

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
RAFAEL LUIZ PEREIRA

**EFEITOS INFLAMATÓRIOS DE VENENOS DE ESCORPIÕES DO GÊNERO *TITYUS*  
(SCORPIONES, BUTHIDAE) E SUA MODULAÇÃO PELO FATOR ATIVADOR DE  
PLAQUETAS (PAF).**

Mogi das Cruzes, SP  
2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

RAFAEL LUIZ PEREIRA

**EFEITOS INFLAMATÓRIOS DE VENENOS DE ESCORPIÕES DO GÊNERO  
*TITYUS* (SCORPIONES, BUTHIDAE) E SUA MODULAÇÃO PELO FATOR  
ATIVADOR DE PLAQUETAS (PAF)**

Dissertação apresentada ao mestrado em  
Biotecnologia da Universidade de Mogi das  
Cruzes como parte dos requisitos para obtenção  
do título de mestre em biotecnologia

Área de Concentração: Biológica

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Fábio Henrique Kwasniewski

Mogi das Cruzes, SP  
2007

FINANCIAMENTO:

**FAEP** - Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Pereira, Rafael Luiz

Efeitos inflamatórios de venenos de escorpiões do gênero *Tityus* (Scorpiones, Buthidae) e sua modulação pelo fator ativador de plaquetas (PAF) / Rafael Luiz Pereira. -- 2007.

61 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2007

Área de concentração: Ciências biológicas

Orientador: Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski

1. Escorpião - Veneno 2. Fator Ativador de Plaquetas (PAF) – Veneno 3. Bioprospecção 4. *Tityus bahiensis* 5. *Tityus serrulatus* I. Título II. Kwasniewski, Fábio Henrique

CDD 615.942

**ATAS**

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**

Às quatorze horas e trinta minutos do dia vinte e sete de abril de dois mil e sete, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "EFEITOS INFLAMATÓRIOS DE VENENOS DE ESCORPIÕES DO GÊNERO *TITYUS* (SCORPIONES, BUTHIDAE), E SUA MODULAÇÃO PELO FATOR ATIVADOR DE PLAQUETAS (PAF)" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Rafael Luiz Pereira**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Fábio Henrique Kwasniewski e Ivarne Luis dos Santos Tersariol da Universidade de Mogi das Cruzes e Stella Regina Zamuner da Universidade do Vale do Paraíba, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou a candidata. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO  
(aprovado(a)/reprovado(a))


por

UNANIMIDADE  
(unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 27 de abril de 2007

Comissão Examinadora

Julgamento

  
Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski

APROVADO  
(aprovado(a)/reprovado(a))

  
Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol

Aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

  
Prof. Dr. Stella Regina Zamuner

Aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Silvana de Fátima Santos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Silvana de Fátima Santos, ao meu amigo Washington Wanderley dos Santos e a todos meus amigos do laboratório de Imunobiologia e Bioprospecção do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB).

À Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira, do laboratório de Artrópodes do Instituto Butanta, pela valiosa colaboração ao projeto.

Ao laboratório de Artrópodes do Instituto Butanta por ter cedido os venenos utilizados.

## RESUMO

No Brasil, o escorpionismo, é um problema de saúde pública, desencadeado principalmente pelo *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo, família Buthidae), envolvido em casos severos e fatais de envenenamento, em especial quando as crianças são as vítimas. A maioria dos dados clínicos e experimentais sobre o escorpionismo em nosso país referem-se a estudos com o *T. serrulatus*. Uma outra espécie de nossa fauna, o *T. bahiensis* (escorpião marrom, família Buthidae), também é causadora de acidentes mas pouca informação encontra-se disponível em relação ao envenenamento (experimental ou humano) induzido por esse animal. Os venenos de ambos contêm principalmente toxinas que atuam sobre canais iônicos, que respondem por grande parte dos sintomas associados ao escorpionismo. Sinais de inflamação, como edema pulmonar e uma quantidade aumentada de citocinas presente no soro são também características do escorpionismo. Foi ainda sugerido que o fator ativador de plaquetas (PAF) participe do escorpionismo, principalmente da injúria pulmonar. No presente estudo, comparamos o edema de pata e o influxo celular para a cavidade peritoneal de camundongos envenenados com a peçonha do *T. serrulatus* e do *T. bahiensis* (vTs e vTb respectivamente). A participação do PAF nesses eventos inflamatórios foi também avaliada, utilizando-se um antagonista do PAF, o WEB-2170 (3 mg/kg ip, 30 minutos antes do envenenamento). A administração intraplantar do vTs ou do vTb (ambos na dose de 80 µg/kg) promoveu uma reação edematogênica similar em intensidade e cinética temporal, mas apenas o edema induzido pelo vTs foi inibido pelo antagonismo do PAF, o que não teve efeito sobre o edema induzido pelo vTb. A administração intraperitoneal do vTs aumentou o número de leucócitos totais e de Mono após 6 horas do envenenamento, enquanto que o vTb induziu a um aumento no número de PMN. Após 24 horas do envenenamento, encontramos números reduzidos de leucócitos totais e Mono nas cavidades estimuladas pelo vTs, enquanto que naquelas estimuladas pelo vTb o número de PMN permaneceu elevado. O antagonismo do PAF não modificou o panorama no número de células totais, Mono e PMN nas cavidades peritoneais 6 horas após o envenenamento com o vTs mas, no envenenamento de 24 horas levou a uma diminuição ainda mais expressiva no número total de leucócitos e de Mono, seguido de um aumento no número de PMN. Em relação ao envenenamento de 6 horas com vTb o antagonismo do PAF reduziu o número total de leucócitos e de Mono na cavidade mas não afetou o de PMN; não houve alteração significativa na ação do vTb após 24 horas na vigência do antagonismo do PAF. Concluímos que os venenos estudados têm importante ação edematogênica e podem induzir migração de células para a cavidade peritoneal, ou mesmo modular o estado de ativação das células residentes e/ou recém chegadas ao peritônio, embora diferenças importantes tenham sido detectadas em relação às ações de ambos os venenos. O PAF participa do edema induzido apenas pelo Vts, mas participa da migração e provavelmente da ativação celular induzidas pelos dois venenos.

**Palavras Chave:** Inflamação; Fator Ativador de Plaquetas (PAF); *Tityus*



## ABSTRACT

Human envenomation induced by scorpions is considered a public health problem in Brazil, and *Tityus serrulatus* (yellow scorpion, Buthidae family) is involved in severe and fatal cases, especially when infants are the victims. The majority of experimental and clinical data available in our country were obtained from *T. serrulatus* venom or stung. *T. bahiensis* is another scorpion (brown scorpion, Buthidae family) found in Brazilian fauna, but very few information is known about envenomation (experimental or clinical) induced by this animal. The venoms of both species contains mainly toxins with action on ion channels, which are responsible for the majority of the poisoning symptoms. Furthermore, signs of inflammation, such as pulmonary edema and high amount of inflammatory cytokines in serum, are also observed in scorpionism. Platelet-activating factor (PAF), a potent lipid mediator of the inflammatory process, was also suggested as participant of envenomation, in which it may contributes to the development of acute lung injury. In the present study we compared the paw edema and cellular migration to peritoneal cavity in mice challenged by venom from *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* (Tsv and Tbv respectively). The role of PAF in such inflammatory events was also studied by the pretreatment of animals with a PAF-receptor antagonist, WEB-2170. Intraplantar injection of both venoms (80 µg/kg) induced a similar edematogenic reaction, in relation to intensity and temporal kinetic. Tsv-induced edematogenic reaction was reduced when mice were pretreated with WEB-2170 (3 mg/kg ip, 30 minutes before venom challenge), but PAF-antagonism did not modify paw edema induced by Tbv. Concerning peritoneal cell population, challenge with Tsv increased both, total leukocyte and Mono counts 6 hours after the envenomation, whereas Tbv induced PMN accumulation only. Following 24 hours after envenomation by Tsv, total leukocytes and Mono numbers were reduced in peritoneal cavity, and PMN accumulation induced by Tbv was still present. The pretreatment of the animals with PAF-antagonist did not modify leukocyte and Mono accumulation in peritoneal cavity 6 hours after Tsv-envenomation, but when cellular counts were performed 24 hours after, the treatment induced a more intense fall in both cell counts followed by PMN increasing number. Regarding 6 hours Tbv-envenomation, PAF antagonist induced a reduction in numbers of total leukocyte and Mono, without effect on PMN accumulation; in 24 hours Tbv-envenomation there was no effect of PAF-antagonist. We conclude that both venoms have important edematogenic activity and can induce cellular infiltration, or even probably modulate the state of activity of resident and/or recently migrated cells, although important differences were detected between such actions induced by Tsv or Tbv. PAF have a role only in Tsv-induced paw edema, but participates of cellular migration and probably cellular activation induced by both venoms.

**Key Words:** Inflammation; Platelet Activator Factor (PAF); *Tityus*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Diferença de coloração entre os <i>T. serrulatus</i> e os <i>T. bahiensis</i>                                 | 13 |
| <b>Figura 2</b> – o processo de diapedese   | 19 |
| <b>Figura 3</b> – via de produção do fator ativador de plaquetas (PAF)  | 20 |
| <b>Figura 4</b> – Avaliação do edema de pata induzido pelos venenos dos escorpiões  | 25 |
| <b>Figura 5</b> – desencadeamento do envenenamento  | 26 |
| <b>Figura 6</b> – Efeito edematogênico dos venenos dos escorpiões <i>T. serrulatus</i> e <i>T. bahiensis</i>                    | 28 |
| <b>Figura 7</b> – Participação do PAF no efeito edematogênico do <i>T. serrulatus</i> (A) e do <i>T. bahiensis</i> (B)          | 29 |
| <b>Figura 8</b> – Análise quantitativa e qualitativa da população celular peritoneal após a administração do vTs                | 31 |
| <b>Figura 9</b> – Análise quantitativa e qualitativa da população celular peritoneal após a administração do vTb                | 32 |
| <b>Figura 10</b> – Efeito do WEB-2170, antagonista do PAF, sobre o número de células na cavidade peritoneal estimulada pelo vTs | 34 |
| <b>Figura 11</b> – Efeito do WEB-2170, antagonista do PAF, sobre o número de células na cavidade peritoneal estimulada pelo vTb | 35 |

# SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 11 |
| 1.1 Epidemiologia dos acidentes com escorpiões no Brasil. ....   | 11 |
| 1.2 Composição do veneno escorpiônico. ....  | 13 |
| 1.3 Efeitos do veneno escorpiônico no organismo e fisiopatologia dos acidentes. ....   | 15 |
| 1.4 A inflamação como uma das características do escorpionismo. ....   | 16 |
| 2. OBJETIVOS .....   | 23 |
| 2.1 Gerais .....   | 23 |
| 2.2 Específicos .....  | 23 |
| 3. MÉTODO .....  | 24 |
| 3.1 Animais .....  | 24 |
| 3.2 Obtenção e armazenamento dos venenos dos escorpiões <i>T. bahiensis</i> e <i>T. serrulatus</i> . ....  | 24 |
| 3.3 Avaliação do edema de pata induzido pelos venenos dos escorpiões. ....   | 24 |
| 3.4 Avaliação do número de células da cavidade peritoneal. ....  | 25 |
| 3.5 Avaliação da participação do PAF sobre as ações dos venenos. ....  | 26 |
| 3.6 Análise estatística. ....  | 27 |
| 4. RESULTADOS. ....  | 28 |
| 4.1 Efeito edematogênico dos venenos dos escorpiões <i>T. serrulatus</i> e <i>T. bahiensis</i> . ....  | 28 |
| 4.2 Participação do PAF no edema induzido pelos venenos dos escorpiões. ....   | 29 |
| 4.3. Efeito dos venenos dos escorpiões <i>T. serrulatus</i> e <i>T. bahiensis</i> sobre o número de células da cavidade peritoneal .....   | 30 |
| 4.4. Participação do PAF no efeito dos venenos dos escorpiões <i>T. serrulatus</i> e <i>T. bahiensis</i> sobre o número das células da cavidade peritoneal <i>T. bahiensis</i> sobre o número das células da cavidade peritoneal. .... | 33 |
| 5. DISCUSSÃO .....   | 36 |
| 6. CONCLUSÕES .....  | 44 |

REFERÊNCIAS ..... 45

APÊNDICE ..... 59

# 1 INTRODUÇÃO

Os escorpiões são artrópodos pertencentes à ordem Scorpiones, estão bem adaptados a condições extremas de sobrevivência, e ocupam as regiões temperadas e tropicais do mundo. Eles são animais peçonhentos, o que significa que possuem um aparelho inoculador de veneno, pelo qual injetam venenos em cuja composição encontra-se água, sais, pequenas proteínas e peptídeos. Por serem peçonhentos, algumas vezes com venenos poderosos, são importantes como animais envolvidos em acidentes com seres humanos. Entretanto, entre as 1.500 espécies distribuídas em 16 famílias, apenas 25, das 550 pertencentes à família Buthidae, são considerados de importância médica pois seus venenos contêm as toxinas mais potentes entre todos os outros (LORET e HAMMCOCK, 2001).

## 1.1 Epidemiologia dos acidentes com escorpiões no Brasil

Acidentes com escorpiões constituem um problema de saúde pública no Brasil, devido à fatores, como sua alta incidência em determinadas regiões, e a potencialidade em provocar envenenamentos graves, que muitas vezes podem levar ao óbito. As espécies relacionadas aos acidentes humanos graves e fatais pertencem à família Buthidae que, no Brasil, é representada principalmente pelo gênero *Tityus*. Representantes desse gênero estão distribuídos em diversas regiões do país, e alguns estão envolvidos em acidentes. Na região amazônica tem sido notificados acidentes com as espécies *T. cambridgei* e *T. metuendus*, na região centro-oeste com as *T. charreyronii* e *T. fasciolatus*, na nordeste com a *T. stigmurus* e, na região sudeste, as espécies *T. serrulatus* e *T. bahiensis*, sendo que esta última também pode ser encontrada na região sul. Devido à rápida reprodução e habilidade de dispersão da espécie *T. serrulatus*, sua distribuição geográfica tem sido consideravelmente ampliada nas últimas décadas (EICKSTEDT *et al*, 1996; LOURENÇO *et al*, 1996). Este é um fato preocupante, pois esta espécie é a principal causadora de óbitos em acidentes com escorpiões no Brasil (CUPO *et al*, 2003). Outra espécie importante no Estado de São Paulo é a *T. bahiensis*, considerada, até 1996, como a maior causadora de acidentes (EICKSTEDT *et al*, 1996).

Dados epidemiológicos acerca do escorpionismo no Brasil têm como principal fonte o Ministério da Saúde, através das secretarias de Saúde e seus sistemas de vigilância epidemiológica, que notificaram entre 1988 e 1989 7.544 casos, com 72 óbitos, sendo que 96% desses óbitos ocorreram nas regiões Sudeste e Nordeste. Nos anos de 1990 a 1993 foram notificados 24.846 casos (três vezes o número anterior), com 143 óbitos e taxa de letalidade de 0,58%, maior do que a observada em acidentes ofídicos. Há de se ressaltar que 82% dos óbitos acometem indivíduos de até 14 anos, considerados pois como o grupo de risco, com taxa de mortalidade pode chegar a 1% (EICKSTEDT *et al*, 1996; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Apesar do acima descrito, devemos considerar que pode haver falhas nos dados recolhidos devido a vários fatores como, por exemplo, o fato de muitos pacientes não procurarem atendimento médico, ou por não terem acesso a serviços de saúde, ou porque o acidente foi leve, ou ainda devido à automedicação (CUPO *et al*, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Além disso, é bastante provável que a maioria dos profissionais da área da saúde não estejam capacitados para o atendimento correto dos acidentados com animais peçonhentos, e nem para a notificação adequada.

Ainda que o número de acidentes seja elevado, e potencialmente perigosos, deve-se destacar que apenas na minoria dos casos as espécies envolvidas são identificadas. De todos os acidentes fatais, apenas em 4,2% dos casos o animal causador foi identificado, sendo o *T. serrulatus* o agente descrito. Nos restantes 95,8% dos casos não há referência sobre o gênero e a espécie do escorpião e, portanto, não se deve descartar o envolvimento de outras espécies em acidentes letais (CUPO *et al*, 2003; EICKSTEDT *et al*, 1996). Considerando os acidentes no Estado de São Paulo, uma característica de fácil observação que pode ajudar na identificação das espécies causadoras de um acidente é a sua coloração, sendo o *T. serrulatus* denominado de escorpião amarelo, e o *T. bahiensis* de escorpião marrom, como mostram as fotografias abaixo (Figura 1).



**Figura 1:** Diferença de coloração entre os *T. serrulatus*(A) e os *T. bahiensis*(B). Messas e Candido (2007).

## 1.2 Composição do veneno escorpiónico

O veneno dos escorpiões é uma mistura de polipeptídeos, cujo número em todas as diferentes espécies pode chegar a 100.000 (POSSANI *et al*, 2000). De acordo com a revisão de Zhijian *et al* (2006), as toxinas até hoje descritas podem ser classificadas por diferentes critérios. Caso seja levado em conta o peso molecular, temos as toxinas de cadeia curta e as de cadeia longa; de acordo com a atividade em diferentes animais, são descritas as toxinas específicas para insetos, para mamíferos, e para crustáceos; levando-se em conta o seu mecanismo de ação, encontramos as neurotoxinas e as citotoxinas e, finalmente, de acordo com as pontes dissulfeto, podemos caracterizá-las entre as que possuem pontes dissulfeto e aquelas que não as possuem. As toxinas com pontes dissulfeto podem ser separadas em quatro grupos levando-se em conta a sua seletividade por canais iônicos, e temos: toxinas que afetam canais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Cl}^-$ .

As toxinas mais caracterizadas e conhecidas são as que atuam sobre os canais de  $\text{Na}^+$ , e que fazem parte das antimamíferos e antiinsetos. As primeiras são subdivididas em toxinas do tipo  $\alpha$  ou  $\beta$ . As toxinas  $\alpha$  atuam ligam-se ao sítio 3 dos canais de  $\text{Na}^+$  diminuindo a sua desativação e prolongando o potencial de ação; já as toxinas do tipo  $\beta$  atuam no sítio 4, ativando os canais de  $\text{Na}^+$ , portanto, ambas aumentando a permeabilidade da membrana a esse íon (revisto por DE LIMA e MARTIN-EAUCCLAIRE, 1995; GWEE *et al*, 2002). As

antiinsetos são classificadas em 2 famílias, as toxinas inseto-específicas excitatórias e as toxinas inseto-específicas depressivas. Ambas atuam sobre os canais de  $\text{Na}^+$  das células nervosas e, enquanto as excitatórias induzem uma paralisia convulsiva contráctil dos insetos, as depressivas levam a uma paralisia flácida seguida de breve convulsão, também por ação nos canais de  $\text{Na}^+$  das células nervosas (revisto por ZHIJIAN *et al*, 2006).

As toxinas que bloqueiam os canais de  $\text{K}^+$  contribuem para a despolarização das células, o que favorece a liberação de mediadores nas terminações nervosas (DE LA VEGA e POSSANI, 2004). Esse grupo de toxinas tem recebido a adição de vários representantes e, baseados em seu peso molecular e locação de cisteínas, podem ser divididas em 4 famílias:  $\alpha$ -KTx,  $\beta$ -KTx,  $\gamma$ -KTx e  $\kappa$ -KTx (TYTGAT *et al*, 1999; NIRTHANAN *et al*, 2005). Foram descritas toxinas que bloqueiam canais de  $\text{Cl}^-$  em células epiteliais de camundongos, e as que interagem com os canais de  $\text{Ca}^{++}$ , atuam sobre os canais intracelulares e levam à liberação de  $\text{Ca}^{++}$  ou então diminuem a atividade dos canais de  $\text{Ca}^{++}$  do tipo T (revisto por ZHIJIAN *et al*, 2006). Uma dessas toxinas que atuam sobre os canais de  $\text{Ca}^{++}$ , a IpTxi, isolada do veneno do escorpião *Pandinus imperator*, tem a sua atuação provavelmente devido a um mecanismo indireto, causada pela liberação de um ácido graxo devido a sua atividade de fosfolipase  $\text{A}_2$  (ZAMUDIO *et al*, 1997). Esse fato abre uma possibilidade, até o momento pouco explorada, de que venenos de escorpiões contenham fosfolipases. Ao menos uma fosfolipase  $\text{A}_2$  foi isolada por Valdez-Cruz *et al* (2004) do veneno do *Anuroctonus phaiodactylus*.

Além das toxinas que possuem pontes dissulfeto e atuam sobre os canais iônicos, de alguns anos para cá têm sido descritas toxinas peptídicas desprovidas de pontes dissulfeto, que funcionalmente podem exercer diversas ações como, por exemplo, potencialização da bradicinina, função antimicrobiana, sinalização intracelular e de imunomodulação entre outras (ZHIJIAN *et al*, 2006).

O primeiro componente tóxico isolado do veneno do *T. serrulatus* foi a TsTx (*tityustoxin*) que, de acordo com Diniz *et al* (1974), possui ação periférica por induzir a liberação de acetilcolina. No entanto, posteriormente foi demonstrado que não se tratava de uma toxina, mas sim de uma coleção de várias proteínas, e, assim, sua atividade biológica deve ser interpretada como a ação conjunta dos peptídeos que a compõe (Arantes e cols., 1992). Ao longo dos anos, diversos pesquisadores vêm purificando toxinas presentes no veneno do *T. serrulatus*, porém, a nomenclatura das toxinas encontradas continua controversa criando uma confusão de nomes e símbolos para designá-las (BECERRIL *et al*, 1997). Apesar disso, segundo a revisão de Possani *et al* (1992), os principais componentes tóxicos encontrados no veneno do *T. serrulatus* são as toxinas gama, III-X e IV-5. A toxina gama



apresenta homologia de 95% da sua constituição de aminoácidos com as principais toxinas encontradas nos venenos do *T. bahiensis* e *T. stigmurus* (BECERRIL *et al*, 1996). No veneno do escorpião *T. serrulatus* foram também encontradas toxinas com atividade sobre canais de  $K^+$  (BLAUSTEIN *et al*, 1991) e, entre as toxinas desprovidas de pontes dissulfeto, encontrou-se ao menos uma, o peptídeo T, cuja atividade é a potencialização da ação da bradicinina (FERREIRA *et al*, 1993).

### **1.3 Efeitos do veneno escorpiônico no organismo e fisiopatologia dos acidentes**

A maioria dos efeitos farmacológicos induzidos pelas toxinas escorpiônicas antimamíferos, são devidos às suas ações nos canais de  $Na^+$  e subsequente despolarização de membranas excitáveis do organismo. Sua atuação nas terminações nervosas pós-ganglionares dos sistemas nervoso simpático e parassimpático, e também da medula da supra-renal, leva à liberação maciça de catecolaminas e acetilcolina que, atuando em diversos sítios do organismo, são responsáveis pela maioria dos sintomas do envenenamento (DINIZ *et al*, 1974; FREIRE-MAIA, 1995).

A rápida absorção e distribuição nos tecidos tornam o envenenamento por escorpiões uma situação de extrema emergência (NUNAN *et al*, 2003). De acordo com os resultados obtidos em camundongos, por Revelo *et al* (1996), o veneno é completamente absorvido do ponto de injeção na pele após 2 horas, alcançando o nível máximo no soro entre 15 a 30 minutos da injeção. Nos rins e fígado a concentração máxima do veneno é alcançada em 15 minutos, e nos pulmões, coração e baço em 30 minutos; passadas 8 horas pouco veneno foi detectado em todos os tecidos citados. Um estudo conduzido em ratos por Santana *et al* (1996), mostrou resultados similares aos descritos acima e, ainda, que devido à sua grande afinidade pelos tecidos do organismo, a sua eliminação ocorre lentamente.

Após a injeção do veneno podem ser encontrados no local um halo eritematoso e edema, além de dor. Estes últimos foram estudados por Chen *et al* (2002) e Nascimento Jr *et al* (2005) utilizando venenos de dois escorpiões diferentes da família Buthidae, o *Buthus martensi* e o *T. serrulatus* respectivamente. De maneira semelhante, esses sinais podem ser também encontrados em vítimas de acidentes com escorpiões (HOREN, 1972; WILSON,

1987). Estes sinais indicam que os venenos de escorpiões desta família podem induzir reações inflamatórias locais.

Os acidentes com escorpiões variam de leves a graves, passando pelo moderado. Basicamente, o que os diferencia é a presença de efeitos sistêmicos nos moderados a graves. Nos acidentes leves são relatadas as sensações de queimação, agulhadas e dor, cuja intensidade aumenta com a palpação e pode irradiar-se por todo o membro acometido; com frequência são notadas também parestesias e sudorese. Nos acidentes classificados como moderados a graves podem ocorrer diversas manifestações clínicas sistêmicas como: salivação, lacrimação, midríase, piloereção, taquicardia, arritmias cardíaca e respiratória, desidratação, sonolência, agitação, sudorese, vômitos, hipertensão ou hipotensão arterial, hipertermia, hiperglicemia e edema pulmonar, entre outras (FREIRE-MAIA e CAMPOS, 1989; FREIRE-MAIA *et al*, 1994; FREIRE-MAIA 1995). Os sintomas mais relacionados ao óbito são o edema pulmonar e o choque cardio-respiratório (BUCARETCHI *et al*, 1995). Muitos desses sinais são encontrados em animais de experimentação após a administração do veneno do escorpião *T. serrulatus* (FREIRE-MAIA *et al*, 1974; FREIRE-MAIA e MATOS, 1993; PETRICEVICH e PEÑA, 2002). Adicionalmente, são descritos achados laboratoriais como o aumento de enzimas cardíacas e leucocitose no envenenamento humano (BUCARETCHI *et al*, 1995; AMITAI *et al*, 1998). Embora o que foi descrito acima refira-se ao envenenamento humano ou experimental com o veneno do *T. serrulatus*, o mesmo pode ser relatado quanto ao veneno de escorpiões de importância médica encontrados em outras regiões do mundo (ISMAIL *et al*, 1972; ISMAIL *et al*, 1973; ISMAIL *et al*, 1980; GOYFFON *et al*, 1982; CURRY *et al*, 1984; SOFER e GUERON, 1988; BAWASKAR e BAWASKAR, 1994; DEHESA-DÁVILA e POSSANI, 1994; DESHPANDE *et al*, 1999).

#### **1.4 A inflamação como uma das características do escorpionismo**

Há fortes indícios de que processos inflamatórios local e sistêmico são ocasionados pelo veneno dos escorpiões do gênero *Tityus*. Deve ser ressaltado que as evidências descritas aqui são relacionadas ao envenenamento pelo *T. serrulatus* (no Brasil) ou pelo *T. discrepans* (na Venezuela). Um desses indícios, é a sensação de dor e formação do edema no local da picada ou injeção (como descrito acima). O edema pode ainda ter estabelecimento longínquo,

edema pulmonar, acreditando-se que este possa ter origem cardiogênica e inflamatória (revisto por FREIRE-MAIA 1995). O edema é um processo que resulta do acúmulo de líquido, e ocorre quando há um desequilíbrio no balanço do fluido intersticial. A equação de Starling generaliza que o equilíbrio dos fluidos depende do balanço da pressão osmótica e hidrostática envolta dos capilares. Conseqüentemente qualquer fator que aumente a pressão oncótica fora dos vasos, ou reduza a pressão oncótica no sangue (p.ex. estados de baixa osmolaridade no sangue devido à cirrose) poderá causar edema (MONAHAN E NEIGHBORS, 1998; THE BURLON GOLDBERG GROUP, 1999; CHO E ATWOOD, 2002).

A inflamação sistêmica é aventada no escorpionismo devido ao fato de, em humanos acidentados, níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias serem detectadas, como as interleucinas (IL) IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (MAGALHÃES *et al.*, 1999; D'SUZE *et al.*, 2003; FUKUHARA *et al.*, 2003), fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (AMARAL *et al.*, 1994; FUKUHARA *et al.*, 2003), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) (MAGALHÃES *et al.*, 1999).

Uma possível e importante ação dessas citocinas recai sobre o sistema hematopoiético, podendo estimular a produção de leucócitos e sua mobilização para o sangue, além de direcioná-los do sangue para um tecido inflamado. Esse processo, conhecido como migração, é composto de etapas nas quais os leucócitos margeiam o endotélio, passando por momentos de rolagem e aderência, para posteriormente migrar para o tecido (LAWRENCE e SPRINGER, 1991; MAYADAS *et al.*, 1993). Essas etapas são comandadas por uma série de moléculas de adesão, que são expressas tanto no endotélio quanto no leucócito. Uma delas, as selectinas, compreendem uma família de três membros de lectinas do tipo C altamente conservadas, as quais se ligam a ligantes de carboidrato (*sialyl-Lewis X*) presentes em moléculas de superfície, como o ligante glicoprotéico 1 da P-selectina (PSGL-1). A L-selectina é expressa na maioria dos leucócitos circulantes, e medeia o contato inicial com receptores (adessinas de periferia - PNAds) presentes no endotélio. As outras selectinas (P e E) são expressas no endotélio e reconhecem receptores leucocitários como PSGL-1 (ligante glicoproteico de P-selectina), sendo, portanto, importantes para o contato inicial dos leucócitos com o endotélio, conhecido como rolagem (McEVER, 2002).

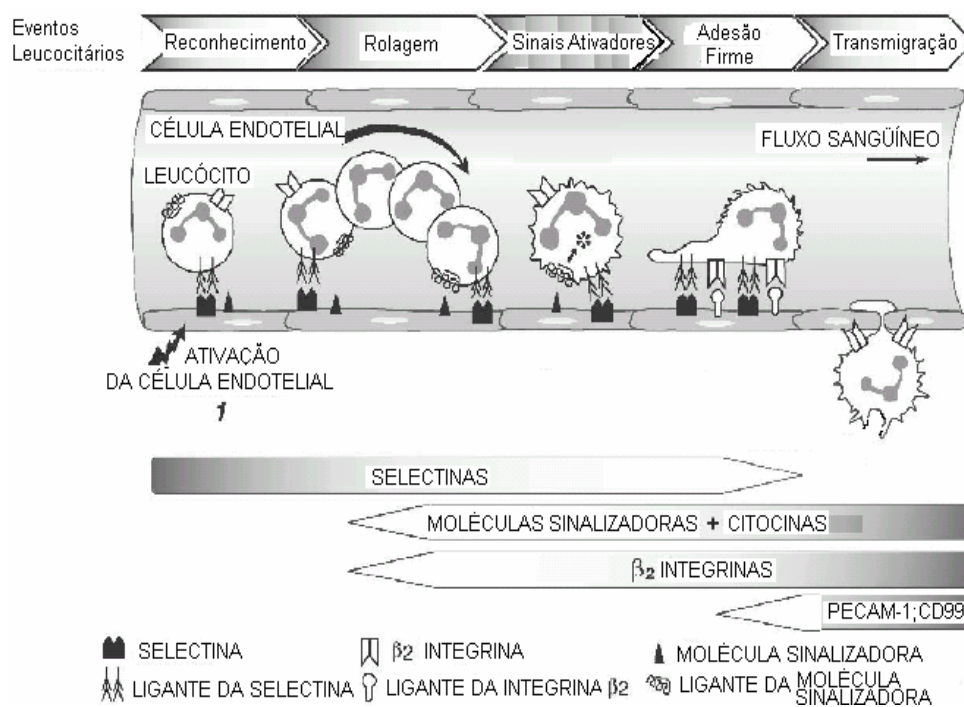
Outro grupo de moléculas de adesão, as integrinas, são responsáveis pela aderência firme do leucócito ao endotélio. As integrinas mais estudadas que participam desse processo são as da subfamília  $\beta_2$ , especialmente a LFA-1 (antígeno funcional de linfócitos - 1 ou CD11a/CD18), que combinam-se à receptores pertencentes à superfamília das

imunoglobulinas (ICAM-1 e ICAM-2, moléculas de adesão intercelular-1 e -2) presentes nas células endoteliais estimuladas. São ainda importantes para o contato firme do leucócito com o endotélio, as integrinas da subfamília  $\beta 1$  e  $\beta 7$ , como as  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4, *very late antigen* - 4 ou CD49d/CD29) e  $\alpha_4\beta_7$  que combinam-se, respectivamente, à molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e à adressina de mucosa (MAdCAM-1). Os ligantes para as integrinas descritas acima são todos representantes da superfamília das imunoglobulinas, que passam a ser expressos em grande quantidade pela célula endotelial após estimulação adequada (CARMAN e SPRINGER, 2003). Foram descritas duas rotas para a migração leucocitária, ou diapedese, a rota paracelular e a transcelular. Ambas mostram uma função importante das moléculas endoteliais ICAM-1 e VCAM-1 (BARREIRO *et al*, 2002; CARMAN e SPRINGER, 2004) e também das moléculas PECAM-1 (molécula de adesão celular de plaquetas e endotélio - 1), CD99 e JAMs (moléculas de adesão juncionais), que são expressas nas células endoteliais (JOHSON-LEGER *et al*, 2000).

As integrinas ainda são necessárias em passos adicionais na migração, que são a passagem dos leucócitos através da membrana basal do vaso, e a sua mobilização através da matriz extracelular. Foi demonstrado em neutrófilos, que a interação da PECAM-1 no leucócito com a PECAM-1 endotelial estimula um aumento na expressão das  $\alpha_6\beta_1$  (VLA-6 ou CD49f/CD29) nos neutrófilos, auxiliando a sua passagem através da membrana basal vascular, via interação com a laminina (DANGERFIELD *et al*, 2005). Quanto à locomoção dos leucócitos através da matriz extracelular, podemos destacar não apenas a própria  $\alpha_6\beta_1$ , como as  $\alpha_2\beta_1$  (VLA-2 ou CD49b/CD29) e a  $\alpha_3\beta_1$  (VLA-3 ou CD49c/CD29) interagindo com colágeno e laminina, e  $\alpha_5\beta_1$  (VLA-5 ou CD49e/CD29) que estabelece contato com a fibronectina (LINDBOM e WERR, 2002). Um esquema ilustrativo e simplificado do processo de diapedese de leucócitos é apresentado na figura 2 (página 19).

As matrizes extracelulares são alvos constantes de remodelamento durante o processo inflamatório, o qual está associado a um aumento da produção de fibronectina, tenascina e colágeno fibrilar. Diferentes tipos de células inflamatórias podem secretar proteases, assim como enzimas de degradação de glicosaminoglicanas para remodelar, penetrar e atravessar a barreira endotelial (STARMENKOVIC, 2003). Proteólises localizadas nos próprios leucócitos podem também expor receptores de células endoteliais para integrinas, e receptores específicos de citocinas, envolvidos na locomoção e retenção de leucócitos nos sítios de inflamação (STARMENKOVIC, 2003; ROSE e PAGE, 2004).

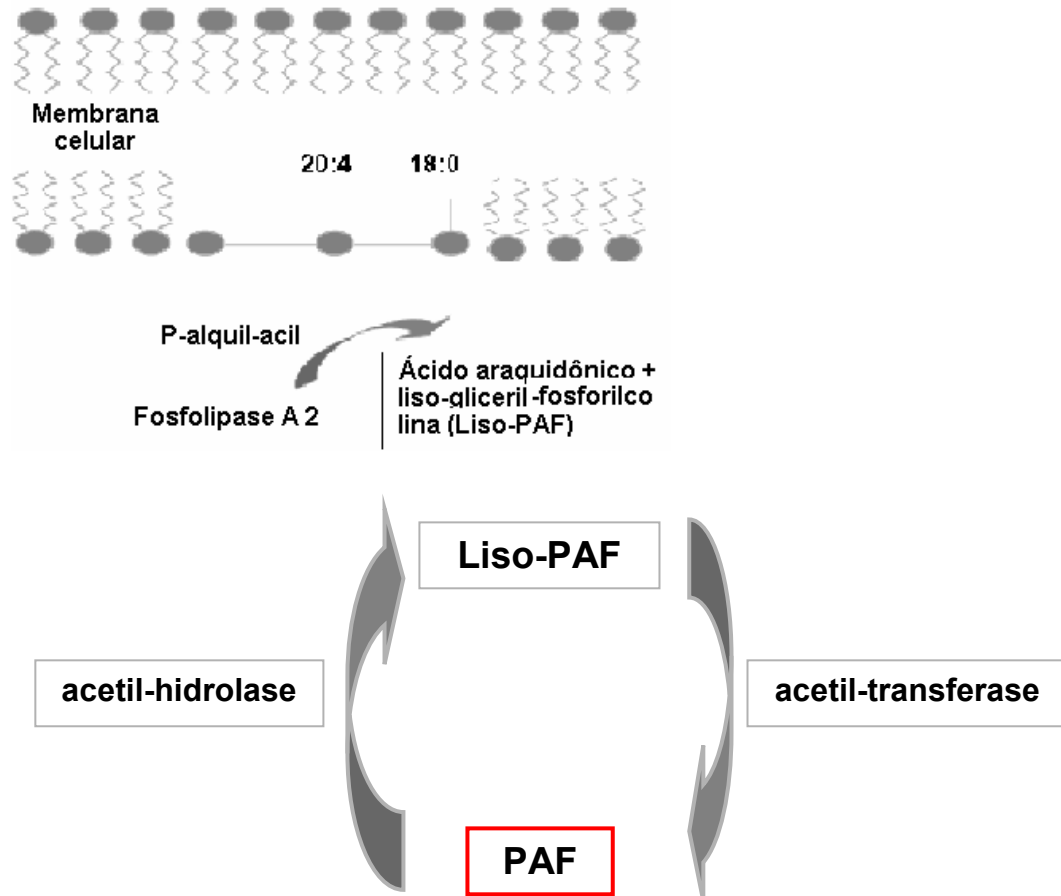
Além de citocinas, como por exemplo a IL-1 e o TNF- $\alpha$ , os mediadores lipídicos são importantes ativadores de leucócitos, além de modular a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, tornando estável a aderência do leucócito ao endotélio. Entre os mediadores lipídicos importantes no processo de migração, está o fator ativador de plaquetas (PAF) (SPRINGER, 1994).



**Figura 2:** o processo de diapedese. Adaptado de FREITAS JR (1999).

A denominação deste lipídeo deve-se ao fato de ter sido descoberto por Benveniste (1972), como um produto de basófilos de coelho sensibilizado com IgE e desafiado com antígeno específico, que promovia a agregação plaquetária. É um fosfoglicerídeo cuja estrutura (1-O-alkil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) foi descoberta por três laboratórios diferentes (DEMOPOULOS *et al*, 1979; BLANK *et al*, 1979; BENVENISTE *et al*, 1979). Embora a denominação (PAF) tenha sido mantida, é um mediador que exerce um grande número de funções. Sua produção ocorre pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub> ou C, ou ainda da diacilglicerol lipase, sobre os fosfoglicerídeos na membrana celular que, quando clivados, geram o ácido araquidônico e um lisofosfolipídeo. O primeiro serve de substrato para a formação de prostanoídes e leucotrienos, o segundo será transformado em PAF pela ação da

acetil-transferase (SNYDER *et al*, 1986). Um esquema ilustrativo da produção do PAF é encontrado a seguir (Figura 3).



**Figura 3:** via de produção do fator ativador de plaquetas (PAF).

O PAF é produzido por diversas células, como as endoteliais, macrófagos (KAMATA *et al*, 1996), mastócitos (MENCIA-HUERTA *et al*, 1983; NAKAJIMA *et al*, 1997) e leucócitos sangüíneos, entre os quais os neutrófilos (CUSS *et al*, 1986; CHEN *et al*, 1992). O PAF participa da interação leucócito-endotélio, modulando a ação das  $\beta_2$  integrinas, como o complexo CD11a/CD18, em neutrófilos propiciando a sua migração (GARCIA *et al*, 1988; LORANT *et al*, 1991; HONDA *et al*, 1991; ZIMMERMAN *et al*, 1992). Durante o processo de aderência do leucócito às células endoteliais, o PAF serve como um sinal que facilita a aderência de uma à outra (ZIMMERMAN *et al*, 1993; 1995). A ativação de leucócitos pelo

PAF também parece modificar a distribuição do PSGL-1 na superfície do leucócito, facilitando assim o movimento leucocitário pelo endotélio (LORANT *et al*, 1995).

Em adição ao seu potente efeito ativador de plaquetas (embora isso não ocorra em todas as espécies de mamíferos), o PAF tem sido relacionado ao aumento de permeabilidade vascular (HUMPHREY *et al*, 1984; TAVARES DE LIMA *et al*, 1995) e aumento da permeabilidade broncoalveolar (MIOTTLA *et al*, 1998). Em estudos de escorpionismo experimental, nos quais ratos receberam o veneno do *T. serrulatus*, tem sido enfatizado o papel do PAF no edema pulmonar e também neutrofilia (FREIRE-MAIA e MATOS, 1993 BORGES *et al*, 2000), tornando este mediador um importante alvo na investigação da resposta inflamatória desencadeada pelo escorpionismo.

Esperamos, com o nosso estudo, contribuir para um melhor conhecimento sobre os efeitos do veneno de escorpião no organismo. Um estudo comparativo, como o que desenvolvemos, pode trazer respostas importantes nesse sentido. Raríssimos estudos foram conduzidos na tentativa de comparar as ações de venenos escorpiônicos, ainda que em nosso país tenhamos um número significativo de espécies de escorpiões, pouco ou nada é conhecido sobre os efeitos de outros venenos de espécies que não os *T. serrulatus*. Por outro lado, isso é realizado frequentemente com venenos de serpentes. Assim, estudos que se destinem à comparação dos efeitos de venenos de determinados escorpiões, além de importantes, são inéditos.

Apesar do conhecimento adquirido, um melhor entendimento dos efeitos do veneno dos escorpiões sobre células, tecidos e sistemas é necessário. Quando se discute a ação de mediadores participantes do envenenamento, como por exemplo o PAF, influenciando a ação de células residentes ou recrutando leucócitos para determinado local/tecido, poucos dados estão disponíveis. Assim, estudos nesse sentido poderão aumentar o conhecimento da fisiopatologia do acidente e, eventualmente, ajudar a propor uma terapia adjuvante à utilização do soro antiescorpiônico.

O tratamento utilizado no mundo inteiro em acidentes considerados moderados ou graves é a administração do soro antiescorpiônico, mas há controvérsia sobre o resultado final desse tratamento. Alguns autores consideram-no ineficaz (BAWASKAR e BAWASKAR, 1991; ISMAIL, 1994; BAWASKAR e BAWASKAR, 1994), e Abroug *et al* (1999) mostraram em um estudo clínico acompanhando a evolução de vários pacientes, que não houve qualquer benefício na evolução clínica após a utilização do antiveneno. Da mesma maneira, Bawaskar e Bawaskar (2003) não encontraram efeito algum da administração do soro sobre os efeitos cardiovasculares do veneno do escorpião *Mesobuthus* (Buthidae).

Recentemente, Foëx e Wallis (2005) organizaram uma revisão bibliográfica de trabalhos que estudaram a utilização do anti-soro em humanos e concluíram que, embora existam evidências de que a utilização do soro antiescorpiônico reduz a concentração sérica do veneno, não está claro se isso é clinicamente relevante. Apesar dessas informações, o tratamento de escolha ainda é a administração do antiveneno, mas é importante que outras possíveis maneiras de controle das alterações no envenenamento sejam avaliadas e possam, eventualmente, serem utilizadas como adjuvante ao tratamento utilizando o anti-soro, ou ainda quando o anti-soro não está disponível, ou quando, apesar de sua utilização, não se conseguiu controlar os efeitos deletérios causados pelo veneno. De fato, algumas abordagens terapêuticas com drogas sem ação direta sobre o veneno foram investigadas em modelos experimentais, ou no envenenamento de seres humanos (ver as revisões de BAWASKAR e BAWASKAR, 1994; DEHESADÁVILA e POSSANI, 1994; FREIRE-MAIA *et al*, 1994; ISMAIL, 1994; MURTHY e HASE, 1994) mas, ainda não há consenso sobre a melhor forma de tratamento do escorpionismo.

Adicionalmente, há de se considerar que a investigação da ação de quaisquer venenos sobre eventos tais como na modulação de células do sistema imune, ou outros, poderá resultar em ferramentas biológicas ou drogas, de grande impacto para a indústria biotecnológica e farmacêutica. Embora o estudo com venenos de outros animais, notadamente os répteis, já tenham gerado produtos de grande interesse econômico, os venenos de aracnídeos (aranhas e escorpiões) ainda são pouco estudados e, conseqüentemente, nenhum benefício para o ser humano foi obtido deles. Entretanto, há também interesse neles devido principalmente às neurotoxinas presentes e sua ação sobre canais iônicos. Não existem muitos estudos com esses venenos sobre outros sistemas, como, por exemplo, o sistema imune. Uma das exceções, e que merece destaque, é a margatoxina, isolada do escorpião *Centruroides margaritatus*. Sua ação bloqueia a ativação de linfócitos T humanos (KOO *et al*, 1997; SHAH *et al*, 2003; BEETON *et al*, 2005), o que chamou a atenção de uma indústria farmacêutica (Merck), e poderá ser utilizada para o tratamento de doenças auto-imunes ou contra a rejeição de transplantes, atuando como um imunossupressor.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral:**

Avaliar, comparativamente, os efeitos inflamatórios dos venenos dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis*.

### **2.2 Específicos:**

- a) avaliar e comparar a ação edematogênica induzida pelos venenos.
- b) avaliar e comparar o número total de células, e das populações mononucleares e polimorfonucleares, na cavidade peritoneal estimulada pelos venenos.
- c) investigar a participação do PAF nos eventos anteriores.

## 3 MÉTODO

### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos com peso médio de 30 gramas, provenientes do Biotério da Universidade de Mogi das Cruzes, mantidos com ração e água *ad libitum*, e em ciclo claro/escuro de 12 horas. O desenvolvimento desse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Utilização de Animais de Experimentação da Universidade de Mogi das Cruzes. O número de animais utilizados no desenvolvimento desse estudo encontra-se em uma tabela demográfica (Apêndice 1, **página 67**).

### 3.2 Obtenção e armazenamento dos venenos dos escorpiões *T. bahiensis* e *T. serrulatus*

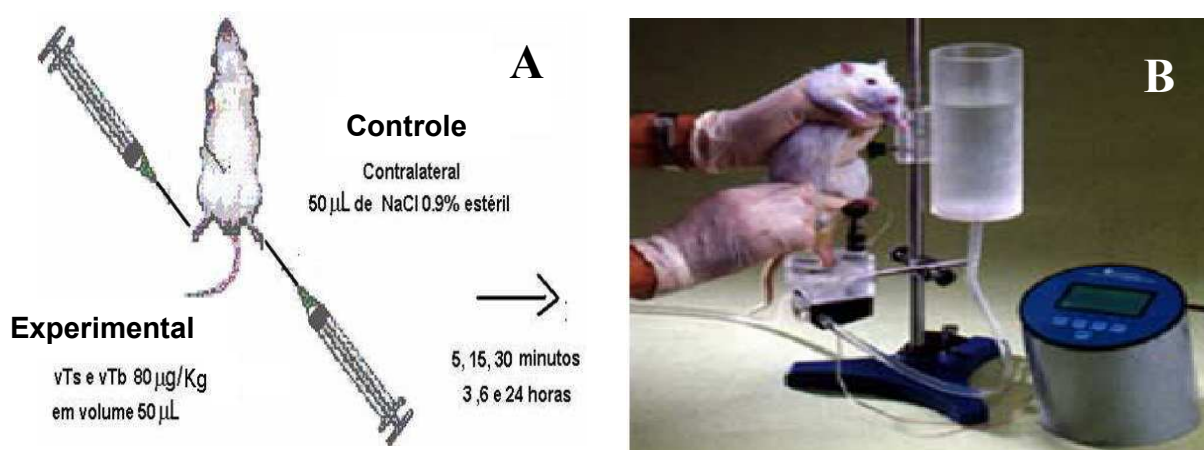
Os venenos liofilizados dos escorpiões *T. bahiensis* (vTb) e *T. serrulatus* (vTs) foram cedidos pelo Laboratório de Artrópodos do Instituto Butantan por intermédio da colaboradora deste projeto, Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira (Unidade de Inflamação do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan). O veneno foi mantido à -20°C até o momento do uso, quando foi diluído em PBS estéril, e a solução foi filtrada através de membranas de celulose de 0,22µm.

### 3.3 Avaliação do edema de pata induzido pelos venenos dos escorpiões

Para este estudo, o vTs e o vTb foram injetados no coxim plantar de uma das patas posteriores dos camundongos, na concentração de 80 µg/kg, em volume de 50 µL. A pata contralateral foi utilizada como controle, e recebeu 50 µL de NaCl 0,9% estéril. O volume das

patas, medido até a articulação tíbio-társica, foi avaliado em diferentes intervalos de tempo (5, 15, 30 minutos, 3, 6 e 24 horas) após a injeção dos venenos (Figura 4 A), com o auxílio de um pletismógrafo (Figura 4 B). Determinado o efeito do veneno após a 24<sup>a</sup> hora, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O resultado foi expresso em porcentagem do aumento do volume da pata em relação ao volume inicial, e determinado através da razão entre os volumes da pata com veneno e o da pata controle, como demonstrado abaixo:

$$\% \text{ de aumento podal} = \frac{\text{Vol. Final} - \text{Vol. Inicial}}{\text{Vol. Inicial}} \times 100$$

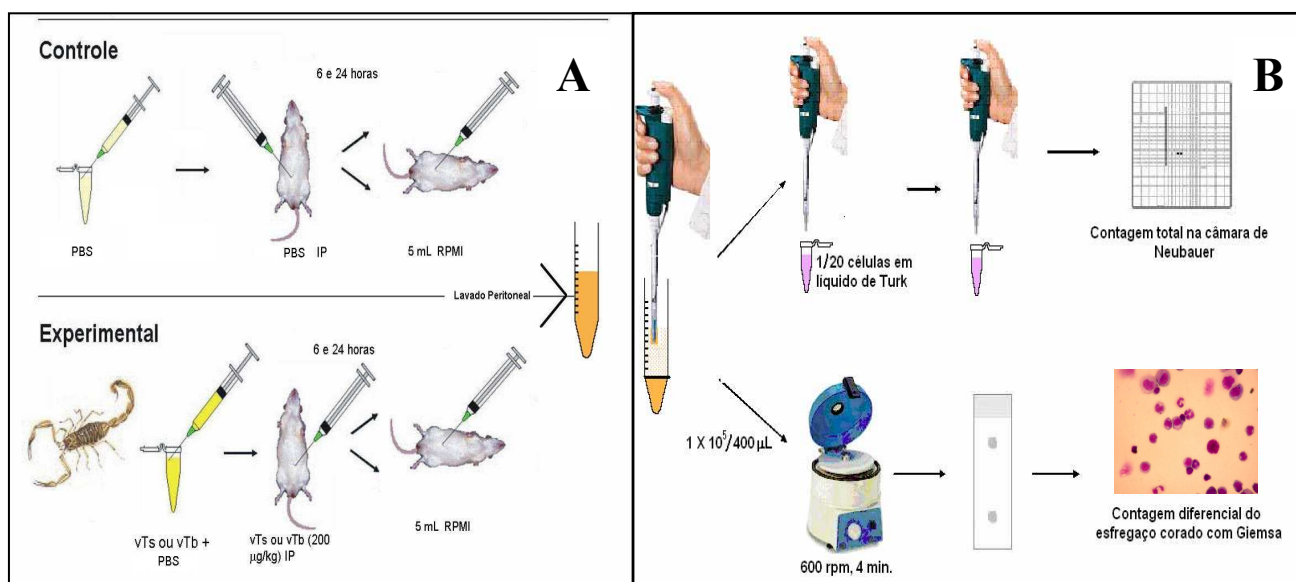


**Figura 4:** avaliação do edema de pata induzido pelos venenos dos escorpiões. Em A desencadeamento do edema; em B leitura no pletismógrafo

### 3.4 Avaliação do número de células da cavidade peritoneal

O envenenamento do animal por via intraperitoneal foi utilizado para o estudo do número de leucócitos da cavidade peritoneal, e foi desencadeado pela administração dos venenos na dose de 200 µg/kg, diluído em PBS (*phosphate buffered saline* – salina tamponada com fosfato) e injetado em um volume constante de 300 µL (Ilustração 5). Esta dose de veneno foi escolhida com base na literatura (Pessini *et al.*, 2003), e experimentos piloto desenvolvidos por nós, que demonstraram que essa dose induz um acidente de intensidade moderada a grave, porém não é letal. Os animais controle receberam um volume equivalente ao da solução do veneno de PBS.

Decorridos os tempos de 6 e 24 horas após a administração dos venenos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a lavagem da cavidade peritoneal foi efetuada com 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 contendo 5% de soro fetal bovino (Figura 5 A). O lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante descartado. A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer (Figura 5 B), diluindo-se previamente uma alíquota do lavado na proporção de 1/20 (v/v) em líquido de Turk. A contagem diferencial (Ilustração 5 B) foi efetuada após a confecção de lâminas em citocentrífuga (600 rpm por 4 minutos); para tanto, ajustamos a concentração de células para  $1 \times 10^5/400 \mu\text{L}$ . Após sua confecção, as lâminas foram coradas com Giemsa (corante comercial HEMA-3).



**Figura 5:** desencadeamento do envenenamento (A) e avaliação do número de células da cavidade peritoneal (B).

### 3.5 Avaliação da participação do PAF sobre as ações dos venenos

A participação do PAF como mediador das ações edematogênica e de migração celular, desencadeadas pelos venenos, foi avaliada com a utilização de um antagonista de seus receptores, o WEB-2170 (5-(2-clorofenil)-3,4-dihidro-10-metil-3-[(4-morfolinil) carbonil]-2H,7H-ciclopenta [4,5] tieno[3,2-f][1,2,4] triazolo[4,3-a][1,4] diazepine, diluído em PBS

estéril e administrado por via intraperitoneal na dose de 3 mg/kg, 30 minutos antes da administração dos venenos. O WEB-2170 foi obtido da Boehringer-Ingelheim (Alemanha), e gentilmente cedido pela Profª. Dra. Sonia Jancar.

### **3.6 Análise estatística**

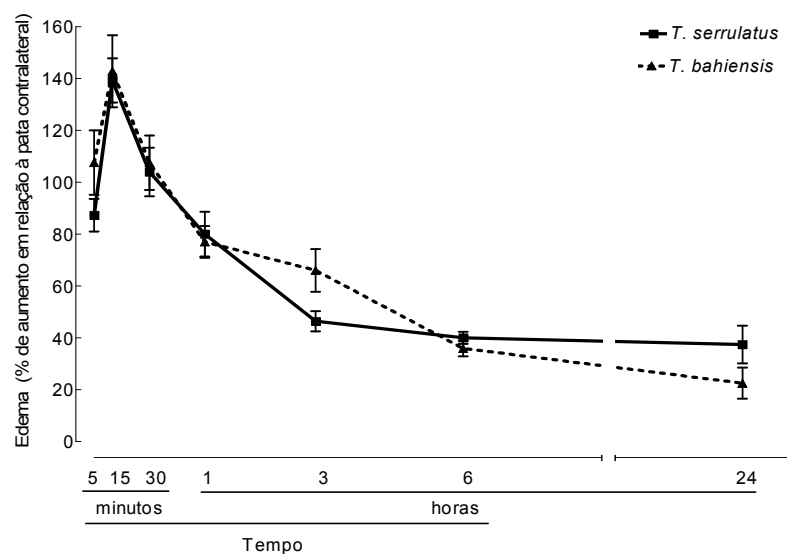
Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student não pareado com a distribuição Gaussiana avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Caso algum grupo de dados não tenha apresentado distribuição Gaussiana, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Coeficiente de significância avaliado foi de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  e.p.m. (erro padrão da média).

## 4 RESULTADOS

Nosso estudo concentrou-se na comparação de sinais de inflamação local (edema e migração celular), causados pelos venenos de dois escorpiões da família Buthidae envolvidos em acidentes de importância médica em nosso país. A participação do PAF nesses eventos foi avaliada com o uso de um antagonista seletivo de seus receptores, o WEB-2170.

### 4.1 Efeito edematogênico dos venenos dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis*

Como demonstrado na figura 6, os venenos desencadearam edema local (pata) de intensidade e cinética temporal similar. Em ambos os casos, o edema teve rápido estabelecimento (logo aos 5 minutos) e alcançou o máximo de intensidade aos 15 minutos, diminuindo gradativamente, mas ainda presente na 24<sup>a</sup> hora.



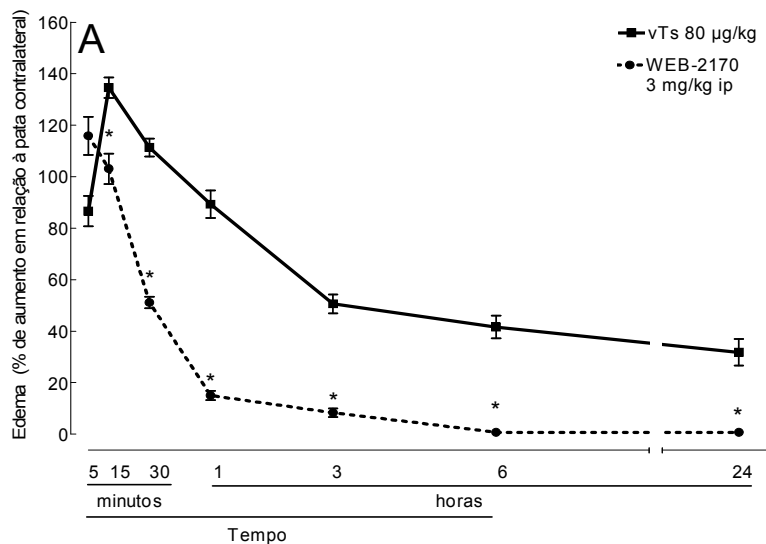
**Figura 6:** Efeito edematogênico dos venenos dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis*. Os animais receberam por via subcutânea em uma das patas NaCl 0,9% estéril (pata controle), e na outra os venenos (80 µg/kg em ambos os casos). O volume da pata foi medido ao longo de 24 horas nos

intervalos indicados. Os resultados foram obtidos em grupos de 10 a 12 animais e estão representados como média  $\pm$  e.p.m.

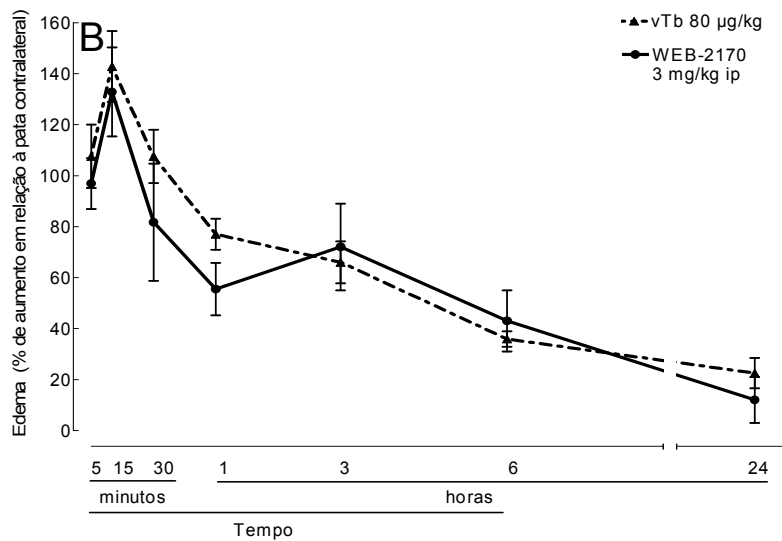
#### 4.2 Participação do PAF no edema induzido pelos venenos dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis*

Quando avaliamos o envolvimento do PAF no edema, com o uso de um antagonista de seus receptores (WEB-2170), foram obtidos resultados distintos em relação aos diferentes venenos.

Em relação ao vTs (figura 7, gráfico A- abaixo), o tratamento dos animais com o WEB-2170 não teve efeito apenas no tempo de 5 minutos, mas inibiu o estabelecimento do edema nos tempos subseqüentes, controlando-o por completo (0 a 3% de edema) após 6 horas. No entanto, quando avaliamos o efeito do tratamento com o WEB-2170 no edema causado pelo vTb (figura 7, gráfico B página 30), não foi notada qualquer alteração.



**Figura 7:** Participação do PAF no efeito edematogênico do *T. serrulatus* (gráfico A).



**Figura 7 continuação:** Participação do PAF no efeito edematogênico do *T. bahiensis* (gráfico B). Os grupos vTs 80 µg/kg e vTb 80 µg/kg (n=12 e 10) receberam os venenos em uma das patas, tendo a outra recebido NaCl 0,9%. Os grupos WEB-2170 3 mg/kg ip (n=7 em ambos) foram pré-tratados 30 minutos antes da injeção dos venenos. O volume das patas foi medido por 24 horas nos intervalos indicados. Os resultados estão representados como média ± e.p.m. \*P<0,05 em relação ao grupo sem tratamento.

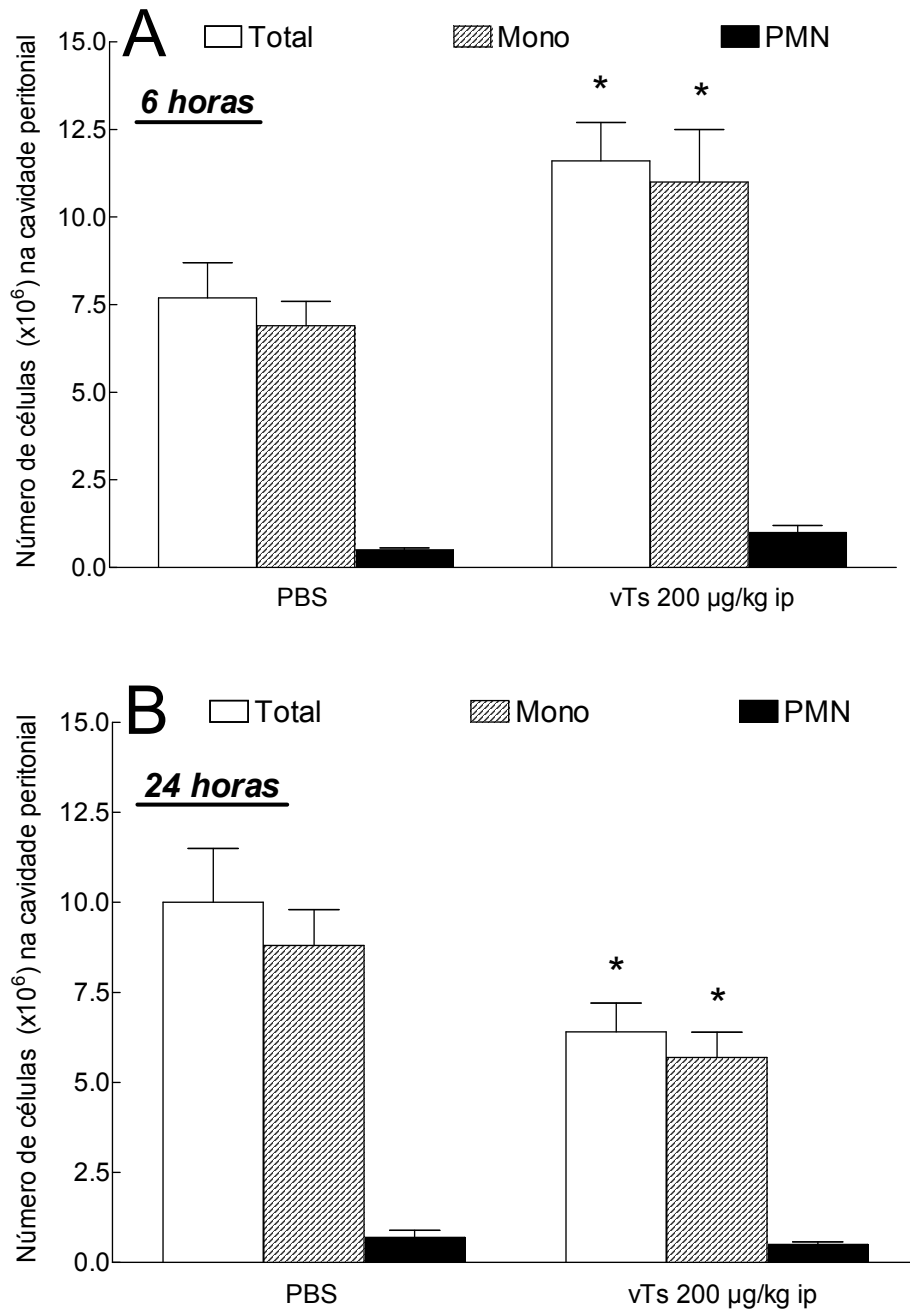
### 4.3 Efeito dos venenos dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis* sobre o número de células da cavidade peritoneal

A avaliação da população celular da cavidade peritoneal 6 horas após a administração local do vTs (figura 8, gráfico A), mostrou que houve aumento de 50% no número total de células, acompanhado pelo aumento de 60% no número de células mononucleares (Mono). No entanto, o contrário ocorreu quando avaliamos o número de células na cavidade peritoneal na 24ª hora após a administração do vTs (figura 8, gráfico B), houve uma diminuição (40%) no número total de células, acompanhada pela queda (36%) no número de Mono. Este veneno não alterou a quantidade de polimorfonucleares (PMN) em nenhum dos tempos estudados.

Quando o efeito do vTb foi investigado 6 horas após a sua administração (figura 9, gráfico A), notamos um aumento de 10 vezes no número de PMN e, embora tenha ocorrido uma tendência ao aumento no número total de células, este fato não alcançou diferença estatística em comparação ao grupo controle (injeção de PBS). A quantidade de Mono não foi

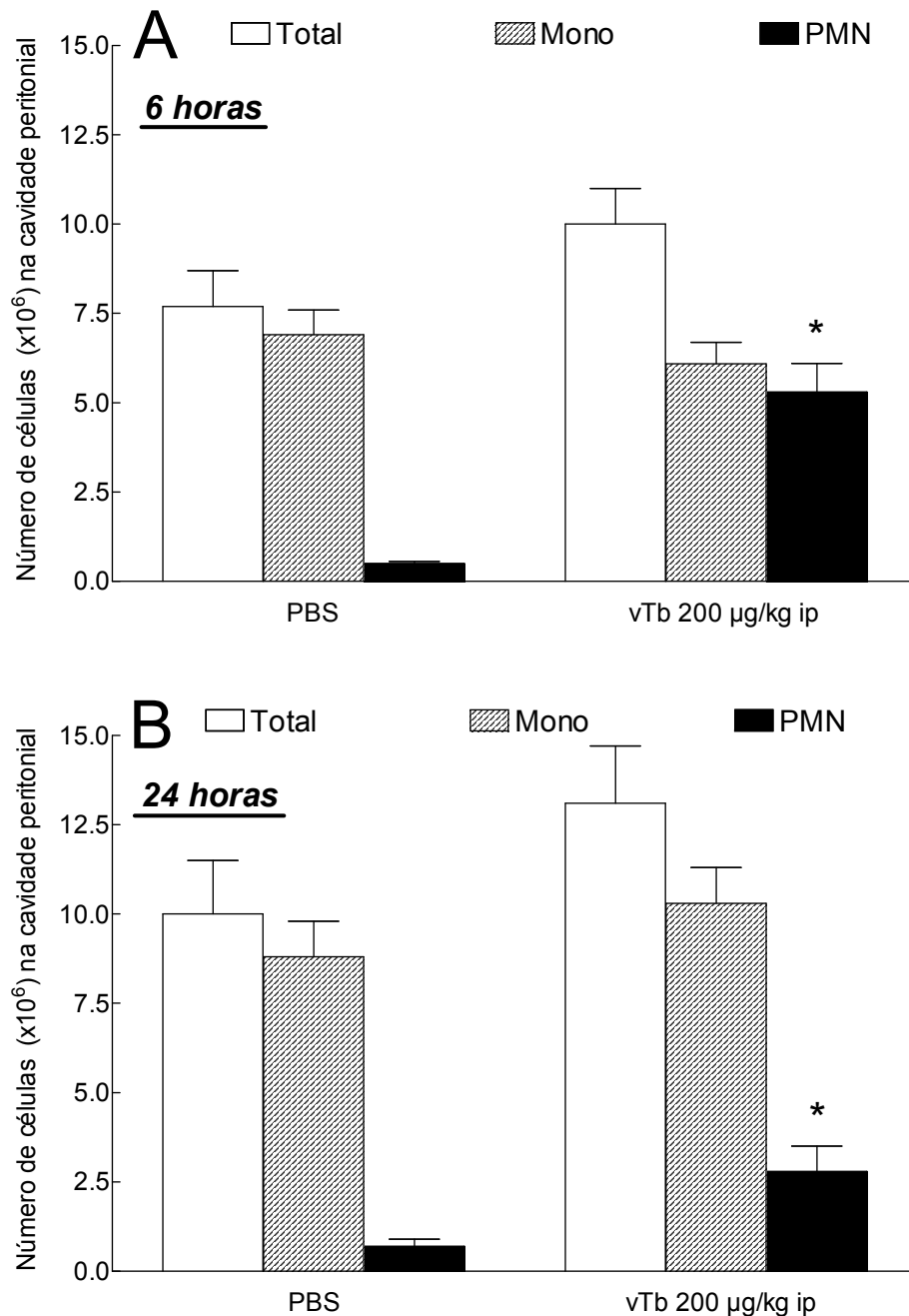


modificada pelo vTb. A avaliação das células após 24 horas da estimulação do peritônio pelo vTb (figura 9, gráfico B), indicou que o número de PMN continuou aumentado (4 vezes) em relação ao grupo controle, sem alteração no número de Mono e total de células (embora neste último tenha ocorrido uma tendência ao aumento, como na 6<sup>a</sup> hora).



**Figura 8:** Análise quantitativa e qualitativa da população celular peritoneal após a administração do vTs. O gráfico A mostra o efeito do vTs (grupo 200 µg/kg ip, n=11) 6 horas após a sua administração. O gráfico B mostra o efeito do vTs (n=13) 24 horas após. Total: número total de células na cavidade;

Mono: células mononucleares; PMN: células polimorfonucleares. Os resultados estão representados como média  $\pm$  e.p.m. \* $P < 0,05$  em relação ao respectivo controle (grupo PBS,  $n = 5 - 6$ ).



**Figura 9:** Análise quantitativa e qualitativa da população celular peritoneal após a administração do vTb. O gráfico A mostra o efeito do vTb (grupo 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ip,  $n = 9$ ) 6 horas após a sua administração. O gráfico B mostra o efeito do vTb ( $n = 15$ ) 24 horas após. Total: número total de células na cavidade; Mono: células mononucleares; PMN: células polimorfonucleares. Os resultados estão representados como média  $\pm$  e.p.m. \* $P < 0,05$  em relação ao respectivo controle (grupo PBS,  $n = 5 - 6$ ).

#### 4.4 Participação do PAF no efeito dos venenos dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis* sobre o número das células da cavidade peritoneal

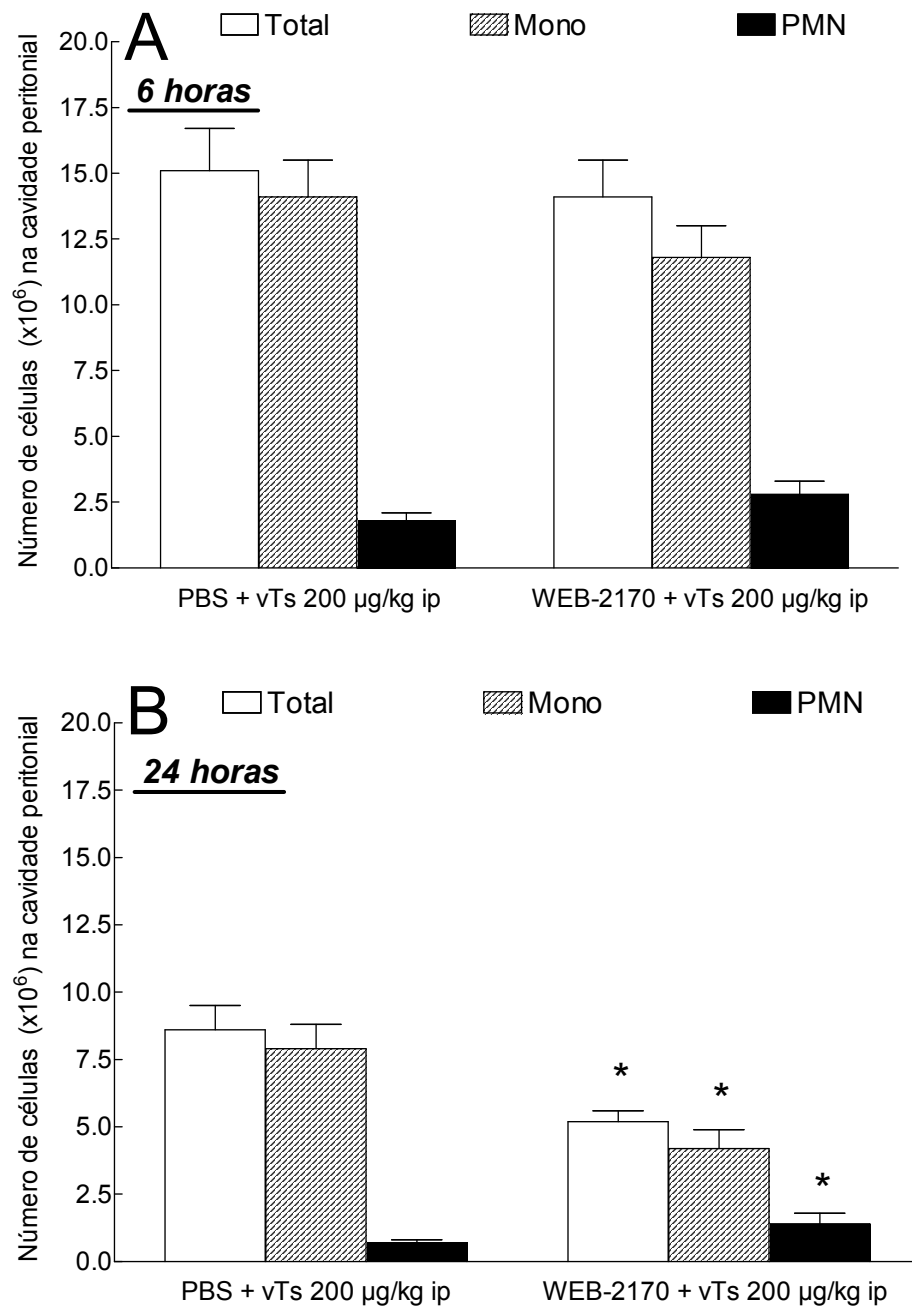
No envenenamento de 6 horas com o vTs o número de células peritoneais não foi alterado significativamente pelo uso do WEB-2170, embora tenha ocorrido uma tendência ao aumento no número de PMN (figura 10, gráfico A). No entanto, quando avaliadas as populações celulares na 24<sup>a</sup> hora após a administração do vTs (figura 10, gráfico B), o WEB-2170 teve efeito significativo diminuindo o número total de células (40%) e o de Mono (50%), em relação aos animais sem tratamento. Por outro lado, o antagonismo aumentou o número de PMN (100%). Em relação ao vTb (no envenenamento de 6 horas), o antagonismo do PAF não alterou o número de PMN, mas resultou em uma redução no número total de células (31%) e no de Mono (33%) em relação aos animais controles (figura 11, gráfico A). No gráfico B da figura 11 estão representados os resultados do antagonismo do PAF no envenenamento de 24 horas com o vTb, e nota-se que não houve efeito significativo do WEB-2170.

Como controle da administração do WEB-2170 sobre o número basal de células no peritônio, desenvolvemos experimentos nos quais o número de células foi comparado entre grupos que receberam apenas PBS ou o antagonista. Os resultados estão agrupados na tabela 1.

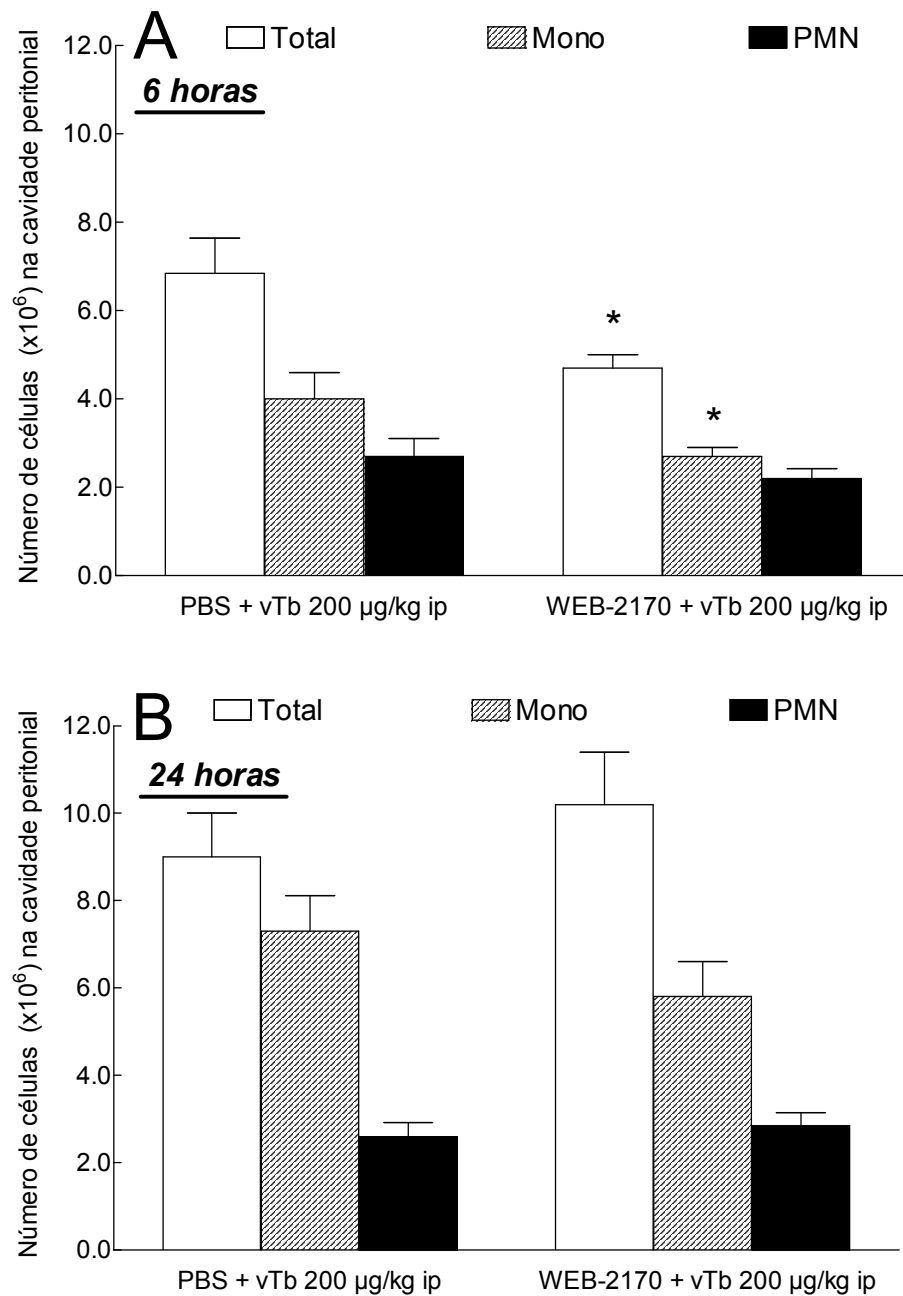
**Tabela 1:** Efeito do WEB-2170 sobre o número basal de células no peritônio.

| Grupos (n=5)      | Número de células (x 10 <sup>6</sup> ) na cavidade peritoneal |               |                    |
|-------------------|---|---------------|--------------------|
|                   | Células totais  | Mononucleares | Polimorfonucleares |
| PBS 6 horas       | 6,8 ± 0,3   | 5,4 ± 0,2     | 0,9 ± 0,2          |
| WEB-2170 6 horas  | 5,8 ± 0,7   | 5,0 ± 0,4     | 0,8 ± 0,3          |
| PBS 24 horas      | 8,3 ± 1,8   | 7,1 ± 1,5     | 1,2 ± 0,4          |
| WEB-2170 24 horas | 9,0 ± 1,6   | 8,1 ± 1,2     | 1,0 ± 0,4          |

Os resultados estão expressos como a média ± e.p.m.



**Figura 10:** Efeito do WEB-2170, antagonista do PAF, sobre o número de células na cavidade peritoneal estimulada pelo vTs. O gráfico A mostra o efeito do WEB-2170 (grupo WEB-2170 + vTs 200  $\mu$ g/kg ip, n=6) ip 3 mg/kg 30 minutos antes do vTs, na modificação da quantidade de células da cavidade peritoneal exercida pelo vTs 6 horas após a sua administração. O gráfico B mostra o efeito do WEB-2170 (grupo WEB-2170 + vTs 200  $\mu$ g/kg ip, n=7) na ação do vTs 24 horas após a sua administração. Total: número total de células na cavidade; Mono: células mononucleares; PMN: células polimorfonucleares. Os resultados estão representados como média  $\pm$  e.p.m. \*P<0,05 em relação ao respectivo controle (PBS + vTs 200  $\mu$ g/kg ip, n=5 para ambos os experimentos).



**Figura 11:** Efeito do WEB-2170, antagonista do PAF, sobre o número de células na cavidade peritoneal estimulada pelo vTb. O gráfico A mostra o efeito do WEB-2170 (grupo WEB-2170 + vTb 200  $\mu$ g/kg ip, n=8) ip 3 mg/kg 30 minutos antes do vTb, na modificação da quantidade de células da cavidade peritoneal exercida pelo vTb 6 horas após a sua administração. O gráfico B mostra o efeito do WEB-2170 (grupo WEB-2170 + vTb 200  $\mu$ g/kg ip, n=6) na ação do vTb 24 horas após a sua administração. Total: número total de células na cavidade; Mono: células mononucleares; PMN: células polimorfonucleares. Os resultados estão representados como média  $\pm$  e.p.m.. \*P<0,05 em relação ao respectivo controle (PBS + vTs 200  $\mu$ g/kg ip, n=5 - 6).

## 5 DISCUSSÃO

Nosso estudo focalizou as alterações inflamatórias locais desencadeadas pelos venenos de dois escorpiões de importância médica em nosso país, o *T. serrulatus* e o *T. bahiensis*. Mostramos que ambos têm ação edematogênica local e efeito sobre o número de células na cavidade peritoneal, além disso, há a participação do PAF em alguns dos eventos investigados. O edema é uma característica marcante do escorpionismo, sendo que o mais estudado é aquele que ocorre nos pulmões devido ao fato de que é um achado importante nas vítimas fatais de escorpionismo. A gênese do edema pulmonar ainda é motivo de controvérsia, podendo ser considerada cardiogênica ou inflamatória. Os trabalhos desenvolvidos por alguns poucos grupos brasileiros avaliando a origem inflamatória do edema pulmonar foram realizados com o veneno do *T. serrulatus* (MATOS *et al*, 1999; FREIRE-MAIA e DE MATOS, 1993; FREIRE-MAIA *et al*, 1994; DE MATOS *et al*, 1997; AMARAL *et al*, 1994), e nada foi ainda publicado em relação a outros venenos de animais da nossa fauna. Não há trabalhos discutindo o edema pulmonar induzido pelo vTb, apesar de Bucarechi *et al* (1995) ter citado que isso já ocorreu em vítimas do *T. bahiensis*. Foi demonstrado por (REVELO *et al*, 1996) que o veneno do *T. serrulatus* pode ser encontrado nos pulmões no envenenamento experimental mas, uma vez que existe uma resposta inflamatória sistêmica originada por esse veneno, tanto no humano (MAGALHÃES *et al*, 1999; D'SUZE *et al*, 2003; FUKUHARA *et al*, 2003), quanto no camundongo (PETRICEVICH e PEÑA, 2002; PESSINI *et al*, 2003), fica difícil saber se a inflamação pulmonar é diretamente induzida pelo veneno quando alcança os pulmões, ou se as alterações sistêmicas com produção de vários mediadores inflamatórios são as responsáveis.

Em nosso trabalho escolhemos avaliar o edema na pata uma vez que esta alteração é pouco investigada, apesar de estar presente juntamente com a dor em muitos dos acidentes, trazendo grande desconforto às vítimas. Além disso, a dose escolhida para ser utilizada nesses estudos (80 µg/kg), com base em resultados prévios do nosso grupo, não induz alterações que evidenciam um efeito sistêmico como lacrimação, salivação, piloereção, agitação e dificuldade respiratória. Com isso, podemos afirmar com alguma segurança que o edema observado é resultado da ação local do veneno, o que poderia ocorrer em qualquer outro sítio, como nos pulmões.

Há um único trabalho que avaliou o edema de pata induzido pelo veneno do *T. serrulatus* (NASCIMENTO Jr *et al*, 2005). O edema local também foi estudado por outros grupos, e foi demonstrado anteriormente, que o *Buthus martensi* (outro escorpião da família Buthidae, encontrado na Ásia), também induz edema na pata (CHEN *et al*, 2002). Nosso trabalho foi o primeiro a demonstrar que o vTs e o vTb provocam edema local de intensidade similar ao longo do tempo. Devido à presença de neurotoxinas nos venenos escorpiônicos, é possível que a ação edematogênica tenha sido resultado de uma inflamação neurogênica, como demonstrado por Leme *et al* (1978) através da estimulação do nervo ciático de ratos. De fato, segundo De-Matos *et al* (1999), no edema pulmonar desencadeado pelo veneno do *T. serrulatus* ocorre a participação de neuropeptídeos, o que levaria à ativação de mastócitos que, por sua vez, liberariam mediadores envolvidos no aumento da permeabilidade vascular.

Apesar de, em 2001, esse mesmo grupo de cientistas ter demonstrado que mastócitos estão envolvidos com o edema pulmonar no escorpionismo experimental (De-MATOS *et al*, 2001), Nascimento Jr *et al* (2005) descartaram a participação dos mastócitos no edema de pata pelo veneno do *T. serrulatus*. Esses autores mostraram que aminas vasoativas (histamina e 5-hidróxitriptamina, que são armazenadas pelos mastócitos) podem participar do edema de pata mas, no entanto, foram encontradas no próprio veneno. A 5-hidróxitriptamina já foi encontrada no veneno de vários artrópodes (WELCH e BATTY, 1963). Além disso, quando trataram um grupo de animais com um reconhecido inibidor de mastócitos, não obtiveram sucesso na modulação do edema. Em suporte a esses resultados que excluem os mastócitos como participantes, ao menos do edema no escorpionismo, demonstramos que tanto *in vivo* (através da modulação do edema pulmonar com anti-histamínico e um inibidor da ativação de mastócitos) como *in vitro* e *ex vivo* (avaliando-se a concentração de serotonina no sobrenadante de células peritoniais e do mesentério), o vTs não ativa mastócitos (KWASNIEWSKI *et al*, 2006). Apesar desses resultados discordantes, e de não termos avaliado a participação dos mastócitos nesse estudo, estamos inclinados a acreditar que outra(s) célula(s) deve(m) ser responsável(eis) pelo edema observado. Ao menos o macrófago pode ser uma delas.

Sabe-se que os macrófagos são ativados pelo vTs (PETRICEVICH, 2002; PETRICEVICH e LEBRUN, 2005), embora o reflexo disso *in vivo* não esteja esclarecido. Podemos supor que participariam do edema, uma vez que secretam mediadores envolvidos nesse tipo de resposta, como, por exemplo, o PAF (MENCIA-HUERTA e BENVENISTE, 1981; KAMATA *et al*, 1996), que pode atuar diretamente sobre o endotélio gerando o edema

(BUSSOLINO *et al*, 1987). Os macrófagos podem secretar também tromboxano A<sub>2</sub> (ALLAITH *et al*, 1993), que também participa de edema (TAVARES DE LIMA *et al*, 1995).

O PAF tem recebido destaque no estudo do escorpionismo. Nos trabalhos de Freire-Maia e Matos (1993), Matos *et al* (1997), Matos *et al* (1999) onde a hipótese de edema pulmonar inflamatório foi avaliada, a participação do PAF foi inicialmente dada como certa, mas posteriormente tornou-se controversa.

Avaliamos a participação do PAF no edema de pata induzido pelos diferentes venenos e notamos respostas contraditórias. Apenas no edema desencadeado pelo vTs o PAF foi importante, não tendo sido quando utilizamos o vTb. Cabe o registro que o edema de pata ocasionado pelo veneno de um outro artrópode, a *Apis mellifera*, não foi modulado pelo PAF (CALIXTO *et al*, 2003). A ausência de efeito do antagonista do PAF sobre o edema induzido pelo vTb indica que esse mediador não é imprescindível no desenvolvimento do edema, apesar de não podermos descartar que a sua produção possa estar presente. Não sabemos o motivo exato dessa diferença entre as ações dos venenos mas, ainda que os venenos desses escorpiões contenham toxinas com alto grau de similaridade em sua seqüência de aminoácidos (BECERRIL *et al*, 1996), podem existir toxinas ainda não descritas (provavelmente a maior parte das presentes nos venenos) com ações distintas. Também devemos levar em conta que a similaridade entre as toxinas não garante ação biológica idêntica, e ainda que, utilizando o veneno bruto (como fizemos) é plausível que o seu efeito biológico seja uma somatória da ação das várias toxinas.

Como já destacado, o principal envolvido nos acidentes graves e fatais é o *T. serrulatus*, embora o motivo disso seja desconhecido. Nossos resultados sobre a participação do PAF no edema induzido pelo vTs, mas não pelo vTb, pode explicar o motivo pelo qual nos acidentes severos com edema pulmonar, o agente responsável (quando identificado) é *T. serrulatus*. Como discutido anteriormente, embora controverso, o PAF já foi identificado como importante no edema pulmonar induzido pelo vTs. Assim, caso o PAF seja mesmo importante para o edema ou outras alterações pulmonares, a diferença observada por nós (participação do PAF no edema gerado pelo vTs mas não pelo vTb), estudando o edema de pata, pode ser determinante no resultado final do acidente.

No entanto, se o PAF não é importante para o edema observado após a administração do vTb, outros mediadores tiveram provavelmente participação. Para que um mediador se “encaixe” na situação estudada, ele deve ser rapidamente gerado ou secretado visto que a instalação do edema foi muito rápida (pico aos 15 minutos). Um candidato plausível seria a bradicinina, uma vez que dor e edema podem ser desencadeados por ela no local da injúria. A



bradicinina é rapidamente formada pelo sistema gerador de cininas no plasma pela ação conjunta do fator XII, precalicreína e cininogênio de alto peso molecular, ou ainda em outros tecidos, que não o sangue, com a participação de cininogênio de baixo peso molecular e aminopetidase (revisto por BHOOLA *et al*, 1992). Foi demonstrado anteriormente, que o veneno de escorpião pode levar à formação de cininas no plasma (LAHIRI e CHAUDHURI 1983), e que podem ser encontrados no veneno desses animais, peptídeos potencializadores da ação da bradicinina (MEKI *et al*, 1995). Adicionalmente encontra-se um nível plasmático elevado de bradicinina em coelhos injetados com o veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus* (FATANI *et al*, 1998). Quanto ao veneno de escorpiões que ocorrem em nossa fauna, recentemente Fukuhara *et al* (2004) publicaram um estudo onde existem evidências da formação de cininas em seres humanos picados pelo *T. serrulatus*.

Na segunda etapa de nosso trabalho estudamos a ação dos venenos sobre o número de células presentes na cavidade peritoneal, mais uma vez uma ação local do veneno, injetando-o diretamente na cavidade. A dose escolhida (200 µg/kg) é suficiente para induzir alterações sistêmicas, porém sem letalidade. Assim como na pele, macrófagos e os mastócitos são células do sistema imune residentes na cavidade peritoneal. Também nesses experimentos encontramos diferenças significativas entre as ações dos venenos. Na 6ª hora após a administração do vTs encontramos um aumento no número total de células concomitante ao aumento no número de macrófagos, enquanto que o vTb induziu um aumento expressivo no número de PMN.

Como descrito anteriormente, os macrófagos podem ser ativados pelo vTs, e é plausível que estimulem a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal. Uma possibilidade para a ativação de macrófagos pelo veneno de escorpiões seria a participação de canais de K<sup>+</sup> sobre essas células. Foram encontradas no vTs, toxinas que agem em canais de K<sup>+</sup> e, como demonstrado por Vicente *et al* (2003), a interação de substâncias com estes canais pode induzir rotas bioquímicas que culminam na expressão de genes que levam à transcrição de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos. Já foi demonstrado por Petricevich (2002) que macrófagos estimulados *in vitro* pelo vTs produzem citocinas como a IL-1 e a IL-6. Além disso, as mesmas citocinas também foram encontradas no soro de camundongos 2 a 4 horas após o envenenamento (pelo vTs) (PETRICEVICH E PEÑA, 2002). Resultados similares acerca dos níveis de citocinas foram obtidos por Pessini *et al* (2003), além da demonstração de níveis elevados de TNF-α no soro, com pico na 2ª hora do envenenamento. Concentrações elevadas dessas citocinas também foram encontradas em pacientes picados por escorpiões da família Buthidae em outras regiões do mundo (BARBOUCHE *et al*, 1996; MEKI *et al*, 1998),

bem como no Brasil (MAGALHÃES *et al*, 1999). A IL-1 está intimamente envolvida com a migração de neutrófilos (NOURSHARGH *et al*, 1995; CASALE e COROLAN, 1999; YOUNG *et al*, 2002), enquanto que a IL-6 está envolvida tanto na mobilização de neutrófilos marginais para o fluxo sanguíneo, como na saída dessas células da medula óssea para o sangue (ULICH *et al*, 1989; SUWA *et al*, 2000), o que obviamente também poderá ter reflexos na migração dessas células para o local da injúria. Além disso, Meki *et al* (2003) mostraram no soro de seus pacientes a presença de mais uma citocina envolvida na migração de neutrófilos, a IL-8.

Tomadas essas informações em conjunto, podemos especular que em nossos experimentos os macrófagos da cavidade peritoneal produziram essas citocinas *in situ*, que, por sua vez, estimularam a migração celular. As informações descritas acima podem explicar o acúmulo de PMN na cavidade peritoneal 6 horas após a administração do vTb. No entanto, quando os animais foram envenenados com o vTs, não encontramos um número aumentado de PMN, como descrito por Pessini *et al* (2003) mas, ao contrário, o número de Mono (em sua maioria macrófagos) havia aumentado. Além do número de Mono aumentado, a quantidade de células totais também se encontrava elevado. Entretanto, Pessini *et al* avaliaram o tempo de 8 horas após o envenenamento, e nós, 6 horas; talvez o motivo da discrepância esteja nesse fato. O aumento no número de Mono após 6 horas de envenenamento foi uma surpresa, uma vez que a migração dessas células geralmente ocorre tardiamente após o estímulo, geralmente depois dos neutrófilos. Para que isso tenha ocorrido, provavelmente algum mediador envolvido na migração de monócitos foi produzido, e, uma vez que o número de Mono foi aumentado, e essas células respondem pela maior parte das células totais encontradas na cavidade peritoneal, é de se esperar que o número total de células também tenha aumentado. De fato, Henderson *et al* (2003) demonstraram que monócitos podem migrar rapidamente (2 horas após o estímulo) devido à produção de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) por macrófagos residentes, o que ocorreu de maneira independente da migração de neutrófilos. Além disso, Costa *et al* (2005) demonstraram que o TNF- $\alpha$ , administrado na pele de camundongos, induziu a migração precoce de monócitos (em 4 horas). Interessantemente, esses autores demonstraram que o efeito do TNF- $\alpha$  deu-se através da ativação de nervos sensoriais, pois demonstraram a participação dos receptores NK1 (um receptor para neuropeptídeos). É notório que os venenos de escorpiões contém neurotoxinas e, em relação ao vTs, De Matos *et al* (1999) demonstraram que a possível estimulação da liberação de neuropeptídeos e sua ocupação dos receptores NK1 no envenenamento experimental, possivelmente participa da formação do edema pulmonar em ratos. Além disso, Abdel-

Haleem *et al* (2006) demonstraram a presença da citocina RANTES no soro de pacientes severamente envenenados, logo após (5 a 8 horas) a sua admissão hospitalar, permanecendo em níveis elevados por até 24 horas. A RANTES é uma citocina envolvida no recrutamento de células mononucleares, como os monócitos (VOLIN *et al*, 1998).

Os resultados obtidos 24 horas após o envenenamento também diferiram em relação ao veneno utilizado. Enquanto o número de PMN continuava aumentado nos animais que receberam o vTb, o que é condizente com o processo de migração dessas células e com as citocinas encontradas no envenenamento (como descrito acima), naqueles envenenados com o vTs o número total de células e de Mono diminuiu em relação ao índice basal (animais que não foram envenenados). Possivelmente, isso tenha ocorrido devido ao fenômeno denominado reação de desaparecimento de macrófagos (*macrophage disappearance reaction*, MDR). Essa reação é pouco estudada, mas uma revisão é provida por Barth *et al* (1995). Como o próprio termo ressalta, na MDR os macrófagos “desaparecem” do tecido após um estímulo. Inicialmente, as proteínas do processo de coagulação sangüínea podem estar envolvidas, basicamente o fibrinogênio/fibrina. O extravasamento dessas proteínas poderia estabelecer uma ligação entre os macrófagos e filamentos de fibrina, tornando difícil a recuperação dessas células através do lavado da cavidade (LEAK, 1983). Outra possibilidade, que também faz parte da explicação para a MDR por outros estímulos estudados, é que o vTs tenha ativado os macrófagos residentes que, durante esse processo, passaram a expressar moléculas que promovem uma maior adesão dessas células ao mesotélio, como por exemplo, a integrina CD11b/CD18. Como resultado disso, foram recolhidos menos macrófagos pelo lavado. Como os Mono representam a maior parte das células encontradas no peritônio, tendo seu número sido reduzido, isso teve reflexo significativo no número total de células. Uma última situação possível, é que os macrófagos foram ativados e deixaram o local onde se encontravam, em direção aos linfonodos mais próximos para apresentar antígenos. Ainda que isso ocorra, essa explicação parece a menos provável, pois não seriam muitos os macrófagos que deixariam a cavidade peritoneal, mas em número reduzido, o que provavelmente não seria notado com a metodologia utilizada por nós.

A participação do PAF nos eventos celulares que se seguiram após a administração dos venenos, mostrou que, a exemplo do que houve no edema, esse mediador atuou de maneira diferente em relação ao estímulo utilizado. Enquanto que o antagonista do PAF não interferiu no acúmulo de Mono 6 horas após a administração do vTs, houve uma diminuição no número total de células e de Mono quando o estímulo foi o vTb, mas nada ocorreu quanto aos PMN. Esse resultado foi inesperado, pois, como o vTb induziu migração de PMN, e em

outros modelos de inflamação o PAF geralmente está envolvido estimulando esse processo, esperávamos que o antagonismo de seus receptores resultasse em inibição da migração de PMN. No entanto, como descrito por Nourshargh *et al* (1995), dependendo do estímulo o PAF pode ou não ter participação na migração de neutrófilos; conforme esse estudo, quando o estímulo foi o tripeptídeo formilado (um produto bacteriano), o tratamento dos animais com um antagonista do PAF não teve efeito. A diminuição do número de Mono será discutida abaixo.

Vinte e quatro horas após o envenenamento com o vTb, o antagonismo do PAF não afetou o panorama do número de células, mas quando o veneno utilizado foi o vTs o antagonismo diminuiu ainda mais a quantidade total de células e de Mono, mas aumentou a quantidade de PMN. O decréscimo no número de Mono após o tratamento com o antagonista do PAF também ocorreu no envenenamento com o vTb após 6 horas. Assim, o PAF endógeno parece modular, depois de algum tempo após a sua produção, a ação de macrófagos peritoniais residentes, inibindo-os. Fecchio *et al* (1990) encontraram o mesmo efeito de antagonistas do PAF sobre células mononucleares peritoniais, mas estudando o processo em um modelo de tumor ascítico. Na observação desses autores (FECCHIO *et al*, 1990), aparentemente o PAF endógeno levou à produção de prostaglandina E<sub>2</sub> pelos macrófagos, que, por sua vez, atuou negativamente sobre os mesmos permitindo o crescimento tumoral. De fato, Goodwin e Webb (1980) demonstraram que o PAF induz a liberação de metabólitos da ciclooxigenase (como as prostaglandinas), o que, segundo Gebhardt *et al*, (1988), inibem a expressão da molécula CPH-II (um indicador de ativação) por macrófagos.

Além disso, a quantidade do PAF endógeno produzida também deve ser levada em conta, e lembramos que, na indução do edema de pata, aparentemente o vTs promoveu uma importante produção do PAF, enquanto o vTb não. PIGNOL *et al* (1987) mostrou que uma dose baixa do PAF induz a produção de IL-1 por monócitos estimulados por lipopolissacarídeo, enquanto uma dose alta a inibe. Se um mecanismo semelhante esteve em operação em nossos experimentos de migração celular, podemos supor que, nos animais desafiados com o vTb pode ter ocorrido uma baixa ou insignificante produção do PAF e, em contraste, uma alta produção de IL-1, resultando em influxo de PMN. Já nos animais desafiados com o vTs pode ter ocorrido uma alta produção de PAF e, portanto, baixa de IL-1, o que não foi suficiente para estimular a migração de PMN. Esse quadro no envenenamento com o vTs foi invertido quando o antagonista do PAF foi administrado, ou seja, menos PAF ocupando receptores, mais IL-1 produzida, resultando em migração de PMN após 24 horas. Já nos animais desafiados com o vTb, o tratamento como o antagonista do PAF não teve efeito

sobre a migração de PMN, que talvez estivesse em seu máximo. Por outro lado, 6 horas após a administração do vTb nos animais pré-tratados com WEB-2170, esses passaram a se comportar como os desafiados com ovTs, ou seja, houve uma MDR.

Nosso trabalho demonstrou que venenos de escorpiões da nossa fauna, pertencentes ao mesmo gênero, mas espécies diferentes, podem ter ações distintas. Esse fato possivelmente tem influência sobre o desfecho do acidente. Esperamos assim, termos contribuído para um melhor entendimento da fisiopatologia dos acidentes com escorpiões em nosso país.

## 6 CONCLUSÕES

1) os venenos estudados têm ação edematogênica local de igual monta, mas possivelmente mediada de maneira distinta;

2) enquanto o PAF provavelmente está envolvido no edema induzido pelo vTs, não teve participação quando o indutor foi o vTb;

3) o vTb é um importante indutor de neutrofilia na cavidade peritoneal, por outro lado, o vTs provavelmente tem uma ação muito importante na migração de mononucleares e na ativação destes, o que não implicou diretamente na migração de PMN;

4) na cavidade peritoneal, o PAF participou de maneira distinta da migração e, provavelmente, do estado de ativação celular induzidos pelos venenos.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HALEEM, A.A.; MEKI, A.M.A.; NOAMAN, H.A. e MOHAMED, Z.T. Serum levels of IL-6 and its soluble receptor, TNF- $\alpha$  and chemokine RANTES in scorpion envenomed children: their relation to scorpion envenomation outcome. **Toxicon**, v. 47, n. 4, p. 437-444, 15 de março de 2006.
- ABROUG, F.; EL-ATROUS, S.; NOUIRA, S.; HAGUIGA, H.; TOUZI, N.; BOUCHOUCHA, S. Serotherapy in scorpion envenomation: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 354, n. 9182, p. 906-909, 1999.
- ALLAITH, M.; WEYER, A.; HAVET, N.; DUMAREY, C.; VARGAFTIG, B.B.; BACHELET, M. Immunoglobulin-G-dependent stimulation of guinea-pig lung mast-cells and macrophages. **Allergy**, v. 48, n. 8, p. 608-614, 1993.
- AMARAL, C.F.S.; BARBOSA, A.J.A.; LEITE, V.H.R.; TAFURI, W.L. e REZENDE, N.A. Scorpion sting-induced pulmonary oedema: evidence of increased alveolocapillary membrane permeability. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 999–1003, 1994.
- AMITAI, Y. Clinical manifestations and management of scorpion envenomation. **Public Health Rev.**, v. 26, n.3, p. 257-63, 1998.
- ARANTES, E.C.; PRADO, W. A.; SAMPAIO, S.V. e GIGLIO, J.R. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom; isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. **Toxicon**, v. 27, n. 8, p. 907-916, 1989.
- ARANTES, E.C.; SAMPAIO, S.V.; VIEIRA, C.A. e GIGLIO, J.R. What is tityustoxin?. **Toxicon**, v. 30, n.7, p. 786-789, 1992.
- BARBOUCHE, M.R., HAGUIGA, H., NOUIRA, S., KRIFI, M.N., ABROUG, F., BOUCHOUCHA, S., DELLAGI, K. Inflammatory cytokines and scorpionic envenomation. Analysis of serological levels in Tunisian patients. **Toxicon**, v. 34, n. 2, p. 156, 1996.
- BARREIRO, O.; YÁÑEZ-MÓ, M.; SERRADOR, J.M.; MONTOYA, M.C.; VICENTE-MANZANARES, M.; TEJEDOR, R.; FURTHMAYR, H. e SÁNCHEZ-MADRID, F. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. **J. Cell Biol.**, v. 157, n.7, p. 1233-1245, 2002.

BARTH, M.W.; HENDRZAK, J.A.; MELNICOFF, M.J. e MORAHAN, P.S. Review of the macrophage disappearance reaction. **J. Leuk. Biol.**, v. 57, n. 3, p. 361-7, 1995.

BAWASKAR, H.S. e BAWASKAR, P.H. Clinical profile of severe scorpion envenomation in children at rural setting. **Indian Pedriath**, v. 40, n.11, p. 361-367, 1994.

BAWASKAR, H.S. e BAWASKAR, P.H. Treatment of cardiovascular manifestations of human scorpion envenoming: is serotherapy essential? **J. trop .Med .Hyg**, v. 94, n.3, p. 156-158-1040, 1991.

BAWASKAR, H.S. e BAWASKAR, P.H. Vasodilators: scorpion envenoming and the heart (an Indian experience). **Toxicon**, v. 32, n.9, p. 1031-1040, 1994.

BECERRIL, B.; CORONA, M.; CORONAS, F.I.V.; ZAMUDIO, F.; CALDERON-ARANDA, E.S.; FLETCHER, P.L.; MARTIN, B.M. e POSSANI, L.D. Toxic peptides and genes encoding toxin  $\gamma$  of the brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. **Biochem. J.**, v. 313, n.3, p. 753-60, 1996.

BECERRIL , B.; MARANGONI, S. e POSSANI, L.D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. **Toxicon**, v. 35, n.6, p. 821-35, 1997.

BEETON, C.; PENNINGTON, M.W.; WULFF, H.; SINGH, S.; NUGENT, D.; CROSSLEY, G.; KHAYTIN, I.; CALABRESI, P.A.; CHEN, C.Y.; GUTMAN, G.A. E CHANDY, K.G. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. **Mol. Pharmacol.**, v. 67, n.4, p. 1369-1381, 2005.

BENVENISTE, J.; HENSON, P.M. e COCHRANE, C.G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets: the role of IgE, basophils and a platelet activating factor. **J. Exp. Med.**, v. 136, n.6, p. 1356-7, 1972.

BENVENISTE, J., TENCE, M., VARENNE, P., BIDAULT, J., BOULLET, C., POLONSKY, J. Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (PAF): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine. **C. R. Seances Acad. Sci. D**, 289 (14): 1037-40, 1979.

BLANK, M.L., SNYDER, F., BYERS, L.W., BROOKS, B., MUIRHEAD, E.E. Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 90, n.4, p. 1194-200, 1979.



BLAUSTEIN, M.P; ROGOWSKI, R.S.; SCHNEIDER, M.J.; KRUEGER, B.K. Polypeptide toxins from the venoms of Old World and New World scorpions preferentially block different potassium channels. **Mol. Pharmacol.**, v. 40, n. 6, p. 932-942, 1991.

BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacol. Rev.**, v. 44, n.1, p. 80, 1992.

BORGES, C.M.; SILVEIRA, M.R.; BEKER, A.C.L.; FREIRE-MAIA, L. e TEIXEIRA, M.M. Scorpion venom-induced neutrophilia is inhibited by a PAF receptor antagonist in the rat. **J. Leuk. Biol.**, v. 67, n. 4, p. 515-9, 2000.

BUCARETCHI, F.; BARACAT, E.C.; NOGUEIRA, R.J.; CHAVES, A.; ZAMBRONE, F.A.; FONSECA, M.R. e TOURINHO, F.S. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 37, n. 4, p. 331-6, 1995.

BUSSOLINO, F.; CAMUSSI, G.; AGLIETTA, M.; BRAQUET, P.; BOSIA, A.; PESCARMONA, G.; SANAVIO, F.; D'URSO, N.; MARCHISIO, P.C. Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor induces changes in cytoskeleton structures. **J. Immunol.**, v. 139, n. 7, p. 2439-46, 1987.

CARMAN, C.V. e SPRINGER, T.A. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? **Curr.Opin.Cell.Biol.**, v. 15, n. 5, p. 547-556, 2003.

CARMAN, C.V. e SPRINGER, T.A. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. **J. Cell Biol.**, v. 167, n. 2, p. 377-388, 2004.

CALIXTO, M.C.; TRICHÊS, K.M. e CALIXTO, J.B. Analysis of the inflammatory response in the rat paw caused by the venom of *Apis mellifera* bee. **Inflamm. Res.**, v. 52, n. 3, p. 132-9, 2003.

CASALE, T.B. e CAROLAN, E.J. Cytokine-induced sequential migration of neutrophils through endothelium and epithelium. **Inflamm. Res.**, v. 48, n. 1, p. 22-27, 1999.

CHEN, B.; ZHUO, X.; WANG, C. e YOUNGHUA, J.I. Asian scorpion BmK venom induces plasma extravasation and thermal hyperalgesia in the rat. **Toxicon**, v. 40, n. 5, p. 527-533, 2002.

CHEN, C.R.; VOEKEL, N.F. e CHANG, S.W. Pulmonary vascular reactivity: effect of PAF and PAF antagonists. **J. Appl. Physiol.**, v. 73, n. 5, p. 1762, 1992.

CHO, S. e ATWOOD, J.E. Peripheral edema. **Am. J. Med.**, v. 113, n. 7, p. 580-586, 2002.

COSTA, S.K.P; YSHII, L.M.; POSTON, R.N.; MUSCARÁ, M.N.; BRAIN, S.D. Pivotal role of endogenous tachykinins and the NK1 receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absence of oedema formation, in response to TNF $\alpha$  in the cutaneous microvasculature. **J. Neuroimmunol.**, v. 171, n. 1, p. 99-109, 2006.

CUSS, F.M.; DIXON, C.M.S. e BARNES, P.J. Effects of inhaled platelet-activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. **Lancet**, v. 2, n. 8500, p. 189, 1986.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M. e HERING, S. E. **Escorpionismo**. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; FAN, F.W; MÁLAQUE, C.M e HADDAD Jr., V. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003.

CURRY, S.C.; VANCE, M.V.; RYAN, P.J.; KUNKEL, D.B. e NORTHEY, W.T. Envenomation by the scorpion *Centruroides sculpturatus*. **J. Toxicol.-clin. Toxicol.**, v. 21, n. 4, p. 417-449, 1984.

DANGERFIELD, J.; LARBY, K.; HUANG, M.T.; DEWAR, A. e NOURSHARGH, S. PECAM-1 (CD-31 homophilic interaction up regulates  $\alpha 6 \beta 1$  on transmigrated neutrophils in vivo and play s a functional role in the ability of  $\alpha 6$  integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 9, p. 1201-1211, 2002.

DE-MATOS, I.M.; TALVANIA,A.; ROCHAB, O.O.A.; FREIRE-MAIA, L.; TEIXEIRA, M.M. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by Tityus serrulatus venom in rats. **Toxicon**, v. 39, n. 6, p. 863-867, 2001.

DE MATOS, I.M.; ROCHA, O.A.; LEITE, R. e FREIRE-MAIA, L. Lung edema induced by Tityus serrulatus scorpion venom in the rat. **Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 118, n. 2, p. 143-148, 1997.

DEHESA-DÁVILA, M. e POSSANI, L.D. Scorpionism and serotherapy in Mexico. **Toxicon**, v. 32, n. 9, p. 1015-1018, 1994.

DEMOPOULOS, C.A.; PINCKARD, R.N.; HANAHAN, D.J. Platelet-activating factor. Evidence for 1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sng*lyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). **J. Biol. Chem.**, v. 254, n. 19, p. 9355-8, 1979.

DESHPANDE, S.B.; BAGCHI, S.; RAIN, O.P. e ARYYA, N.C. Pulmonary oedema produced by scorpion venom augments a phenyldiguanide-induced reflex response in anesthetized rats. **J. Physiol.**,v. 521, n. 2, p. 537-544, 1999.

D'SUZE, G.; MONCADA, S.; GONZÁLEZ, C.; SEVCIK, C.; AGUILAR, V. e ALAGÓN, A. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 41, n. 3, p. 367–375, 2003.

DINIZ, C.R.; PIMENTA, A.F.; NETTO, J.C.; POMPOLO, S.; GÓMEZ, M.V. e BOHM, G.M. Effect of scorpion venom from *Tityus serrulatus* (Tityustoxin) on the acetylcholine release and fine structure of the nerve terminals. **Experientia (Basel)**, v. 30, n.11, p. 1304-1305, 1974.

EICKSTEDT, V.R.D.; RIBEIRO, L.A.; CANDIDO, D.M.; ALBUQUERQUE, M.J. e JORGE, M.T. Evolution of scorpionism by *Tityus bahiensis* (Perty) and *Tityus serrulatus* Lutz and Mello and geographical distribution of the two species in the state of São Paulo – Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 2, n. 2, p. 92-105; 1996.

FATANI, A.J.; FURMAN, B.L. e ZEITLIN, I.L. The involvement of plasma kinins in the cardiovascular effects of *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom in anaesthetized rabbits. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 523-36, 1998.

FECCHIO, D.; RUSSO, M.; SIROIS, P.; BRAQUET, P.; JANCAR, S. Inhibition of ehrlich tumor in vivo by PAF-antagonists. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 12, n.1, p. 57-65, 1990.

FERREIRA, L.A., ALVES, E.W., HENRIQUES, O.B. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 31, n. 8, p. 941–947, 1993.

FOËX, B. e WALLIS, L. Scorpion envenomation: does administration of antivenom alter outcome? **Emerg. Med. J.**, v. 22, n. 3, p. 195-197, 2005.

FREIRE-MAIA, L. e CAMPOS, J. A. **Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning**. In: Natural Toxins-Characterization, Pharmacology and Therapeutics. ed. OWNBY, C. L. AND ODELL, G. V. , p. 139-159, 1989.

FREIRE-MAIA, L.; PINTO, C.I.; FRANCO, I. Mechanism of the cardiovascular effects produced by purified scorpion toxin in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 188, n. 1, p. 207-213, 1974.

FREIRE-MAIA, L. Peripheral effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom. **J. Toxicol. Toxin Ver.**, v. 14, n. 3, p. 423-35, 1995.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.A. e AMARAL, C.F.S. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. **Toxicon**, v. 32, n. 9, p. 1009-1014, 1994.

FREIRE-MAIA, L. e MATOS, I.M. Heparin or a PAF antagonist (BN 52021) prevents the acute pulmonary edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. **Toxicon**, v. 31, n. 9, p. 1207-10, 1993.

FREITAS JR, R.A. **Nanomedicine-1 Basic Capabilities**. Georgetown-USA: Landes Bioscience, 1999. Disponível em <http://www.nanomedicine.com/>. Acesso em 5 março de 2007, 13:00.

FUKUHARA, Y.D.M.; REIS, M.L.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; CUNHA, F.Q. e DONADI, E.A. Increased plasma levels of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 41, n. 1, p. 49-55, 2003.

FUKUHARA, Y.D.M.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; CUNHA, F.Q.C.; REIS, M.L. e DONADI, E.A. The kinin system in the envenomation caused by the *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 196, n. 3, p. 390-395, 2004.

GARCIA, J.G.; AZGHANI, A.; CALLAHAN, K.S. e JOHNSON, A.R. Effect of platelet activating factor on leukocyte-endothelial cell interactions. **Thromb. Res.**, v. 51, n. 1, p. 83-96, 1988.

GEBHARDT, B.M., BRAQUET, P., BAZAN, H. e BAZAN, N. Modulation of in vitro immune reactions by platelet activating factor and a platelet activating factor antagonist. **Immunopharmacol.**, v. 15, n. 1, p. 11-19, 1988.

GOODWIN e WEBB, D.R. Regulation of the immune response by prostaglandins. **Clin. Immun. Immunopath.**, v. 15, n. 1, p. 106-122, 1980.

GOYFFON, M.; VACHON, M. e BROGLION, N. **Epidemiological** and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. **Toxicon**, v. 20, n. 1, 337-344, 1982.

GWEE, C.E.; NIRTHANAN, S.; KHOO, H.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R.M. e CHEAH, L. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 9, p. 795–801, 2002.

HENDERSON, R.B.; HOBBS, J.A.; MATHIES, M.; HOGG, N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. **Blood**, v. 102, n.1, p. 328-35, 2003.

HONDA, Z.; NAKAMURA, M.; MIKI, I.; MINAMI, M.; WATANABE, T.; SEYAMA, Y., OKADO, H.; TOH, H.; ITO, K.; MIYAMOTO, T.; e T. SHIMIZU. Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. **Nature**, v. 349, n. 6307, p. 342, 1991.

HOREN, W.P. Insect and scorpion sting. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 221, n. 8, p. 894–898, 1972.

HUMPHREY, D.M.; MCMANUS, L.M.; HANAHAN, D.J. e PINCKARD, R.N. Morphologic basis of increased vascular permeability induced by acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. **Lab. Invest.**, v. 50, n. 1, p. 16-25, 1984.

ISMAIL, M.; OSMON, O.H.; IBRAHIM, S.A. e EL-ASMAR, M.F. Cardiovascular and respiratory responses to the venom from the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. **E. Afr. Med. J.**, v. 49, n. 4, p. 273-281, 1972.

ISMAIL, M.; OSMAN, O.H.; e EL-ASMAR, M.F. Pharmacological studies of the venom from the scorpion *Buthus minax* (L. Koch.). **Toxicon**, v. 11, n.1, p. 15-20, 1973.

ISMAIL, M.; GHAZAL, A. e EL-FAKAHANY, E.E. Cardiovascular effects of the venom from the scorpion *Buthus occitanus*, Amoreux. **Toxicon**, v. 18, n. 3, p. 327-337, 1980.

JOHNSON-LEGER, C.; AURRANT-LIONS, M. e IMHOF, B.A. The parting of the endothelium miracle, or simply a junctional affair? **J. Cell Sci.**, v. 113, n. 6, p. 921-933, 2000.

KAMATA, K., NUMAZAWA, T. e KASUYA, Y. Mechanisms of desensitization of vasodilatation induced by platelet-activating factor in hypertensive rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 301, n.3, p. 121-128, 1996.

KOO, G.C.; KOO, G.C.; BLAKE, J.T.; TALENTO, A.; NGUYEN, M.; LIN, S.; SIROTINA, A.; SHAH, K.; MULVANY, K.; HORA, D. JR.; CUNNINGHAM, P.; WUNDERLER, D.L.; MCMANUS, O.B.; SLAUGHTER, R.; BUGIANESI, R.; FELIX, J.; GARCIA, M.; WILLIAMSON, J.; KACZOROWSKI, G.; SIGAL, N.H.; SPRINGER, M.S. e FEENEY, W. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. **J. Immunol.**, v. 158, n. 11, p. 5120-5128, 1997.

KWASNIEWSKI, F.H., FREITAS, T. A., CONCEIÇÃO, I.M., ZULIANI, J.P. Mast cells are not activated by *Tityus serrulatus* venom (Tsv). **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 12, n. 2, p. 342, 2006.

LAHIRI, S.C. e CHAUDHURI, A.K.N. Release of kinin by the scorpion *Heterometrus bengalensis*. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 21, n.4, p. 198-202, 1983.

LAWRENCE, M.B. e SPRINGER, T.A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. **Cell**, v. 65, n. 5, p. 859-73, 1991.

LEAK, L.V. Interaction of mesothelium to intraperitoneal stimulation. I. Aggregation of peritoneal cells. **Lab. Invest.**, v. 48, n. 4, p. 479-91, 1983.

LEME, J.G.; PIMENTA, A.F.; RAULINO-FILHO, M.; DINIZ, C.R. Sensory nerves and inflammation: evidence for the release of a neurogenic permeability factor by tityustoxin. **J. Pathol.**, v. 124, n. 3, p. 165-76, 1978.

LINDBOM, L. e WERR, J. Integrin-dependent neutrophil migration in extravascular tissue. **Immunology**, v. 1, n. 14, p. 115-21, 2002.

LORANT, D.E.; PATEL, K.D.; MCINTYRE, T.M.; MCEVER, R.P. e PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. **J. Cell Biol.**, v. 115, n. 1, p. 223-34, 1991.

LORANT, D.E.; MCEVER, R.P.; MCINTYRE, T.M.; MOORE, K.L.; PRESCOTT, S.M. e ZIMMERMAN, G.A. Activation of polymorphonuclear leukocytes reduces their adhesion to

P-selectin and causes redistribution of ligands for P-selectin on their surfaces. **J. Clin. Invest.**, v. 96, n. 1, p. 171–182, 1995.

LOURENÇO, W. R.; CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L.; CUELLAR, O.; EICKSTEDT V. R. D.; BARRAVIERA, B. e KNOX, M. B. The evolution of scorpionism in recent years. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 2, n. 2, p. 121-134, 1996.

LORET, E. e HAMMOCK, B. **Structure and neurotoxicity of venoms**. In: BROWNELL, P. E POLIS, G. (Eds.). New York: Oxford, 2001.

McEVER, R.P. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 14, n. 5, p. 581-586, 2002.

MAGALHÃES, M.M.; PEREIRA, M.E.; AMARAL, C.F.; REZENDE, N.A.; CAMPOLINA, D.; BUCARETCHI, F.; GAZZINELLI, R.T. e CUNHA-MELO, JR. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 37, n. 8, p. 1155-1164, 1999.

MATOS, I M.; SOUZA, D.G.; SEABRA, D.G.; FREIRE-MAIA, L. e TEIXEIRA, M.M. Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 276, n. 3, p. 293-300, 1999.

MAYADAS, T.N.; JOHNSON, R.C.; RAYBURN, H.; HYNES, R.O.; WAGNER, D.D. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. **Cell**, v. 74, n. 3, p. 541-554, 1993.

MEKI, A.R., MOHEY-EL DEEN, Z.M. Serum interleukin 1 beta, interleukin-6, nitric oxide and alpha antitrypsin in scorpion envenomed children. **Toxicon**, v. 36, n. 8, p. 1851–1859, 1998.

MEKI, A-R.; MOHAMEDB, Z.M.M.; EL-DEEN, H.M.M. Significance of assessment of serum cardiac troponin I and interleukin-8 in scorpion envenomed children. **Toxicon**, v. 41, n. 9. p. 129–137, 2003.

MEKI, A.R.; NASSAR, A.Y.; ROCHAT, H. A bradykinin-potentiated peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Bhutus occitanus*. **Peptides**, v. 16, n. 8, p. 1359-1365, 1995.

MENCIA-HUERTA, J.M. e BENVENISTE, J. Platelet-activating factor (PAF-acether) and macrophages. II. Phagocytosis-associated release of PAF-acether from rat peritoneal macrophages. **Cell. Immunol.**, v. 57, n. 2, p. 281-292, 1981.

MENCIA-HUERTA, J.M.; LEWIS, R.A.; RAZIN, E. e AUSTEN, K.F. Antigen-Initiated release of platelet-activating factor (PAF-ACETHER) from mouse bone marrow-derived mast cells sensitized with monoclonal IgE. **J. Immunol.**, v. 131, n. 6, p. 2958-2964, 1983.

MESSAS, Y. e CANDIDO, D.M. Fotos das espécies *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*. In: Instituto Butantã material didático. **Material didático do Instituto Butantã**. V.1, n.4, 2007. Disponível em <http://www.butantan.gov.br/materialdidatico/numero4/numero4.htm> -instituto butanta. Acesso em: 30 maio 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Escorpionismo**. In Vigilância Epidemiológica Manual, diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ed. Brasília: FUNASA, 2001.

MIOTLA, J. M.; JEFFERY, P.K. e P. G. HELLEWELL. Platelet-activating factor plays a pivotal role in the in-duction of experimental lung injury. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 18, n. 2, p. 197–204, 1998.

MONAHAN, F.D. e NEIGHBORS, M. **Medical-Surgical Nursing Foundations for Clinical Practice**. Chicago: W.B.Saunders, 1998.

MURTHY, K.R. e HASE, N.K. Scorpion envenoming and the role of insulin. **Toxicon.**, v. 32, n. 9, p. 1041-1044, 1994.

NAKAJIMA, K.; MURAKAMI, M.; YANOSHITA, R.; SAMEJIMA, Y.; KARASAWA, K.; SETAKA, M.; NOJIMA, S. e KUDO, I. Activated Mast Cells Release Extracellular Type Platelet-activating Factor Acetylhydrolase That Contributes to Autocrine Inactivation of Platelet-activating Factor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 32, p. 19708-19713, 1997.

NASCIMENTO JR, E.B.; COSTA, K. A.; BERTOLLO, C.M.; OLIVEIRA, A.C. P.; ROCHA, L.T.S.; SOUZA, A.L.S.; GLÓRIA, M.B.A.; MORAES-SANTOS, T. e COELHO, M.M. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 585–593, 2005.

NIRTHANAN, S.; PIL, J.; ABDEL-MOTTALEB, Y.; SUGAHARA, Y.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; JOSEPH, J.S.; SATO, K. e TYTGAT, J. Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kappa-KTx1.3, a non-toxic homologue



of kappahefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. **Biochem. Pharmacol.** v. 69, n. 4, p. 669–678, 2005.

NOURSHARGH, S.; LARKIN, S.W.; DAS, A.; WILLIAMS, T.J. Interleukin-1-induced leukocyte extravasation across rat mesenteric microvessels is mediate by platelet-activating factor. **Blood**, v. 85, n. 9, p. 2553-2558, 1995.

NUNAN ,E.A.; MORAES , M.F.D.; CARDOSO , V.N.e MORAES-SANTOS, T. Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Life Sci.**, v. 73, n. 3, p. 319–325, 2003.

PESSINI, A.C; DE SOUZA, A.M; FACCIOLI, L.H; GREGORIO, Z.M; ARANTES, E.C. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. **Int Immunopharmacol.**, v. 3, n. 5, p. 765-774, 2003.

PIGNOL, B.; HENANE, S.; MENCIA-HUERTA, J.M.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M.; BRQUET, P. Effect of PAF-acether and its specific antagonist, BN 52021, on interleukin 1 (IL-1) synthesis and release by rat monocytes. **Prostaglandins**, v. 33, n. 6, p. 391-396, 1987.

POSSANI, L.D.; FLETCHER, P.L.; FLETCHER, D.; RODE, G.S.; MOCHCA-MORALES, J.; LUCAS, S.; CORONAS, F.V.; ALAGON, A.C. e MARTIN, B.M. Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Mem. Inst. Butantan**, v. 54, n. 2, p. 35-52, 1992.

POSSANI, L.D.; MERINO, E.; CORONA, M.; BOLIVAR, F.; BECERRIL, B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. **Biochimie**, v. 82, n.10, p. 861–868, 2000.

PETRICEVICH, V.L. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. **Mediators Inflamm.**, v. 11, n. 1, p. 23-31, 2002.

PETRICEVICH, V.L. e PEÑA, C.F. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Mediators Inflamm.**, v. 11, n. 3, p. 173-180, 2002.

PETRICEVICH, V.L. e LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators Inflamm.**, v. 1, n. 2, p. 39-49, 2005.

REVELO, M.P.; BAMBIRRA, E.A.; FERREIRA, A.P.; DINIZ, C.R. e CHAVEZ-OLORTEGUI, C.. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. **Toxicon**, v. 34, n. 10, p. 1119-1125, 1996.

ROSE, M.J. e PAGE, C. Glycosaminoglycans and the regulation of allergic inflammation. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 3, n. 3, p. 221-225, 2004.

SAMPAIO, S.V.; LAURE, C.J. e GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 21, n. 2, p. 265-277, 1983.

SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; RICCIOPO-NETO, E. e GIGLIO, J.R. Further characterization of toxins T1IV (TsTX III) and T2IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 663-672, 1991.

SHAH, K.; BLAKE, T. J.; HUANG, C.; FISCHER, P. e KOO, G.C. Immunosuppressive effects of a Kv1.3 inhibitor. **Cell. Immunol.**, v. 221, n. 2, p. 100-106, 2003.

SNYDER, F., BLANK, M.L.; JOHNSON, D.; LEE, T.C.; MALONE, B.; ROBINSON, M. e WOODARD, D.S. Alkylacetylgllycerols versus lyso-PAF as precursors in PAF biosynthesis and the role of arachidonic acid in PAF metabolism. **Pharmacol. Res. Commun.**, v. 18, n. 1, p. 33-41, 1986.

SOFER, S. e GUERON, M. Respiratory failure in children following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus*: hemodynamic and neurological aspects. **Toxicon**, v. 26, n. 10, p. 931-939, 1988.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 301-314, 1994.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. **J. Pathol.**, v. 200, n. 4, p. 448-464, 2003.

SUWA, T.; HOGG, J.C.; ENGLISH, D. e VAN EEDEN, S.F. Interleukin 6 induces demargination of intravascular neutrophils and shortens their transit in marrow. **Am. J. Physiol.**, v. 279, n. 6, v. H, p. 2954-60, 2000.

TAVARES DE LIMA, W.; KWASNIEWSKI, F.H.; SIROIS, P.; JANCAR, S. Studies on the mechanism of PAF-induced vasopermeability in rat lungs. **Prostagl. Leuk. Essent. Fatty Acids**, v. 52, n. 4, p. 245-9, 1995.

THE BURTON GOLDBERG GROUP. "**Edema.**" in *Alternative Medicine: The definitive Guide*. Tiburon: Future Medicine Publishing, 1999.

TYTGAT, J., CHANDY, K.G., GARCIA, M.L., GUTMAN, G.A., MARTIN-EAUCLAIRE, M.F., VAN DER WALT, J.J., POSSANI, L.D. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, n. 11, p. 444–447, 1999.

ULICH, T.R. DEL CASTILLO, J; GUO, K.Z. In vivo hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 108-110, 1989.

VALDEZ-CRUZ, N.A.; BATISTA, C.V.F.; POSSANI, L.D. Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, n. 8, p. 1453–1464, 2004.

VOLIN, M.V.; SHAH, M.R.; TOKUHIRA, M.; HAINES, G.K.; WOODS, J.M.; KOCH, A.E. RANTES expression and contribution to monocyte chemotaxis in arthritis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 89, n. 1, p. 44-53, 1998.

WILSON, J.M. The scorpion story. **Br. Med. J.**, v. 295, n. 6613, p. 1642–1644, 1987.

WELCH, J.H. e BATTY, C.S. 5-hydroxytryptamine content of some arthropod venoms and venom-containing parts. **Toxicon**, v. 1, n. 4, p. 165-173, 1963.

YOUNG, R.E.; THOMPSON, R.D.; NOURSHARGH, S. Divergent mechanism of action of the inflammatory cytokines interleukin 1- $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in mouse cremasteric venules. **Br. J. Pharmacol.**, v. 137, n. 8, p. 1237-1246, 2002.

ZAMUDIO, F.Z.; CONDE, R.; ARÉVALO, C.; BECERRIL, B.; MARTIN, B.M.; VALDIVIA, H.H.; POSSANI, L.D. The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by Imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 18, p. 11886–11894, 1997.

ZHIJIAN, C.; FENG, L.; YINGLIANG, W.; XIN, M. E WENXIN, L. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 348–355, 2006.

ZIMMERMAN, G.A.; LORANT, D.E.; MCINTYRE, T.M. e PRESCOTT, S.M. Juxtacrine intercellular signaling: another way to do it. **Am J Resp Cell Mol Biol.**, v. 9, n. 6, p. 573-577, 1993.

ZIMMERMAN, G.A., MCINTYRE, T.M., AND S.M. PRESCOTT. **The Lung**: Scientific Foundations. New York: R.G. Crystal , 1995.

**APÊNDICE – TABELA DEMOGRÁFICA**

| <b>Experimento</b>  | <b>n</b> |
|---|----------|
|   |          |
| Edema de pata induzido pelo vTs ( <b>figura 1</b> )   | 12*      |
| Edema de pata induzido pelo vTb ( <b>figura 1</b> )   | 10*      |
| Antagonismo do PAF no edema de pata induzido pelo vTs ( <b>figura 2, gráfico A</b> )  | 7        |
| Antagonismo do PAF no edema de pata induzido pelo vTb ( <b>figura 2, gráfico B</b> )  | 7        |
| Controles (grupo PBS) do efeito do vTs sobre o número de células na cavidade peritoneal – 6 horas ( <b>figura 3, gráfico A</b> )  | 5        |
| Avaliação do efeito do vTs (grupo vTs 200 µg/kg ip) sobre o número de células na cavidade peritoneal – 6 horas ( <b>figura 3, gráfico A</b> )   | 11       |
| Controles (grupo PBS) do efeito do vTs sobre o número de células na cavidade peritoneal – 24 horas ( <b>figura 3, gráfico B</b> )   | 6        |
| Avaliação do efeito do vTs (grupo vTs 200 µg/kg ip) sobre o número de células na cavidade peritoneal – 24 horas ( <b>figura 3, gráfico B</b> )  | 13       |
| Controles (grupo PBS) do efeito do vTb sobre o número de células na cavidade peritoneal – 6 horas ( <b>figura 4, gráfico A</b> )  | 5        |
| Avaliação do efeito do vTb (grupo vTb 200 µg/kg ip) sobre o número de células na cavidade peritoneal – 6 horas ( <b>figura 4, gráfico A</b> )   | 9        |
| Controles (grupo PBS) do efeito do vTb sobre o número de células na cavidade peritoneal – 24 horas ( <b>figura 4, gráfico B</b> )   | 6        |
| Avaliação do efeito do vTb (grupo vTb 200 µg/kg ip) sobre o número de células na cavidade peritoneal – 24 horas ( <b>figura 4, gráfico B</b> )  | 15       |
| Controles (grupo PBS) da avaliação do efeito do WEB-2170 (3 mg/kg ip) sobre o número de células da cavidade peritoneal de camundongos não envenados – 6 horas ( <b>tabela da página 33</b> )  | 5        |
| Avaliação do efeito do WEB-2170 (3 mg/kg ip) sobre o número de células da cavidade peritoneal de camundongos não envenados – 6 horas ( <b>tabela da página 33</b> )                           | 5        |
| Controles (grupo PBS) da avaliação do efeito do WEB-2170 (3 mg/kg ip) sobre o número de células da cavidade peritoneal de camundongos não envenados – 24 horas ( <b>tabela da página 33</b> ) | 5        |
| Avaliação do efeito do WEB-2170 (3 mg/kg ip) sobre o número de células da cavidade peritoneal de camundongos não envenados – 24 horas ( <b>tabela da página 33</b> )                          | 5        |

|   |            |
|---|------------|
| Controles (grupo vTs 200 µg/kg ip) do efeito do antagonismo do PAF sobre o efeito do vTs no número de células na cavidade peritoneal – 6 horas ( <b>figura 5, gráfico A</b> )   | 5          |
| Avaliação do antagonismo do PAF (grupo WEB-2170 + vTs 200 µg/kg ip) no efeito do vTs sobre o número de células na cavidade peritoneal – 6 horas ( <b>figura 5, gráfico A</b> )  | 6          |
| Controles (grupo vTs 200 µg/kg ip) do efeito do antagonismo do PAF sobre o efeito do vTs no número de células na cavidade peritoneal – 24 horas ( <b>figura 5, gráfico B</b> )  | 5          |
| Avaliação do antagonismo do PAF (grupo WEB-2170 + vTs 200 µg/kg ip) no efeito do vTs sobre o número de células na cavidade peritoneal – 24 horas ( <b>figura 5, gráfico B</b> ) | 7          |
| Controles (grupo vTb 200 µg/kg ip) do efeito do antagonismo do PAF sobre o efeito do vTs no número de células na cavidade peritoneal – 6 horas ( <b>figura 6, gráfico A</b> )   | 6          |
| Avaliação do antagonismo do PAF (grupo WEB-2170 + vTb 200 µg/kg ip) no efeito do vTs sobre o número de células na cavidade peritoneal – 6 horas ( <b>figura 6, gráfico A</b> )  | 8          |
| Controles (grupo vTb 200 µg/kg ip) do efeito do antagonismo do PAF sobre o efeito do vTs no número de células na cavidade peritoneal – 24 horas ( <b>figura 6, gráfico B</b> )  | 5          |
| Avaliação do antagonismo do PAF (grupo WEB-2170 + vTb 200 µg/kg ip) no efeito do vTs sobre o número de células na cavidade peritoneal – 24 horas ( <b>figura 6, gráfico B</b> ) | 6          |
| <b>Total de camundongos utilizados</b>  | <b>172</b> |

\*foram utilizados 5 animais para estudar o efeito da dose de 80 µg/kg do veneno (vTs ou vTb), e mais 7 como controle no experimento para avaliar a participação do PAF no efeito edematogênico do vTs, e 5 em relação ao vTb.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)