta fração proteica foi em função da elevação dos valores deste elemento. Este achado não indica ação do veneno escorpiônico, diferindo de um estudo com ratos em que se observou aumento da síntese de proteínas de fase aguda, sob ação nas vias do sistema complemento após inoculação do veneno de *T. serrulatus* [4].

Para a fração γ -globulinas, apesar de se observar aumento na sexta imunização nos grupos que receberam veneno, os valores permaneceram dentro do limite de referência para a espécie ovina até 48 h após o último reforço.

CONCLUSÕES

O veneno de *Tityus serrulatus* detoxificado com glutaraldeído não promoveu alterações nas proteínas plasmáticas fracionadas (albumina, α , β e γ -globulinas) de ovinos submetidos a um ciclo de imunização na produção de antisoro escorpiônico, podendo, possivelmente, ser utilizado como imunógeno, o que aumentaria a sobrevivência dos animais produtores.

MANUFACTURERS

¹Fort Dodge Saúde Animal Ltda. Campinas, SP, Brazil.

²Vallée S.A. Montes Claros, MG, Brazil.

³Difco Laboratories Incorporated. Franklin Lakes, NJ, USA.

⁴Laboratório de Imunoquímica de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Belo Horizonte, MG, Brazil.

⁵Branson Ultrasonics Corporation. Danbury, CT, USA.

⁶Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas S.A. Juiz de Fora, MG, Brazil.

⁷Greiner Bio-One Brasil. Americana, SP, Brazil.

⁸CentriBio. Hangzhou, ZJ, China.

⁹Eppendorf do Brasil Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

¹⁰CELM - Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos. Barueri, SP, Brazil.

¹¹Global. Cravinhos, SP, Brazil.

Funding. This Project was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Acknowledgements. The authors would like to thank Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Minas Gerais, Brazil.

Ethical approval. All procedures, treatments and animal care were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation at the Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (protocol n° 202/2012).

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content.

REFERENCES

- 1 Allison R. W. 2012. Laboratory Evaluation of Plasma and Serum Proteins. In: Thrall M.A., Weiser G., Allison R.W. & Campbell T.W. (Eds). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. 2nd edn. Philadelphia: John Wiley & Sons, pp.460-475.
- 2 Almeida F.M., Pimenta A.M., Figueiredo S.G., Santoro M.M., Martin-Eauclaire M.F., Diniz C.R. & Lima M.E. 2002. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon*. 40(7): 1041-1045.
- 3 Becerril B., Marangoni S. & Possani L.D. 1997. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*. 5(6): 821-835.
- 4 Bertazzi D.T., Assis-Pandochi A.I., Azzolini A.E., Talhaferro V.L., Lazzarini M. & Arantes E.C. 2003. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system *in vivo*. *Toxicon*. 41(4): 501-508.

- 5 Broderson J.R. 1989. A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Laboratory Animal Science*. 39(5): 426-434.
- 6 Campolina D., Guerra C.M.N., Guerra S.D., Dias M.B. & Andrade Filho A. 2013. Escorpionismo. In: Andrade Filho A., Campolina D. & Dias M.B. (Eds). *Toxicologia na Prática Clínica*. 2.ed. Belo Horizonte: Folium, pp.295-303.
- 7 Casella-Martins A., Ayres L.R., Burin S.M., Morais F.R., Pereira J.C., Faccioli L.H., Sampaio S.V., Arantes E.C., Castro F.A. & Pereira-Crott L.S. 2015. Immunomodulatory activity of *Tityus serrulatus* scorpion venom on human T lymphocytes. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 21(46): 1-8.
- 8 Chávez-Olortegui C., Kalapothakis E., Ferreira A.M.B.M., Ferreira A.P. & Diniz C.R. 1997. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*. 35(2): 213-221.
- 9 Chippaux J.P. & Goyffon M. 1998. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. 36(6): 823-846.
- 10 Eckersall P.D. 2008. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. *Comparative Haematology International*. 5: 93-97.
- 11 Eckersall D. 2008. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Eds). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5th edn. San Diego: Academic Press, pp.117-148.
- 12 Ferreira M.G., Duarte C.G., Oliveira M.S., Castro K.L.P., Teixeira M.S., Reis L.P.G., Zambrano J.A., Kalapothakis E., Michel A.F.R.M., Soto-Blanco B., Chavez-Olortegui C. & Melo M.M. 2016. Toxicity of crude and detoxified *Tityus serrulatus* venom in anti-venom-producing sheep. *Journal of Veterinary Science*. 17(4): 467-477.
- 13 Gazarian K.G., Gazarian T., Hernández R. & Possani L.D. 2005. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine*. 23(26): 3357-3368.
- 14 Gonzalez F.H.D., Martínez-Subiela S. & Cerón J.J. 2007. Haptoglobina em ruminantes: generalidades y posibles aplicaciones clinicas. *Anales de Veterinaria de Murcia*. 23: 5-17.
- 15 Gwee M.C.E., Gopalakrishnakone P., Cheah L.S., Wong P.T.H., Gong J.P. & Kini R.M. 1996. Studies on venom from the Black scorpion *Heterometrus longimanus* and some other Scorpions species. *Journal of Toxicology*. 15: 37-57.
- 16 Ingenbleek M. & Young V. 1994. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Annual Review of Nutrition*. 14: 495-533.
- 17 Machado R.A.A., Alvarenga L.M., Tavares C.A.P., Molina F. & Chávez-Olortegui C. 2004. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon*. 44(3): 233-241.
- 18 Marcussi S., Arantes E.C. & Soares A.M. 2011. *Escorpiões - Biologia, Envenenamento e Mecanismos de Ação de suas Toxinas*. São Paulo: FUNPEC Editora, pp.33-107.
- 19 Meki A.R.M.A. & El-Dean Z.M.M. 1998. Serum interleukin-1 β , interleukin-6, nitric oxide and α 1-antitrypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon*. 36(12): 1851-1859.
- 20 Mendes T.M., Dias F., Horta C.C.R., Pena I.F., Arantes E.C. & Kalapothakis E. 2008. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. *Toxicon*. 52(7): 787-793.
- 21 Murata H., Shimada N. & Yoshioka M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*. 168(1): 28-40.
- 22 Pessini A.C., Souza A.M., Faccioli L.H., Gregório Z.M.O. & Arantes E.C. 2003. Time course of acute phase reaction induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. *International Immunopharmacology*. 3(5): 765-774.
- 23 Pessini A.C., Santos D.R., Arantes E.C. & Souza G.E.P. 2006. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Toxicon*. 48(5): 556-566.
- 24 Petricevich V.L., Hernández C.A., Coronas F.I.V & Possani L.D. 2007. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon*. 50(5): 666-675.
- 25 Petricevich V.L. 2010. Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators of Inflammation*. 2010: 903295. Doi: 10.1155/2010/903295.
- 26 Piccione G., Alberghina D., Marafioti S., Giannetto C., Casella S., Assenza A. & Fazio F. 2012. Electrophoretic serum protein fraction profile during the different physiological phases in Comisana ewes. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(4): 591-595.
- 27 Pinto M.C.L., Borboleta L.R., Melo M.B. & Melo M.M. 2010. *Tityus fasciolatus* envenomation induced cardio-respiratory alterations in rats. *Toxicon*. 55(6): 1132-1137.

- 28 **Possani L.D., Becerril B., Delepierre M. & Tytgat J. 1999.** Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *European Journal of Biochemistry*. 264 (2): 287-300.
- 29 **Possani L.D., Merino E., Corona M., Bolivar F. & Becerril B. 2000.** Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie*. 82(9-10): 861-868.
- 30 **Ribeiro E.L. & Melo M.M. 2012.** Proteínas do soro sanguíneo de cães inoculados com veneno de *Tityus serrulatus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 64(1): 217-220.
- 31 **Sampaio I.B.M. 2002.** *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, pp.189-202.
- 32 **Silva D.F.M., Costa J.N., Araújo A.L. & Costa Neto A.O. 2010.** Proteinograma sérico de cordeiros mestiços (Santa Inês x Dorper) do nascimento até o desmame: efeito do desenvolvimento etário e do monitoramento da ingestão de colostro. *Ciência Animal Brasileira*. 11(4): 794-805.
- 33 **Zoccal K.F., Bitencourt C.S., Secatto A., Sorgi C.A., Bordon K.C.F., Sampaio S.V., Arantes E.C. & Faccioli L.H. 2011.** *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. *Toxicon*. 57(7-8): 1101-1108.