

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFISICA**

IVA TEREZA VAN FRAGA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TsTX NA
MICROCIRCULAÇÃO CEREBRAL DE RATOS JOVENS**

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Maio de 2010

Iva Tereza Van Fraga

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TsTX NA MICROCIRCULAÇÃO CEREBRAL DE RATOS JOVENS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, ICB – UFMG, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares.
Co-orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini.

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

MAIO de 2010

Apoio Financeiro

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq)
- Programa Institutos do Milênio 2005-2008. Instituto do Milênio para o Desenvolvimento de Fármacos Baseados em Toxinas Peptídicas.

Agradecimentos

- A DEUS pela fé, pelos sonhos e oportunidades para realizá-los.
- À minha família, especialmente à mamãe por tanto amor, força, exemplo de trabalho, abnegação, bondade, coragem e por sua paciência com mau-humor e grosserias, à você: melhor pessoa do mundo, minha mãe. Ao meu pai, pela infância em Uberaba, pela vovó maravilhosa, cheirosinha e mais fofa do mundo e por ter sido mais pai do que muitos que existem por aí. Aos meus irmãos, Renata e César, pelo companheirismo e por serem as pessoas maravilhosas que são, meus maiores fãs.
- Ao Marcelo, amor da minha vida: se DEUS me deu os sonhos, você me dá asas para fazê-los realidade.
- Ao Marcelinho, por fazer tudo mais difícil e mais animado.
- À querida professora e orientadora Dra. Juliana Carvalho Tavares, doutora não só academicamente, mas também como ser humano: à doutora mãe Juliana, que encanta com o carinho por seus filhos; à doutora Juliana profissional, que acreditou em mim quando muitas vezes eu achava que não conseguiria e me mostrou o caminho quando a jornada parecia impossível, assim como fazem os grandes mestres; à doutora Juliana amiga, que por sua garra e força já é um incentivo.
- Ao Rick, que me trouxe à UFMG e me mostrou sonhos tornando-se reais.
- À grande amiga Patty, que foi a semeadora desse projeto, com sua competência, brilhantismo e disponibilidade sempre tão reais e palpáveis. Patty, muito obrigada, você é um dos seres humanos mais maravilhosos que já conheci em toda minha vida.
- Aos amigos Hércules e Flávio, pela amizade, por me ajudarem sempre, pela disposição, pela sinceridade, pelo carinho, confiança e pelos risos que sempre me provocaram. Muito obrigada!!!

- À Daniela Rocha Fóscolo, um presente do mestrado, grande amiga, confidente e companheira que fiz nas aulas da pós.
- À Dani Fontes, amigona do peito, amigona dos segredos, amigona pra sempre!!!
- À Lu e a Maira, minhas futuras doutoras preferidas, amigas queridas, que tanto admiro e respeito.
- Às queridas do laboratório da professora Fátima, Lígia, Michelle e Vanessa que com sua disponibilidade e coleguismo fizeram a diferença.
- À Norinne pela paciência, boa vontade e disposição ao me ensinar ‘mil vezes’ o protocolo do azul de Evans.
- Ao Celso pelo bom humor, amizade, compromisso e à professora Lucíola que me mostraram definitivamente que o impossível é um lugar que não existe!!!
- À Maura, pelos conhecimentos estatísticos sempre tão bem vindos.
- Ao Professor Miguel e à professora Natascha, pelo carinho e disponibilidade.
- Ao Professor André por aceitar me co-orientar, pela disponibilidade e atenção.
- Ao Professor Márcio Flávio, pelo brilhantismo e pelas idéias sempre tão enriquecedoras.
- À professora Grace, pela atenção, pela disponibilidade e carinho.
- À professora Carol, pela disponibilidade.
- Ao professor Tasso Moraes-Santos e ao laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia da UFMG, por disponibilizar a toxina que tornou esse projeto possível.
- Ao Taquinho, pelo carinho e disponibilidade.
- À Rose, pela alegria, pela espontaneidade, pelo carinho e bondade acolhedores.
- A Professora Rosa Maria Esteves Arantes, pela colaboração na histologia.

- Às melhores amigas do mundo... Elaine, Ana Paula e Lu Melo....se amizade é uma expressão da divindade na Terra, carrego um pouco de Deus dentro de mim através de vocês.
- Aos colegas do NNC, pela presença.
- Aos animais, que tornam não só esse mais tantos projetos possíveis e mesmo sem saber mudam a história e a vida de tantas pessoas às custas de suas próprias vidas. Aos verdadeiros heróis da ciência, meu muito obrigada.
- À UFMG com suas tantas portas, gênios e conhecimentos tão reais e tão palpáveis. À CAPES e à FAPEMIG, por incentivarem e patrocinarem tantos projetos.

Se as coisas são estilhaços
Do saber do universo,
Seja eu os meus pedaços,
Impreciso e diverso.
Eles foram e não foram.

Fernando Pessoa

TUDO VALE A PENA SE A ALMA NÃO É PEQUENA.
Fernando Pessoa

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g/g}$ – micrograma por grama

μm – micrômetro

μl - microlitro

AahII - *Androctonus australis hector*

BHE – Barreira hematoencefálica

BSA – Albumina de soro bovino

CBZ – Carbamazepina

CEBIO-ICB - Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas

CETEA - Comitê de ética em Experimentação Animal

CSF – Fluido cerebrospinal

CLA - Antígeno Cutâneo Linfocitário

C3a – Complemento de fração 3

C5a – Complemento de fração 5

g - grama

HE – Hematoxilina-eosina

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

H_2SO_4 - Ácido sulfúrico

i.c.v. – Intracerebroventricular

i.m. – Intramuscular

i.p. - Intraperitonal

i.v. – Intravenosa

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IFN- γ – Interferon gama

kd – Constante de dissociação

ml – mililitro

mg - miligrama

mg/Kg – miligrama por Kilograma

nm – Nanômetro

Na Cl – Cloreto de sódio

OPD – Fenilenodiamina

pg – partes por grama

pg/ml – partes por grama por mililitro

PBS – tampão

PMSF – “Phenil metil sulfonyl Fluoride”

PAF - Fator Ativador Plaquetário

PSGL-1 - Glicoproteína Ligante da P-selectina

RANTES – “regulated upon activation normal T cells expressed and secreted”

s.c. – subcutâneo

sIL-6 – Receptor solúvel de interleucina 6

SNC – Sistema nervoso central

T. – Gênero Tityus

TNF – Fator de necrose tumoral

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

T₁VIII – Toxina tipo beta

TsTX – Tityustoxina

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

APOIO FINANCEIRO	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 ASPECTOS GERAIS	6
1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	7
1.3 MECANISMOS DE AÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO	10
1.4 BIODISTRIBUIÇÃO E PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DO VENENO E DA TstX	13
1.5 PAPEL DA TstX NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	13
1.6 TRATAMENTO DO ESCORPIONISMO	14
1.7 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	16
1.8 ENVENENAMENTO ESCORPIÔNICO <i>VERSUS</i> INFLAMAÇÃO	18
1.9 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E RECRUTAMENTO LEUCOCITÁRIO	21
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS:	28
4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	28
4.2 PROTOCOLOS PARA 2DL50 E ¼ DA DL50	28
4.2.1 ANIMAIS	28
4.2.2 TITYUSTOXINA (TstX).....	29
4.3 MICROSCOPIA INTRAVITAL.....	29
4.4 HISTOLOGIA (HEMATOXILINA - EOSINA E CRESIL VIOLETA).....	31
4.5 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE TNF- α CEREBRAL POR ELISA	32
4.5.1 PREPARO DO HOMOGENATO DE CÉREBRO DE RATO	32
4.5.2 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE TNF- α CEREBRAL POR ELISA	33
4.6 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR	34
4.7 PROTOCOLOS PARA ¼ DA DL50	34
4.7.1 MICROSCOPIA INTRAVITAL:	35
4.7.2 HISTOLOGIA (hematoxilina-eosina e cresil violeta)	35
4.7.3 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE TNF- α CEREBRAL POR ELISA	35
4.7.4 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR	35
4.8 AVALIAÇÃO PONDERAL AO LONGO DO TEMPO APÓS INJEÇÃO DE DOSE SUB LETAL DE TstX.....	35
5 RESULTADOS	38
5.1 MICROSCOPIA INTRAVITAL NA DOSE 2DL50	38
5.2 HISTOLOGIA (TstX 2DL50).....	40
5.3 DETERMINAÇÃO DE TNF-A POR ELISA PARA A DOSE DE 2DL50	42
5.4 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR	44
5.5 MICROSCOPIA INTRAVITAL ¼DL50.....	46
5.6 HISTOLOGIA (TstX ¼DL50).....	48
5.7 CRESIL VIOLETA	50
5.8 DETERMINAÇÃO DE TNF-A POR ELISA	51
5.9 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR	53
5.10 AVALIAÇÃO PONDERAL AO LONGO DO TEMPO APÓS INJEÇÃO S.C. DE TstX ¼ DA DL50.....	55
5.11 MICROSCOPIA INTRAVITAL PARA SETE DIAS (TstX ¼ DA DL50).....	57
5.12 HISTOLOGIA (TstX ¼ DA DL50, 7 DIAS)	59
6 DISCUSSÃO GERAL	62

7	CONCLUSÕES.....	70
	APÊNDICE I	85

Índice de Figuras

FIGURA 1 – CASOS DE ACIDENTES ESCORPIÔNICOS NO BRASIL E GRANDES REGIÕES, NO PERÍODO DE 2000 A 2008. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009.	9
FIGURA 2 – CASOS DE ACIDENTES ESCORPIÔNICOS NA REGIÃO SUDESTE, NO PERÍODO DE 2000 A 2008. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009	10
FIGURA 3 – TOPOLOGIA DE UM CSDV.	11
FIGURA 4: ESTRUTURA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA.....	17
FIGURA 5: MECANISMO DE RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS	23
FIGURA 6: IMAGEM DO RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS EM VIVO POR MICROSCOPIA INTRAVITAL DA MICROCIRCULAÇÃO CEREBRAL. (OBJETIVA 20X LD).....	31
FIGURA 7 – NÚMERO DE LEUCÓCITOS EM PROCESSO DE ADESÃO (A) E ROLAMENTO (B) NA MICROVASCULATURA DA PIA-MÁTER DE RATOS WISTAR MACHOS COM 21 DIAS DE IDADE APÓS A INJEÇÃO S.C. DE TSTX (2 DL50).	39
FIGURA 8- TÉCNICA DE HEMATOXILINA E EOSINA EM RATOS CONTROLE E INTOXICADOS COM TSTX (2DL50).....	41
FIGURA 9 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA TNF- α EM SOBRENADANTE DE HOMOGENATO DE CÉREBRO DE RATOS (N=6) WISTAR MACHOS COM 21 DIAS DE IDADE QUE RECEBERAM SALINA E TSTX (2DL50, s.c.).	43
FIGURA 10 – CONCENTRAÇÃO DO CORANTE AZUL DE EVANS EXTRAVASADO PARA O PARÊNQUIMA CEREBRAL DE RATOS WISTAR MACHOS COM 21 DIAS DE VIDA(N=6/GRUPO) APÓS A INJEÇÃO DE TSTX (2DL50).	45
FIGURA 11 – NÚMERO DE LEUCÓCITOS EM PROCESSO DE ADESÃO(A) E ROLAMENTO (B) NOS VASOS DA PIA-MÁTER DE RATOS WISTAR MACHOS (N=6/GRUPO E EM CADA TEMPO), COM 21 DIAS DE IDADE APÓS 4, 8 E 12 HORAS DE ADMINISTRAÇÃO $\frac{1}{4}$ DE TSTX, VIA SUB-CUTÂNEA.	47
FIGURA 12 –TÉCNICA DE HEMATOXILINA E EOSINA PARA COLORAÇÃO DE CÉREBRO DE RATOS WISTAR MACHOS COM 21 DIAS IDADE, APÓS RECEBEREM $\frac{1}{4}$ DA DL50 DE TSTX, SACRIFICADOS APÓS 8 HORAS.	49
FIGURA 13- TÉCNICA DO CRESIL- VIOLETA DO CÉREBRO DE RATOS WISTAR, MACHOS COM 21 DIAS DE IDADE, APÓS 8 HORAS DA INJEÇÃO S.C. DE TSTX NA $\frac{1}{4}$ DA DL50.	50
FIGURA 17- NÚMERO DE LEUCÓCITOS EM PROCESSO DE ADESÃO (A) E ROLAMENTO (B) NA MICROVASCULATURA DA PIA-MÁTER DE RATOS WISTAR MACHOS COM 21 DIAS DE IDADE APÓS SETE DIAS DA INJEÇÃO S.C. DE TSTX ($\frac{1}{4}$ DADL50).....	58
FIGURA 18 –TÉCNICA DE HEMATOXILINA E EOSINA PARA COLORAÇÃO DE CÉREBRO DE RATOS WISTAR MACHOS COM 21 DIAS IDADE, APÓS RECEBEREM $\frac{1}{4}$ DA DL50 DE TSTX, SACRIFICADOS APÓS SETE DIAS.	59

RESUMO

O envenenamento escorpiônico constitui um problema de saúde pública em países tropicais. As crianças são o grupo que apresentam os casos de maior gravidade. Estudos demonstram uma maior e mais rápida distribuição do veneno em animais jovens, provavelmente devido a uma maior permeabilidade da barreira hematoencefálica. O veneno do escorpião *Tityus serrulatus* é composto por vários componentes, proteicos e não proteicos, dentre eles a tityustoxina (TsTX), uma toxina peptídica do tipo alfa que atua no sítio 3 dos canais para sódio dependentes de voltagem, retardando sua inativação, considerada o componente de maior letalidade do veneno. O presente estudo avalia a ação desta toxina TsTX na microcirculação cerebral de ratos Wistar jovens (21 dias de vida) em diferentes doses (2DL50 e ¼ da DL50). Com relação à sobrevivência, os animais que receberam TsTX na dose de 2DL50, vieram a óbito em até 30 minutos. Por outro lado, os animais intoxicados com TsTX na dose de 1/4DL50 apresentaram 100% de sobrevivência, ao longo de toda a cinética avaliada (4h, 8h, 12h, e 7 dias). Através da técnica de microscopia intravital, observamos que a administração subcutânea de TsTX, nas doses de 2DL50 e ¼ da DL50, induz um aumento do rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação cerebral nos diferentes tempos, quando comparadas ao grupo controle (salina). Animais intoxicados com TsTX na dose de 2DL50 não apresentaram alterações morfológicas significativas, nem diferenças nos níveis de TNF- α cerebral, assim como na integridade da barreira hematoencefálica, quando comparados aos seus respectivos controles. Entretanto, os animais que receberam TsTX na dose de ¼ da DL50 apresentaram aumento do nível protéico cerebral de TNF- α . Além disso, pelas técnicas histológicas de H&E e cresil violeta, observamos alterações morfológicas nos cérebros dos animais intoxicados com TsTX (1/4DL50), tais como: edema, congestão vascular, células neuronais com retração citoplasmática e condensação da substância de Nissl. Em síntese, nossos dados sugerem que a TsTX, na dose de 1/4DL50, quando administrada por via subcutânea em ratos jovens, é capaz de induzir uma resposta inflamatória cerebral,

caracterizada por alterações morfológicas no parênquima, aumento do recrutamento de leucócitos e da produção de TNF- α .

ABSTRACT

The scorpion-venom syndrome is a wide public health matter in tropical countries. Children are more vulnerable than adults, presenting mainly severe cases. Previous studies have reported that the *Tityus serrulatus* scorpion venom has a higher and quicker tissue distribution in young rather than adult animals, probably due to difference in blood brain barrier permeability. *T. serrulatus* scorpion venom consists of a complex mixture of active components. Very few neurotoxins within the venom seem to trigger most symptoms of the envenomation. Namely, the principal two toxic fractions are the toxin gamma (a β -type toxin) and tityustoxin (TsTX, an α -type toxin). TsTX has been suggested as the major lethal component in the *T. serrulatus* venom. It binds to the site 3 of the voltage-gated sodium channel, slowing its inactivation and has higher affinity to the channel in its open state. Our study evaluates the TsTX effect in the cerebral microcirculation of young Wistar rats at different doses (2DL50 and $\frac{1}{4}$ DL50). Animals treated with lethal dose of TsTX (2DL50) survived for only 30 minutes. On the other hand, animals treated with TsTX $\frac{1}{4}$ DL50 showed 100% survival rate at different times (4h, 8h, 12h, e 7 days). Using intravital microscopy, we found an increase of leukocyte rolling and adhesion in brain microcirculation after subcutaneous TsTX administration (2DL50 and $\frac{1}{4}$ DL50). Animals treated with TsTX 2DL50 did not show morphological alterations, neither differences in cerebral TNF- α levels, and BBB integrity, when compared to control animals. However, animals injected with TsTX $\frac{1}{4}$ DL50 showed an increase in cerebral TNF- α protein levels. In addition, using different histological techniques, we observed cerebral morphological changes such as edema, vascular congestion, neuronal cytoplasmic retraction and Nissl's substance condensation. In summary, our results suggest that subcutaneous administration of TsTX ($\frac{1}{4}$ DL50) can induce a cerebral inflammatory response in young rats.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

Os escorpiões existem há cerca de 350 milhões de anos e sua morfologia pouco mudou desde essa época. Eles pertencem à ordem dos artrópodes e à classe dos aracnídeos. Quanto à classificação em famílias e gêneros existem inúmeras discussões a respeito (LOURENÇO, 2003). Uma das famílias mais importantes é a Buthidae por possuir espécies produtoras de venenos ativos sobre o homem (LOURENÇO, 2002), especialmente as pertencentes ao gênero *Tityus*.

No Brasil, o escorpião que possui a peçonha considerada mais tóxica é o *Tityus serrulatus*, também chamado escorpião amarelo. Ele tem hábitos noturnos e aparece principalmente nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Espírito Santo.

O escorpião amarelo possui fácil adaptação ao meio ambiente, podendo sobreviver sem comida por vários meses, mas sempre necessitando de água fresca (Bucherl, 1971). Além disso são capazes de se reproduzirem por partenogênese, ou seja, os óvulos se desenvolvem no interior do organismo materno, não necessitando de fertilização (Cândido e cols., 1999). O homem também promove ambientes favoráveis ao aparecimento do escorpião. O lixo e o entulho gerados pela ação antrópica propiciam o aparecimento de insetos e aranhas, constituintes principais da dieta escorpiônica (Queiroz, 1997). Com todos esses fatores a seu favor, nota-se grande explosão demográfica da espécie (Soares e cols., 2002), podendo ser visto em habitações humanas, lajes, túmulos, rodapés, porões (LUCAS e SILVA, 1992; TORRES e cols., 2002). Devido ao desenvolvimento de hábitos domiciliares e o crescimento desordenado das cidades é cada vez mais freqüente a presença de escorpiões em áreas urbanas.

Dados do Ministério da Saúde relatam que 56% dos acidentes com estes animais ocorrem em zonas urbanas e somente 34% em áreas rurais. Porém, é praticamente impossível e até mesmo indesejável, acabar com escorpiões e baratas devido ao desequilíbrio ecológico e, até mesmo, pela possibilidade de utilização de seu veneno como praguicida, existindo ainda estudos para sua utilização na terapêutica clínica. O melhor é afastá-los do nosso meio, aprender a evitá-los, saber prevenir e tratar os envenenamentos por suas picadas (Campolina e cols., 2006).

1.2 Aspectos Epidemiológicos

O número de notificações tem aumentado de 18.191 casos em 2001 para mais de 37.068 até março de 2009, com incidência anual de 19,5 casos para cada 100 habitantes. Os casos graves e óbitos concentram-se nos menores de 6 anos de idade. O prognóstico é melhor naqueles que na vigência de quadro sistêmico grave recebem atendimento até 6 horas após a picada (Ministério da Saúde/2009).

Em nosso país, o maior número de notificações é proveniente do Estado de Minas Gerais e São Paulo, responsáveis por 92,7 % do total dos acidentes em 2007 e 91,58 % em 2008, (Ministério da Saúde, 2009). Os principais responsáveis pelos acidentes pertencem ao gênero *Tityus* : a) *T. serrulatus*, responsável pelos acidentes de maior gravidade e por quase 100 % dos casos (Campolina e Dias, 2005; Cupo e cols., 2002; Campolina e Cardoso, 2000) b) *T. bahiensis* e, c) *T. stigmurus* (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE-FUNASA, 2001).

TABELA 1**Casos de acidentes por escorpiões. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2008**

Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Região Norte	418	680	947	1.380	1.603	1.917	2.043	2.011	2.025
Rondônia	31	54	63	133	167	191	143	77	68
Acre	8	6	16	21	30	28	48	65	79
Amazonas	9	20	41	85	119	166	186	126	176
Roraima	1	16	21	12	18	13	24	33	36
Pará	309	504	631	885	998	1.159	1.267	1.330	1.300
Amapá	11	12	57	78	102	117	149	150	95
Tocantins	49	68	118	166	169	243	226	230	271
Região Nordeste	7.802	8.515	10.402	10.478	13.132	16.143	19.051	19.108	16.709
Maranhão	19	34	63	86	90	132	159	142	137
Piauí	129	197	180	261	207	309	318	269	326
Ceará	8	270	363	341	620	867	563	633	458
Rio Grande do Norte	1.318	1.251	1.267	1.131	1.245	1.427	1.552	1.280	1.167
Paraíba	181	80	345	301	395	640	899	1.038	704
Pernambuco	545	860	1.230	2.185	3.744	4.361	6.837	6.812	4.467
Alagoas	2.527	2.082	2.378	2.102	2.322	2.249	2.599	2.874	3.263
Sergipe	6	15	28	16	40	48	129	255	256
Bahia	3.069	3.726	4.548	4.055	4.469	6.110	5.995	5.805	5.931
Região Sudeste	3.791	7.887	10.093	11.276	13.546	15.836	14.416	13.888	15.996
Minas Gerais	1.189	4.775	6.331	7.023	8.537	10.121	8.849	8.471	9.594
Espírito Santo	203	206	289	354	747	994	755	768	1.138
Rio de Janeiro	81	110	129	216	198	242	235	243	208
São Paulo	2.318	2.796	3.344	3.683	4.064	4.479	4.577	4.406	5.056
Região Sul	81	373	431	479	540	677	765	985	972
Paraná	10	278	269	346	381	516	557	728	715
Santa Catarina	59	83	124	104	107	109	149	189	196
Rio Grande do Sul	12	12	38	29	52	52	59	68	61
Região Centro-Oeste	612	733	891	873	1.245	1.366	1.349	986	1.366
Mato Grosso do Sul	6	25	44	35	79	138	159	115	252
Mato Grosso	15	86	126	128	265	277	306	369	400
Goiás	372	429	606	550	740	818	764	377	543
Distrito Federal	219	193	115	160	161	133	120	125	171
Brasil	12.704	18.188	22.764	24.486	30.066	35.939	37.624	36.978	37.068

Fonte: SINAN/SVS/MS

*Dados preliminares sujeito a revisão

Dados atualizados em: 09/07/2008 09/07/2008 09/07/2008 09/07/2008 09/07/2008 09/07/2008 09/07/2008 10/03/2009 26/03/2009

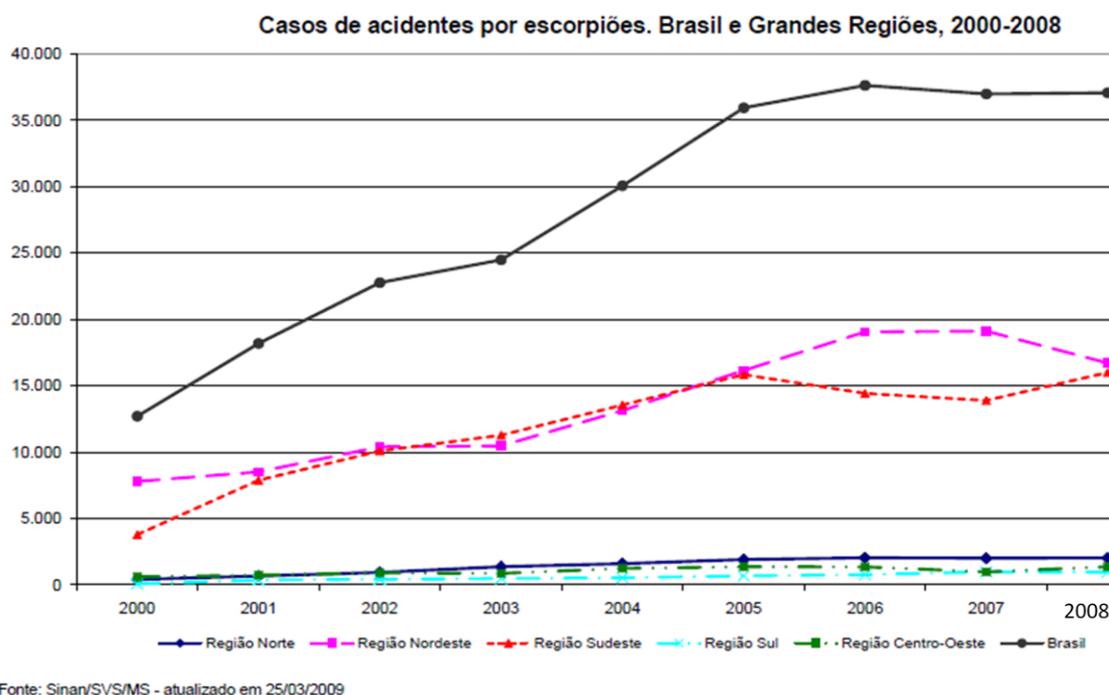


FIGURA 1 – Casos de acidentes escorpiônicos no Brasil e grandes regiões, no período de 2000 a 2008. Ministério da Saúde, 2009.

No Brasil, em torno de 37.068 acidentes escorpiônicos foram relatados até março de 2009 (TABELA1) e o maior índice de mortalidade ocorre em crianças, apesar dos acidentes serem mais frequentes em homens com idade entre 25 e 49 anos (Ministério da Saúde, 2009). Segundo um estudo clássico de Bücherl, os escorpiões apresentam prevalência importante na região metropolitana de Belo Horizonte, a qual foi construída sob solo escorpionífero (Bücherl, 1969). Dos 15.996 acidentes relatados na região Sudeste em 2008 (TABELA1), 9.594 ocorreram em Minas Gerais (Figs.1e2), e destes, aproximadamente 5.334, em Belo Horizonte e grande BH (Secretaria de vigilância epidemiológica, Ministério da Saúde, 2009).

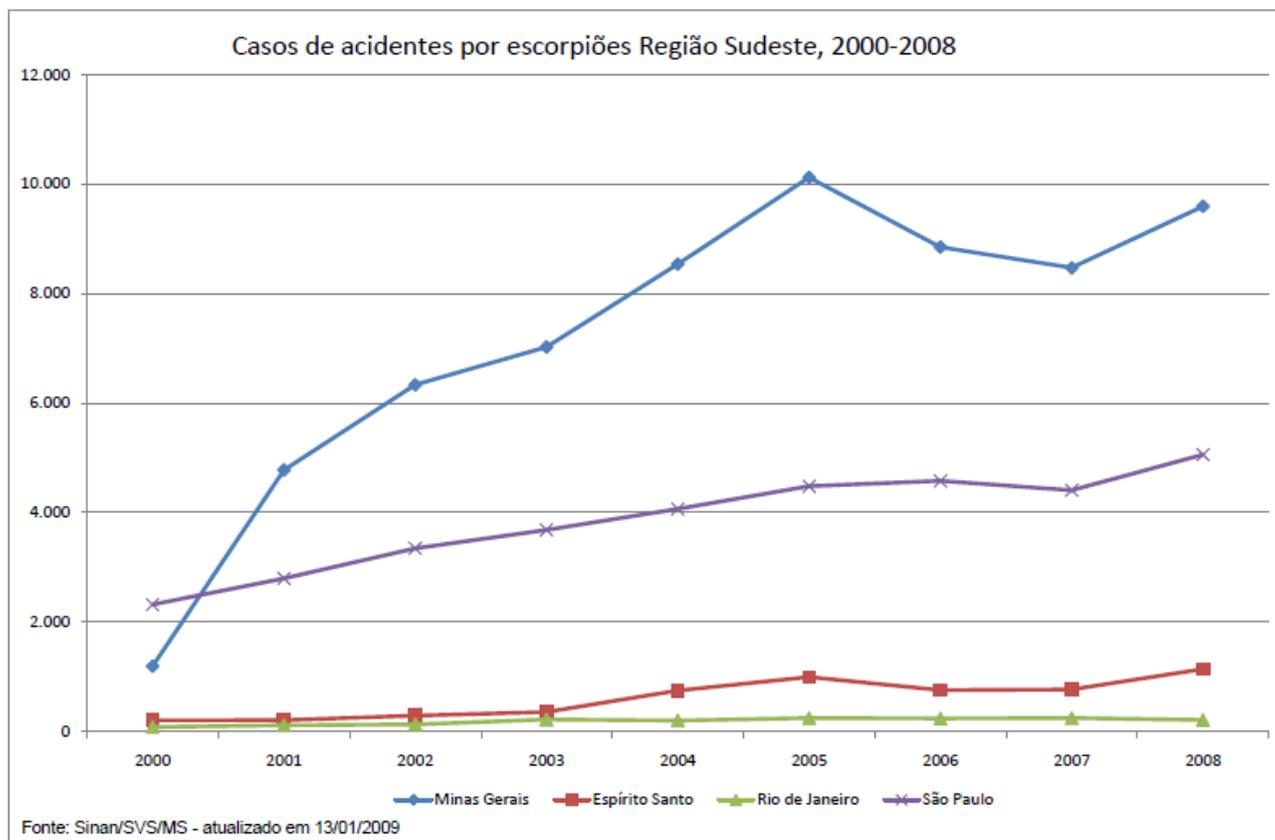


FIGURA 2 – Casos de acidentes escorpiônicos na região Sudeste, no período de 2000 a 2008. Ministério da Saúde, 2009

1.3 Mecanismos de ação das toxinas do veneno

A ação do veneno inicia-se poucos minutos após a picada (Freire-Maia e cols., 1994). O veneno é uma mistura de diferentes substâncias como histaminas, hialuronidases, serotonina e citocinas, além de peptídeos tóxicos que exercem suas ações em canais iônicos dependentes de voltagem (sódio, potássio, cálcio, cloreto) ocasionando um aumento da excitabilidade celular e conseqüente liberação de neurotransmissores (Becerril e cols., 1997). Há uma abertura prolongada dos canais iônicos aumentando a excitabilidade celular. Ocorre uma liberação maciça de epinefrina, norepinefrina, acetilcolina que são responsáveis pelas principais manifestações clínicas do escorpionismo (Magalhães e cols., 1999; Kalapothakis e Chaves-Olortegui, 1997; Diaz-Cueto e cols., 2001; Cupo e cols., 1994).

A peçonha do *Tityus serrulatus* contém dois principais tipos de neurotoxinas que atuam em sítios específicos de canais de sódio dependentes de voltagem (Barhanin e cols. 1982). Elas podem ser do tipo alfa e do tipo beta.

A TsTX, uma toxina do tipo alfa, é uma proteína básica de 63 aminoácidos totalmente seqüenciada, com massa molecular estimada em torno de 7200Da (Sampaio e cols., 1983). Liga-se ao sítio 03 dos canais de sódio dependentes de voltagem (Barhanin e cols., 1982). A estrutura geral preconizada para os canais de sódio está mostrada na Figura 3.

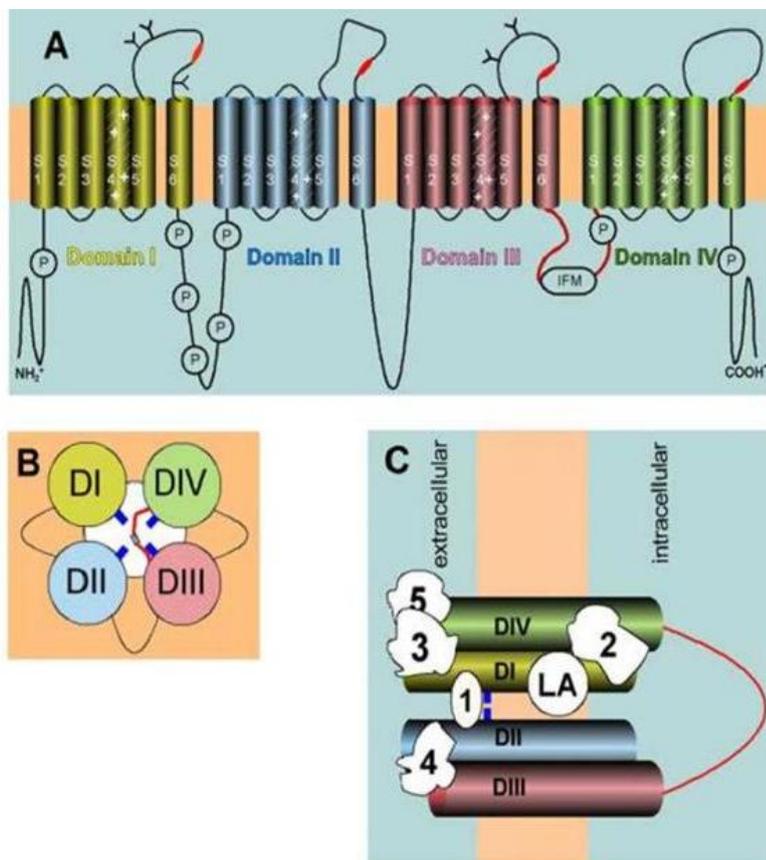


FIGURA 3 – Topologia de um Canal de Sódio Dependente de Voltagem-CSVD.

Na letra **A**, vemos a subunidade α do canal, com seus 4 domínios (I a IV), cada um deles com 6 segmentos transmembrana (S1 a S6). Na letra **B**, vemos esses 4 domínios circundando o poro do canal. Na letra **C**, estão esquematizados os sítios para a ligação a esses canais, sendo que o 3 é o de ligação da TsTX. Figura extraída e adaptada do trabalho de Denac e cols. (2000).

Fatani e cols. (2000) mostraram que a lignocaína, a qual bloqueia os canais de sódio dependentes de voltagem, foi eficiente em atenuar sintomas depois do envenenamento escorpiónico em coelhos, reduzindo a letalidade.

A TsTX age retardando a inativação destes canais, de forma que eles permanecem abertos por um tempo maior que o habitual, aumentando a permeabilidade da membrana ao sódio. Sob certos aspectos, esta ação pode mimetizar os efeitos da estimulação elétrica em neurônios (Warnick e cols., 1976), aumentando a liberação de neurotransmissores em uma variedade de preparações teciduais: glutamato (Romano-Silva e cols., 1994, Massensini e cols., 1998), acetilcolina (Casali e cols., 1995), GABA (Dorce e Sandoval, 1994) ou dopamina (Fernandes e cols., 2004). A constante de dissociação (Kd) do complexo TsTX-canal de sódio dependente de voltagem está em torno de 30 nM (Barhanin e cols., 1982), apresentando uma menor afinidade do que toxinas escorpiónicas do tipo beta (T₁VIII). Estudos mostram que venenos com maiores concentrações da toxina do tipo alfa são mais letais (Kalapothakis e Chavez-Olórtegui, 1997).

A T₁VIII, uma toxina do tipo beta, é uma proteína básica, composta por 61 aminoácidos com massa molecular em torno de 6675Da (Sampaio e cols., 1983). Liga-se ao sítio 4 dos canais de sódio dependentes de voltagem. Age aumentando a probabilidade de abertura desses canais em potenciais transmembrânicos mais negativos (Vijverberg e cols., 1984). Essa mudança aumenta a ocorrência de potenciais de ação com despolarizações menores de membrana, podendo haver disparos espontâneos. Esse complexo proteína – receptor possui uma estabilidade muito grande, apresentando uma constante de dissociação em torno de 2.3 a 5.5 pM (Barhanin e cols., 1982).

1.4 Biodistribuição e parâmetros farmacocinéticos do veneno e da TsTX

Uma distribuição rápida do veneno do escorpião é alcançada em todos os órgãos e tecidos após sua inoculação. Quando injetado por via intravenosa (i.v.) em animais adultos, atinge uma concentração máxima tecidual em 30 minutos (Ismail e Abdelsalam, 1988).

Têm sido demonstradas diferenças nos parâmetros farmacocinéticos do veneno em diferentes faixas etárias. Animais em desenvolvimento apresentam uma maior e mais rápida distribuição orgânica da toxina TsTX, bem como uma velocidade mais lenta de eliminação, quando comparados com animais adultos (Nunan e cols., 2003; Santana e cols., 1996). Esses resultados aliados ao fato de que a barreira hemato-encefálica é mais permeável em animais em desenvolvimento (Schulze e Firth, 1992), explicam as diferenças parcialmente observadas em crianças e adultos após o envenenamento escorpiônico.

1.5 Papel da TsTX no sistema nervoso central

As crianças desenvolvem sintomas mais graves de envenenamento, como manifestações cardiovasculares e neurológicas importantes, assim como maior potencial de evoluir para o óbito (Sofer e Gueron, 1998; Ismail, 1995; Diaz e cols., 2005; Vidal e cols., 2004; Roodt e cols., 2003).

A via de administração da TsTX é relevante na determinação dos sintomas. Mesquita e cols., (2003) mostraram que a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) da TsTX conduzia ao envenenamento escorpiônico severo na mesma dose na qual não tinha sido observados efeitos quando injetada por via venosa. Por outro lado, Mesquita e cols.(2002), também mostraram que a injeção intra-muscular (i.m.) de fenobarbital, um agonista gabaérgico, foi capaz de bloquear o edema induzido pelas injeções i.c.v. de TsTX sugerindo um importante efeito dessa fração da toxina do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* sobre o sistema nervoso central. Todos esses dados corroboram que a ação tóxica da TsTX no sistema nervoso central

desempenha um importante papel no envenenamento escorpiónico grave, assim como sua relação de maior gravidade dos envenenamentos em indivíduos com a barreira hematoencefálica em desenvolvimento ou comprometida (Guidine e cols., 2008). Assim, drogas neurotrópicas tendo como alvo a inibição da excitabilidade neural ou mesmo os canais de sódio dependentes de voltagem, os quais são alvos da TsTX, podem atuar como agentes terapêuticos no tratamento do envenenamento escorpiónico grave (Guidine e cols., 2008).

Embora, na literatura existam vários estudos referindo-se aos efeitos centrais e periféricos do envenenamento escorpiónico, Santana e cols.(1996), estudando os efeitos do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* (5µg/100g, s.c.) em animais anestesiados, relataram o achado de edema unilateral sem a presença de disfunção cardíaca, a qual corrobora a teoria do efeito central do veneno (Santana e cols., 1996).

1.6 Tratamento do escorpionismo

O soro antiescorpiónico é adotado no envenenamento grave e é indicado em 10% dos casos, sendo motivo de controvérsias nos últimos anos. O questionamento acerca da eficácia da soroterapia antiescorpiónica baseia-se no fato de que as imunoglobulinas constituintes do soro possuem peso molecular elevado, exibindo absorção e distribuição lentas (Abroug e cols., 1999; Hamed , 2003; Tarasiuk e cols., 1998). Em contraste, estudos mostraram que as toxinas constituintes do veneno, que possuem baixo peso molecular, são absorvidas e distribuem-se rapidamente para os órgãos e tecidos, com uma meia vida estimada em 2 a 6 minutos e uma concentração tecidual máxima atingida 30 minutos após a injeção i.v. (Ismail e Abdelsalam, 1988).

Tarasiuk e cols (1998) mostraram que a administração simultânea do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus* e do soro antiescorpiónico atenuaram os distúrbios hemodinâmicos normalmente evocados pelo veneno. Entretanto, um retardo na infusão da

terapia por 20-60 minutos não foi eficaz na atenuação desses efeitos. Por outro lado, Krifi colaboradores também não encontraram efeitos benéficos quando esse tratamento foi administrado (i.v.), a partir de 15 minutos após a injeção do veneno (Krifi e cols.,1998).

Outros estudos (Abrough e cols.,1999), relataram não efetividade na atenuação dos sintomas após a administração da soroterapia antiescorpiônica em pacientes após envenenamento escorpiônico, independente da gravidade clínica.

Assim, a soroterapia antiescorpiônica parece ser eficaz somente quando administrada precocemente a inoculação do veneno, em virtude de seus parâmetros farmacocinéticos peculiares. Um outro fator a ser considerado é que esse tratamento somente é encontrado em algumas unidades de saúde de grandes centros. Em Belo Horizonte, o único hospital que possui e administra o soro antiescorpiônico é o Hospital de Pronto Socorro João XXIII (Soares e cols., 2002). Além disso uma das dificuldades encontradas no tratamento do escorpionismo é o diagnóstico, muitas vezes tardio e impreciso (Chávez Olortegui et al., 1994).

Associada ou não a terapia antiescorpiônica, é empregada uma terapia adjunta / alternativa que trata a sintomatologia decorrente do envenenamento. De acordo com a mesma são empregados apenas analgésicos e antiinflamatórios nos casos mais leves, e em situações de comprometimento mais grave, a terapia consiste em medidas de suporte ventilatório e hidroeletrólítico, drogas antiarrítmicas, antiinflamatórios, analgésicos, anticonvulsivantes, antieméticos, antipiréticos, antihistamínicos, dentre outros, variando com o quadro sintomático apresentado pelo paciente (Hamed, 2003; Januário e Campolina, 1996).

Tem sido empregados alguns anticonvulsivantes no envenenamento escorpiônico como fenobarbital e alguns benzodiazepínicos. Essas drogas agem potencializando as sinapses gabaérgicas, através do aumento da condutância ao cloreto, em detrimento das sinapses

glutamatérgicas. O diazepam é mais utilizado que o fenobarbital, já que esse último pode induzir depressão respiratória (Hamed, 2003)

Estudo recente demonstrou, através da utilização da carbamazepina (CBZ), uma nova proposta de tratamento após envenenamentos escorpionicos graves experimentais, a qual reduziu a letalidade nos casos de envenenamento severos (Guidine e cols., 2008). A carbamazepina é uma droga que reduz a excitabilidade neural por modular a atividade os canais de sódio dependentes de voltagem sendo eficaz contra os sintomas observados após a injeção i.c.v. de TsTX. Este trabalho sugere que a morte por envenenamento escorpionico é primariamente uma consequência da ação do veneno no sistema nervoso central que sua ação periférica.

1.7 Barreira Hematoencefálica

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura funcional complexa composta de células endoteliais, pericitos, terminações astrocíticas e células neuronais (Fig.4). Consiste em uma estrutura especializada responsável pelo fluxo seletivo de substâncias entre o sangue e o cérebro. A permeabilidade seletiva da BHE é crucial para a manutenção da homeostase no microambiente cerebral, e alterações na barreira podem estar envolvidas em muitos processos fisiopatológicos. A característica morfológica principal dessa barreira é a presença das chamadas junções de adesão, do inglês - "*tight junctions*"- que estão presentes entre as células endoteliais e entre as células epiteliais do plexo coróide. Essas junções estão presentes em vasos sanguíneos desde o cérebro fetal e são efetivas em restringir a entrada de proteínas do sangue para o cérebro e fluido cérebro espinhal. Entretanto, algumas características das junções parecem surgir durante o desenvolvimento cerebral dos mamíferos (Saunders, 1992).

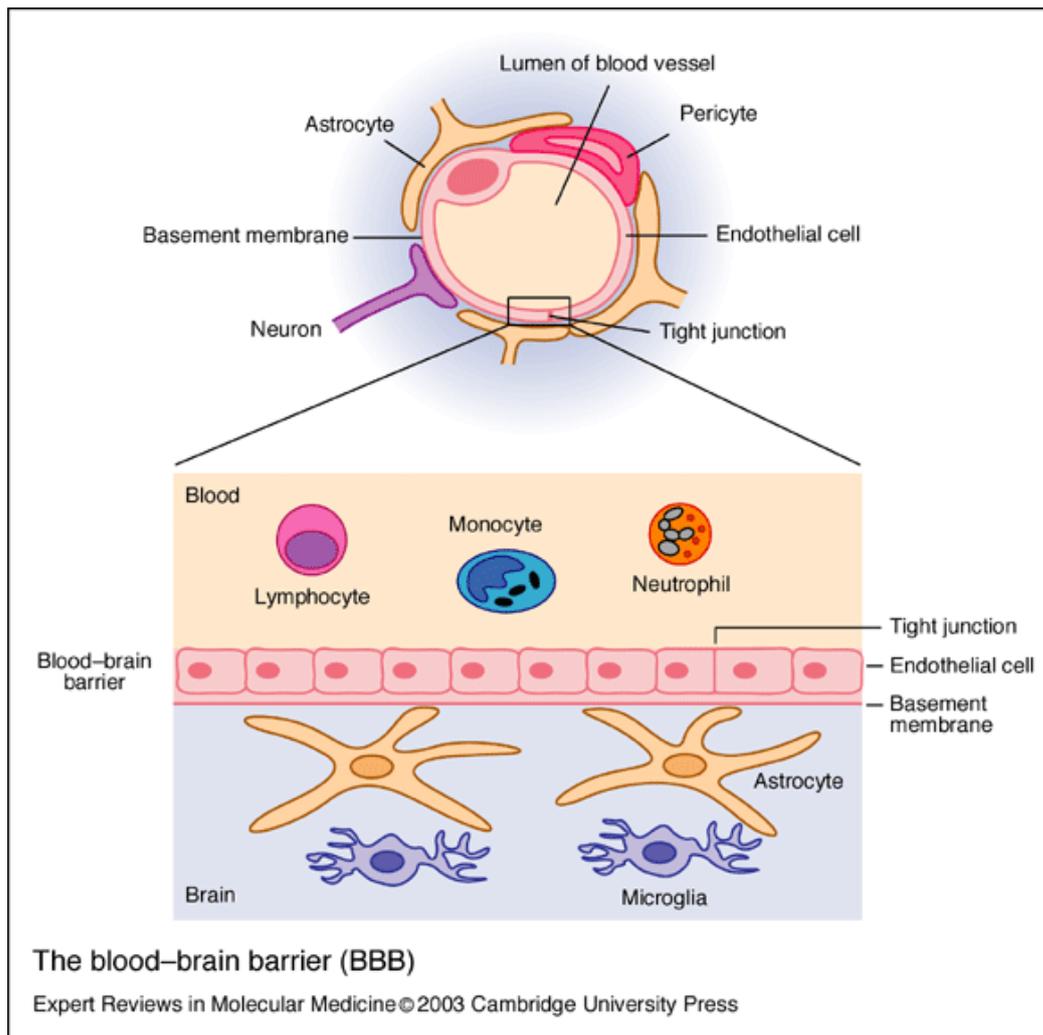


FIGURA 4: Estrutura da barreira hematoencefálica.

Experimentos clássicos com a barreira envolvem a injeção de corantes (como por exemplo, azul de tripan) e mostram que embora o corante penetre na maioria dos tecidos do corpo ele não cora o cérebro. Desta observação, surgiu a noção de que o cérebro seria protegido por uma barreira (Davson, 1995). Experimentos envolvendo a injeção de corantes em animais imaturos foram primeiro desenvolvidos por Wislocki e colaboradores (Wislocki e cols.,1920). Posteriormente, numerosos experimentos utilizando proteínas ou outros corantes mostram a fragilidade (ruptura) da mesma em animais jovens (Moos e Morgan, 1999).

Estudos anteriores demonstraram a presença de toxina marcada do escorpião *Androctonus australis Hector* (AahII), que também atua nos canais de sódio dependentes de

voltagem, no cérebro de camundongos recém nascidos e com 3, 7 e 14 dias de vida, após injeção sub-cutânea, sugerindo que nesta fase do desenvolvimento a barreira não estaria completamente desenvolvida (Clot-Faybess e cols., 2000). Adicionalmente, depois da injeção sub-cutânea da TsTX, Nunan e colaboradores mostraram a presença de toxina TsTX, marcada no cérebro de ratos jovens, e sugeriram um aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE) à TsTX de oito vezes em ratos em desenvolvimento, quando comparados com animais adultos (Nunan e cols.,2003).

Outros estudos mostraram que a injeção i.c.v. da toxina produzia sintomas, normalmente observados no envenenamento escorpiónico grave (Mesquita e cols.,2003).

Todos esses dados sugerem que gravidade dos envenenamentos em indivíduos jovens pode estar diretamente associada a passagem da toxina para o sistema nervoso central, através da barreira hematoencefálica imatura.

Em condições inflamatórias, a permeabilidade da barreira pode ser alterada, permitindo o desenvolvimento de resposta imune no SNC (Adams e cols., 2002).

1.8 Envenenamento escorpiónico *versus* Inflamação

Dados da literatura demonstram uma ação inflamatória sistêmica do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, porém não existem dados que demonstrem um processo inflamatório central (D'Suze e cols.,2003; Fukuhara e cols.,2003; Magalhães e cols., 1999; Petricevich e cols.,2004; Nencioni e cols.,2009).

Diversos estudos têm enfatizado a relevância da liberação de mediadores inflamatórios na fisiopatologia do envenenamento escorpiónico (Meki and Mohey El-Dean, 1998). O edema pulmonar induzido pela injeção intravenosa (0.5mg/kg, i.v.) do veneno bruto do escorpião *T.serrulatus* parece estar relacionado com a liberação de mediadores mastocitários, os quais aumentam a permeabilidade vascular (De Matos e cols.,1997).

Citocinas são produzidas por células imunes e não imunes, quando estas células são submetidas a alterações no ambiente celular e injúrias variadas, mediando as mais diversas fases do processo inflamatório. As citocinas desempenham um importante papel na fisiopatologia dos envenenamentos escorpiônicos podendo não só serem responsáveis pelas manifestações sistêmicas assim como pela falência de órgãos (Lomonte e cols., 1993; Magalhães e cols.1999; Petricevich, 2004).

Em estudos recentes (Fukuhara, e cols., 2004) têm-se demonstrado a participação de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), na fisiopatologia do envenenamento escorpiônico.

O aumento dos níveis de interleucinas (membro do grupo de citocinas) em pacientes picados por escorpiões da espécie *T.serrulatus*, sugere a ocorrência de uma síndrome semelhante à resposta inflamatória sistêmica (Fukuhara, e cols., 2003; D'Suze e cols., 2003). Magalhães e colaboradores avaliando dezessete casos de envenenamento escorpiônico entre leves e graves, observaram um aumento significativo nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias. A presença de citocinas inflamatórias, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interferon gama (IFN- γ), em amostras de sangue, foram significativamente maiores nos acidentes escorpiônicos graves (Magalhães e cols.,1999).

Poucos estudos têm focado no estudo das citocinas e outros agentes inflamatórios e sua relação com a gravidade do acidente escorpiônico. Estudos anteriores, demonstraram aumento significativo dos níveis séricos de TNF- α e IL-6 nos casos (Sofer e cols., 1996; Fukuhara e cols., 2003). Recentemente, Bahloul e colaboradores sugeriram que a gravidade do acidente escorpiônico estaria relacionada não só a disfunção cardíaca causada pela liberação de catecolaminas mas também pela presença de citocinas e/ou neuropeptídeo Y nos vasos coronarianos (Bahoul e cols., 2005).

O envolvimento de células do sistema imune em alterações fisiológicas observadas após envenenamento, começou a ser estudado na década de 70. Envenenamentos por outras espécies de escorpião conduzem a coagulação intravascular disseminada e agregação plaquetária (Devy e cols., 1970; Reddy e cols., 1972; Hamilton e cols., 1974; Longenecker and longenecker, 1981). Considerando esses dados, sugere-se que uma ação da epinefrina liberada secundariamente ao envenenamento conduziria a leucocitose e agregação plaquetária, contribuindo para síndrome de coagulação intravascular disseminada. (Longenecker and Longenecker, 1981; Beker e cols.,1983).

Nencioni e colaboradores, relatam que a despolarização causada pelo reconhecimento e ligação das toxinas escorpiônicas (α -toxinas, β -toxinas, as toxinas dos canais de sódio-NaTx, as toxinas dos canais de potássio-Ktx, toxinas dos canais de Cálcio) a seus sítios de ligação causa uma cascata de eventos inflamatórios como ativação do sistema de complemento e liberação de quimiocinas inflamatórias (RANTES) , as quais causam uma variedade de manifestações secundárias, conduzindo à morte após a injeção do veneno (Nencioni e cols., 2009). As células residentes no SNC, como astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e neurônios, quando recebem um estímulo inflamatório são capazes de expressar receptores funcionais de quimiocinas (Biber e cols., 2003).

Recentemente, demonstrou-se que após acidente escorpiônico grave, as crianças apresentam não só um aumento significativo de IL-6, do receptor solúvel de IL-6 (sIL-6), e de TNF- α , mas também da quimiocina RANTES (Abdel-Haleem e cols.,2006). RANTES têm sido encontrado em associação com o infiltrado inflamatório e está relacionado com a patogênese dos processos inflamatórios em envenenamentos (Krensky, 1999).

Outro parâmetro associado à resposta inflamatória e avaliado após envenenamentos escorpiônicos é a contagem de leucócitos no sangue. Em amostras de sangue de crianças observou-se um significativo aumento de leucócitos após envenenamentos escorpiônicos

leves, moderados e graves (Abdel-Haleem e cols., 2006) . Esta alta contagem de leucócitos pode ser explicada, em parte, pela grande liberação de catecolaminas induzida pelo veneno, as quais induzem a leucocitose e também a liberação de IL-6 que apresenta efeitos hematopoiéticos estimulantes (Dietch, 1992). As citocinas inflamatórias estimulam a leucocitose e a agregação plaquetária e leucocitária nos sítios de injúria (Hirano e cols., 1990). A leucocitose no envenenamento grave pode estar associada a liberação de radicais livres (ânions super óxidos) pelos leucócitos ativados o que levaria a uma hipóxia tecidual na microcirculação e culminaria com o quadro de falência múltipla de órgãos(Hirano e cols., 1990). Estudos demonstraram que todas as vítimas de envenenamento escorpiônico apresentavam leucocitose na admissão hospitalar (Sofer e cols., 1996; Abdel-Haleem e cols., 2006). A TsTX relaciona-se com outras manifestações sistêmicas, como edema pulmonar, hemólise, leucocitose, entre outras alterações clínicas, presentes no envenenamento moderado a grave (Bertazzi e cols., 2003).

Assim, o envenenamento escorpiônico parece envolver a proliferação e ativação de células do sistema imune periféricas, com liberação de citocinas pró-inflamatórias, fatores quimiotáticos, e outros mediadores vasoativos.

Portanto, observa-se uma ação importante do veneno do escorpião na cascata inflamatória agindo não só como agente neurotrópico mas também imunomodulador. (Fassbender e cols., 1993).

1.9 Mediadores inflamatórios e recrutamento leucocitário

Sob condições normais, os leucócitos são mantidos no interior dos vasos sangüíneos, onde o fluxo é rápido. Durante uma resposta inflamatória, ocorre a expressão seqüencial de diferentes moléculas de adesão no endotélio, envolvidas no recrutamento de leucócitos do

sangue para o espaço intersticial. É um processo multifásico, envolvendo uma seqüência de etapas controladas por moléculas de adesão, fatores de ativação e quimiocinas. As etapas da migração celular ocorrem geralmente nas vênulas pós – capilares e consistem de um contato inicial de leucócitos com a parede do vaso, rolamento destes ao longo do endotélio, seguido de uma adesão firme e migração trans-endotelial (Figura 5) (Piccio e cols.,2002). O termo recrutamento de leucócitos abrange todos os eventos que mobilizam a saída de leucócitos circulantes para o tecido inflamado.

Nas últimas décadas, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas interações leucócito-endotélio têm sido largamente investigados nos mais diversos tecidos e condições inflamatórias. A utilização da técnica de microscopia intravital para avaliar o recrutamento celular em modelos inflamatórios tem ampliado as informações a respeito deste processo (Ley, 2001). Entretanto, deve-se salientar que a primeira descrição do recrutamento de leucócitos durante o processo inflamatório, através da microscopia intravital, foi realizada há mais de um século por Cohnheim (Cohnheim, 1877 citado por Kubes & Kerfoot, 2001).

O mecanismo de rolamento é mediado por uma família de moléculas de adesão, glicoproteínas conhecidas como seletinas (P-seletina, E-seletina e L-seletina), que promovem uma fraca ligação inicial dos leucócitos às vênulas nos sítios de inflamação (Kerfoot & Kubes, 2002). Com o fluxo sanguíneo, após um primeiro contato com a parede do vaso, os leucócitos diminuem sua velocidade e começam a rolar ao longo da superfície endotelial, o que favorece as interações leucócito-endotélio (Kubes & Kerfoot, 2001). Posteriormente, os leucócitos podem ser ativados através da mudança conformacional das integrinas, moléculas presentes em sua superfície celular, (CD11/CD18, VLA-2, VLA-4, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 3\beta 1$) e, conseqüentemente podem aderir de forma estável ao endotélio via membros das superfamílias das imunoglobulinas (ICAM, VCAM, PECAM, MAdCAM) (Kerfoot & Kubes, 2002; Kubes, 2002).

A última etapa é a migração dos leucócitos através de espaços inter-endoteliais para o tecido extravascular, o que requer uma reorganização do citoesqueleto, com formação e retração dos pseudópodes. Moléculas presentes em junções intercelulares do endotélio, como PECAM-1(CD-3), também estão envolvidas na migração. Uma vez no tecido conectivo, os leucócitos aderem a matriz extracelular via integrinas $\beta 1$ e CD44 (Kerfoot&Kubes,2002).

O recrutamento de leucócitos também envolve a participação de quimiocinas, que agem sobre a expressão de moléculas de adesão e estão envolvidas na migração dirigida das células através de um gradiente de concentração (Ono e cols., 2003; Springer, 1995; Butcher and Picker, 1996).

As quimiocinas produzidas pelas células endoteliais ligam-se a moléculas de proteoglicanos, ambos na matriz extracelular e na superfície endotelial, propiciando um ambiente favorável ao recrutamento e migração de leucócitos (Springer, 1996).

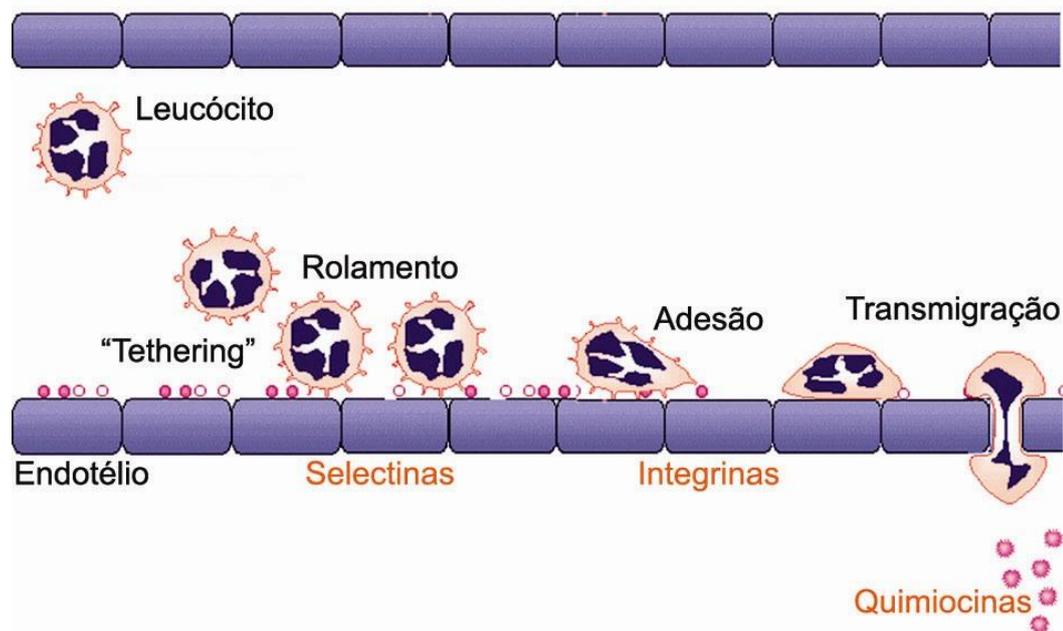


FIGURA 5: Mecanismo de recrutamento de leucócitos.

2 JUSTIFICATIVA

As toxinas de escorpião são ferramentas preciosas para entender o mecanismo de resposta neuronal excitatória e/ou inibitória. O escorpião *T. serrulatus* é considerado uma das espécies mais perigosas para os humanos no Brasil. A injeção de veneno de escorpião em animais de experimentação produz sinais sistêmicos e sintomas similares àqueles apresentados por intoxicação de humanos: hipertermia, agitação psicomotora, salivação, lacrimação, aumento da motilidade gastrointestinal, arritmias cardíacas e respiratórias, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, edema pulmonar e choque (Freire-Maia e Campos, 1989).

Estudos recentes tem sugerido uma hipótese neurogênica para as manifestações clínicas sistêmicas, observadas após envenenamento escorpiônico severo.

Por outro lado, há evidências que o edema pulmonar desencadeado após administração de veneno de escorpião *T. serrulatus*, está associado a ativação de uma cascata inflamatória com liberação de mediadores, tais como PAF, leucotrienos, prostaglandinas, e citocinas.

Embora já saibamos que o veneno bruto apresenta ação neurotóxica central, e também é capaz de estimular a função imune sistêmica, não há dados da literatura que demonstrem que acoplado aos efeitos neurotóxicos exista uma resposta inflamatória local, isto é, neurovascular.

Neste trabalho, foram avaliados diferentes aspectos moleculares e celulares de uma possível resposta inflamatória cerebral após intoxicação experimental por TsTX, em ratos jovens, tais como: recrutamento de leucócitos, alteração da barreira hematoencefálica, alterações neuromorfológicas e vasculares, e níveis de mediador inflamatório.

A avaliação da resposta inflamatória cerebral poderá contribuir para elucidar os mecanismos de comunicação neurônio-células do sistema imune induzidos pela TsTX em indivíduos jovens.

OBJETIVOS

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da toxina TsTX, em doses letais e sub-letais, na microcirculação cerebral de ratos jovens.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade de diferentes dosagens de TsTX em ratos jovens;
- Avaliar in vivo os processos de rolamento e adesão de leucócitos no endotélio vascular da pia-máter após a administração sub-cutânea da toxina, em doses letais e sub-letais, em diferentes períodos de tempo, através da técnica de microscopia intravital;
- Determinar as alterações histopatológicas cerebrais e o dano neuronal nos animais intoxicados e nos controles para cada dosagem de TsTX injetada e para cada período de tempo avaliado;
- Quantificar as possíveis alterações na permeabilidade vascular da BHE acarretadas pela TsTX em ratos jovens;
- Quantificar a síntese protéica do TNF alfa, em animais controle e intoxicados com dose letal e sub-letal;
- Correlacionar a intoxicação com doses sub-letais e possível retardo no ganho ponderal dos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS:

4.1 Considerações Gerais

Em todos os protocolos realizados, a toxina foi injetada em duas diferentes doses, 2DL50 e $\frac{1}{4}$ da DL50, de acordo com o trabalho de Nunan e colaboradores (Nunan e cols., 2001). Seus efeitos sobre os animais foram avaliados em diferentes tempos para a dosagem de $\frac{1}{4}$ da DL50. A dose de 2DL50 corresponde a duas vezes a dose para matar 50% dos animais. A injeção de 2DL50 por via subcutânea induz o óbito em 30 minutos. Dessa forma, utilizamos a dosagem de $\frac{1}{4}$ da DL50, por ser uma dose em que os animais permanecem vivos por um tempo maior, possibilitando uma melhor avaliação dos parâmetros imunofisiológicos propostos. Inicialmente, descreveremos os protocolos realizados com a dose de 2DL50, seguidos dos mesmos protocolos com $\frac{1}{4}$ da DL50, com avaliação dos efeitos em diferentes tempos após a injeção de TsTX. A DL50 corresponderia aproximadamente a uma dose de 3mg/kg de toxina necessário para matar 50% da população de animais.

4.2 Protocolos Para 2DL50 e $\frac{1}{4}$ da DL50

4.2.1 ANIMAIS

Em todos os protocolos, utilizamos ratos Wistar machos, pesando entre 35-50g, com 21 dias de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO-ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos com a mãe, permanecendo em amamentação exclusiva até 21 dias de vida. A rata progenitora recebeu água e ração *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em grupos de seis animais/gaiola. Foram mantidos à temperatura de 22°C ($\pm 1^\circ$), em ciclo claro escuro de 12 horas (8:00 às 20:00). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), protocolo número 005/09.

4.2.2 TITYUSTOXINA (TsTX)

A toxina utilizada neste estudo, a TsTX, foi obtida a partir do veneno bruto do escorpião *T. serrulatus*, de acordo com a metodologia descrita por Sampaio e cols. (1983). A toxina foi gentilmente cedida pelo Professor Dr. Tasso Moraes-Santos, do laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia da UFMG.

A toxina, na forma liofilizada, foi diluída em solução salina (0,9%). Sua concentração foi determinada através da espectrofotometria (absorbância 280 nm), em duplicata, para diluições de 1/50 e 1/25. A constante de conversão (0,48) foi obtida pelo método de dosagem de proteínas descrito por Lowry e colaboradores (Lowry e cols., 1951). A toxina foi injetada por via subcutânea (s.c.) nas doses de 6 mg/Kg (2DL50) e de 0,75mg/kg (¼ da DL50) , doses letais e sub-letais, respectivamente.

4.3 Microscopia Intravital

Utilizamos 12 ratos Wistar, subdivididos em 2 grupos experimentais: 6 animais injetados com salina (grupo controle) e 6 animais injetados com TsTX (grupo TsTX; 2DL50). Os animais do grupo controle receberam, pela via s.c., o mesmo volume de salina correspondente ao volume de toxina injetado nos animais envenenados (0,1ml).

Para a visualização da microvasculatura cerebral por microscopia intravital, realizamos as seguintes etapas: anestesiámos os animais via i.p. com uma mistura de Xilazina (10 mg/kg, *Rompun*[®], Bayer) e ketamina (150 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP). A veia da cauda foi canulada para a administração do corante rodamina 6G (*SigmaPharm*, SP) e volumes adicionais de anestésico, quando necessário. A rodamina 6G é um corante fluorescente, com a habilidade de marcar mitocôndrias de leucócitos e plaquetas seletivamente. Devido a esta propriedade, o corante tem sido usado para o estudo de leucócitos em ensaios de microscopia intravital, com o objetivo de examinar a cinética *in vivo*

destas células, mesmo na presença de uma alta velocidade de fluxo. A temperatura corporal dos animais foi continuamente monitorizada com um sensor e mantida a 37°C com uma manta térmica (*Fine Science Tools*, Canadá), posicionada em contato com o corpo do animal. A craniotomia foi realizada na região parietal utilizando uma mini-broca (*Dremel*, USA). A dura-máter e a aracnóide foram removidas, sendo formada uma janela para a visualização dos vasos sanguíneos da pia-máter. Este procedimento não rompe a barreira vascular cerebral. A superfície cerebral dos animais foi continuamente superfundida com uma solução de fluido cerebrospinal (aCSF) artificial à temperatura de 37 °C, pH 7,35, que mantém a preparação estável, sem evidência de inflamação no nível basal.

Um microscópio (*Zeiss Imager M.2*), com objetiva 20X-LD, foi utilizado para observar os eventos microcirculatórios nos vasos da pia-máter. Após a localização dos vasos que foram estudados, injetamos uma pequena quantidade (0,5 mg/kg) da rodamina 6G (i.v.). A fluorescência associada à rodamina 6G foi visualizada com epi-iluminação a 510-560 nm usando-se um filtro de emissão de 590 nm. O número de leucócitos em rolamento e adesão foi determinado em uma área determinada (100 µm). O rolamento de leucócitos é definido como células se movendo a uma velocidade menor do que o fluxo sanguíneo. Os leucócitos são considerados aderidos quando permanecem estacionários ao endotélio por um período de 30 segundos (**Figura 6**). O rolamento, por ser um processo dinâmico, foi expresso como número de células/minuto. A adesão leucocitária foi expressa como células aderidas por área (100µm).

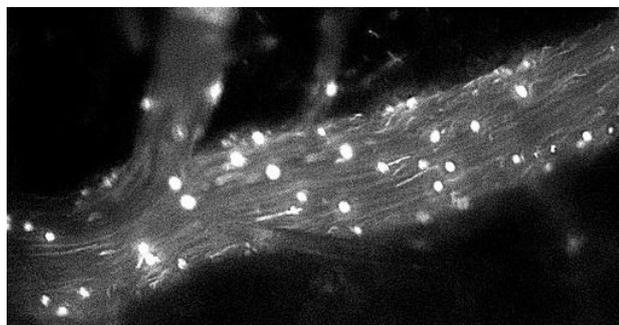


FIGURA 6: Imagem do recrutamento de leucócitos em vivo por microscopia intravital da microcirculação cerebral. (objetiva 20X LD).

4.4 Histologia (Hematoxilina - Eosina e Cresil violeta)

Os cérebros dos animais utilizados para a microscopia intravital, seis controles e seis injetados com doses letais de TsTX, foram imediatamente retirados e preservados em formol.

Para avaliar a cinética das alterações histopatológicas cerebrais nos animais que receberam TsTX e animais controle, os cérebros foram coletados e fixados por imersão em solução de formol tamponado a 4%, pH 7.2, com o objetivo de preservar a morfologia e a composição do tecido. Após o período de fixação, os tecidos foram recortados e seccionados transversalmente. A cada animal foi dado um código que apenas foi revelado ao final de todas as análises. A coloração HE foi realizada nas lâminas com cortes do tecido cerebral (6µm espessura) para uma observação geral das alterações histopatológicas.

Além da coloração HE, foi realizada a coloração pelo método do Cresil Violeta no tecido cerebral, o qual permite a identificação do dano neuronal. Para a realização desta coloração, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas, assim como na coloração pela HE. Depois, foram coradas pelo Cresil Violeta por dez minutos e diferenciadas em solução tampão

ácido acético/acetato, por tempo variável (observação visual) até a descoloração parcial das estruturas. Em seguida, as lâminas foram colocadas na estufa a 60 °C para secagem e montagem.

4.5 Dosagem dos níveis de TNF- α cerebral por ELISA

4.5.1 PREPARO DO HOMOGENATO DE CÉREBRO DE RATO

Utilizamos 12 ratos Wistar, divididos em 2 grupos: 6 ratos injetados com salina (grupo controle) e seis ratos injetados com TsTX (grupo TsTX). Imediatamente após o óbito do animal, que ocorria em média 27 a 30 minutos após o envenenamento, os cérebros foram removidos, pesados e colocados na solução para extração de citocina, contendo:

- 500 ml de PBS,
- 11,7 Na Cl,
- 250 μ l de Tween 20,
- 2,5g de BSA,
- 8,5 mg de PMSF(Phenil metil sulfonil Fluoride)
- 22,4 mg de cloreto de benzetônio
- 186 mg de EDTA
- 10 μ l de aprotinina

A seguir, homogenizamos o tecido cerebral utilizando a solução para a extração de citocinas (1,0 ml desta solução/100mg de cérebro). A continuação, centrifugamos os homogenatos, a 10000rpm por 10 min, a 4°C. Coletamos o sobrenadante e estocamos a 20°C até a realização do ensaio de ELISA.

4.5.2 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE TNF- α CEREBRAL POR ELISA

O kit para ELISA para dosagem da citocina TNF- α foi obtido da R&D Systems (DuoSet) e utilizado de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. A concentração da citocina TNF- α foi avaliada no homogenato de cérebro em diluição 1:3 em PBS contendo 0,1% de soro albumina bovina (BSA). Em placa de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville), foram adicionados 100 μ l/poço do anticorpo de captura, sendo este específico para a molécula e em concentração adequada. Esta solução permaneceu em contato com a placa durante 18 h a 4°C e foi, posteriormente, lavada cinco vezes com PBS/Tween 0,1%, utilizando pipeta multicanal. Logo após, foram adicionados 300 μ l/poço de solução de bloqueio (PBS/BSA 1%). O tempo de bloqueio foi de duas horas sob agitação, à temperatura ambiente. Transcorrido este tempo, houve nova lavagem da placa e 100 μ l de cada amostra foram adicionados à placa. Paralelamente, para o estabelecimento de cada curva padrão, foram utilizadas diferentes diluições da citocina, a partir da concentração inicial de TNF- α , 2000 pg/mL. A placa foi incubada por mais 18 h a 4°C, e a seguir foi lavada e, a solução de anticorpo de detecção, biotinizado específico para a molécula foi adicionado (100 μ l/poço). A placa foi incubada por uma hora e então lavada. Transcorrida esta etapa, foi adicionado em cada poço uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (HRP, Pharmingen). Após 30 minutos a placa foi novamente lavada e então foi adicionado o tampão substrato contendo fenilenodiamina (OPD, sigma) e H₂O₂ (Merck). Após cerca de 30 minutos, a reação foi interrompida com 50 μ l de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em leitor de placas a 492nm (Molecular Devices, USA). A concentração referente a amostra foi calculada a partir da curva padrão correspondente.

4.6 Avaliação da permeabilidade vascular

Utilizamos 12 ratos Wistar, divididos em dois grupos, subdivididos da mesma forma que nos protocolos descritos anteriormente.

Para a avaliação da permeabilidade da BHE, foi utilizado o corante azul de Evans como um marcador do extravasamento de albumina, como descrito previamente por Belayev *e cols.*, (1996), em protocolo modificado. O método consistiu na determinação espectrofotométrica da quantidade de azul de Evans extravasado para o parênquima cerebral.

Posteriormente, canulamos a veia da cauda e administramos 0,2 ml de Azul de Evans (2%), por via i.v.. Ao final de meia hora, sacrificamos os animais e perfundimos os animais através da veia da cauda, previamente canulada, com salina fisiológica (5,0 ml por animal). Retiramos o cérebro e o colocamos numa placa de Petri para secagem em estufa por 48 horas a 40 °C. Em seguida, pesamos as amostras e acrescentamos 1ml de formamida para extração do corante por 48 horas. Quantificamos o corante extraído do tecido em leitor de ELISA (650nm; Molecular Devices,USA) e determinamos a concentração através de uma curva padrão com concentração inicial 20 pg/ml de Azul de Evans. O resultado da leitura espectrofotométrica foi normalizado e expresso em pg de Azul de Evans por 100mg de tecido seco.

4.7 Protocolos Para ¼ da DL50

Após a injeção de ¼ da DL50, observamos os sinais iniciais típicos do envenenamento, como ereção de pêlos, agitação e salivação, indicando a ação tóxica da TsTX. Essa dose não é letal, o que nos permitiu realizar as análises em diferentes tempos após a injeção da toxina. Os tempos padronizados para as análises foram quatro, oito e doze horas após o envenenamento. Assim, esses protocolos foram realizados com 36 ratos Wistar, divididos em 6 grupos, injetados com salina ou TsTX e sacrificados 4, 8 ou 12 horas após a

injeção (6animais em cada grupo). Este delineamento experimental pode ser visualizado no diagrama I do apêndice I.

Adicionalmente, realizamos outro protocolo com essa mesma dose de TsTX ($\frac{1}{4}$ DL50), mas com avaliação dos animais 7 dias após a injeção da toxina. Este experimento é descrito separadamente ao final da parte metodológica.

4.7.1 MICROSCOPIA INTRAVITAL:

Ver descrição deste protocolo no item 4.3 dessa dissertação.

4.7.2 HISTOLOGIA (hematoxilina-eosina e cresil violeta)

Utilizamos os mesmos animais do protocolo de microscopia intravital. Ver descrição da metodologia no item 4.4 dessa dissertação.

4.7.3 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE TNF- α CEREBRAL POR ELISA

Ver descrição da metodologia no item 4.5 dessa dissertação.

4.7.4 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR

Ver descrição da metodologia no item 4.5 dessa dissertação.

4.8 Avaliação ponderal ao longo do tempo após injeção de dose sub letal de TsTX

Para este protocolo foram utilizados 10 ratos Wistar machos, e os animais foram pesados durante 7 dias após administração de TsTX, na dose de $\frac{1}{4}$ da DL50 e salina.

Os animais foram avaliados quanto a sobrevivência e ao ganho de peso ao longo do tempo após receberem a TsTX em uma dose sub-letal. Padronizamos a idade de 14 dias para que os animais recebessem a dose de $\frac{1}{4}$ da DL50 via sub-cutânea e o sacrifício foi realizado no 21º

dia de vida, data esta em que os animais encontram-se desmamados. Os animais foram mantidos com a mãe em amamentação exclusiva, sendo o peso avaliado durante os sete dias, tanto os animais controle quanto os animais injetados com TsTX, na mesma hora e sob as mesmas condições.

RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Microscopia Intravital na dose 2DL50

O gráfico A na figura 7 mostra a adesão leucocitária na microvasculatura da pia-máter nos animais que receberam a TsTX na dose de 2DL50. Os animais foram avaliados nos tempos 0, 10, 20 e 30 minutos após a administração da TsTX. O tempo máximo de sobrevivência desses animais após administração desta dose foi de 30 minutos.

Os animais intoxicados apresentaram o número de leucócitos aderidos ao endotélio dos vasos da pia máter ($5,0 \pm 3,0 / 7,0$ leucócitos aderidos/100 μ m/min) superior ao grupo controle (salina) ($0,00 \pm 0,0 / 0,0$ leucócitos aderidos/100 μ m), sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre o grupo TsTX e o grupo controle. Porém não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os tempos 0, 10, 20 e 30 minutos ($p > 0,05$).

O resultado no gráfico B, mostra o perfil de rolamento de leucócitos entre os animais que receberam salina e os que receberam TsTX na dose de 2DL50, e nos tempos 0, 10, 20 e 30 minutos. Observamos que o número de leucócitos rolando neste período apresentou diferença estatisticamente significativa entre animais controle ($0,1 \pm 0,0 / 0,0$ leucócitos rolando/min) e os animais envenenados ($1,0 \pm 0,0 / 2,5$ leucócitos rolando/min); $p < 0,0001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tempos, com $p > 0,05$.

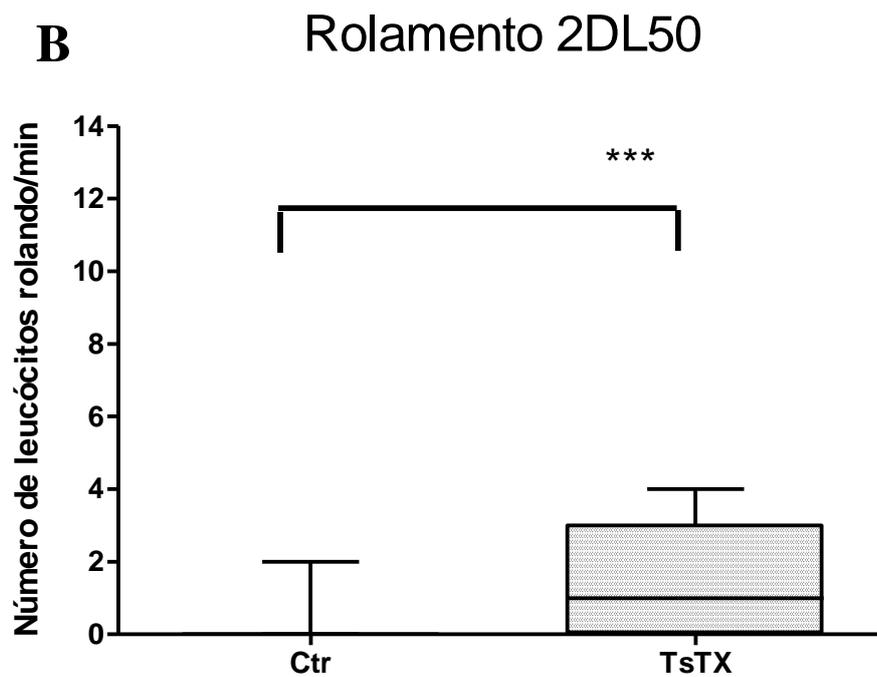
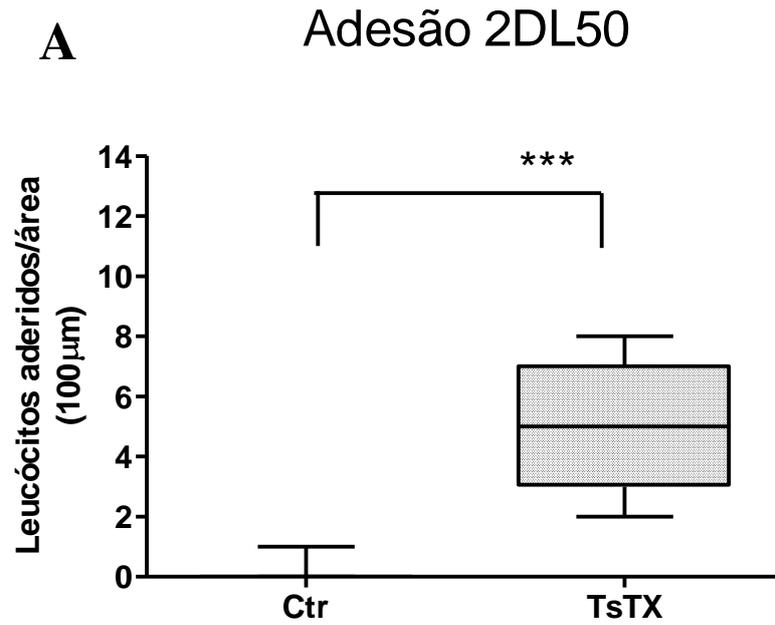


FIGURA 7 – Número de leucócitos em processo de adesão (A) e rolamento (B) na microvasculatura da pia-máter de ratos Wistar machos com 21 dias de idade após a injeção s.c. de TsTX (2 DL50).

Houve diferença significativa para o rolamento e a adesão leucocitária entre os grupos controle e TsTX ($p < 0,0001$). Teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

5.2 Histologia (TsTX 2DL50)

Para avaliar as alterações morfológicas no cérebro de animais controle e tratados com toxina, foi realizada a coloração de hematoxilina-eosina. Observa-se com a coloração de hematoxilina e eosina, um discreto edema e congestão focal no grupo TsTX 2DL50 diferente do grupo controle (Figura 8). O parênquima cerebral não apresentou diferença significativa no infiltrado celular entre os grupos, não apresentando dados que justificassem fazer a coloração de cresil violeta para essa dose.

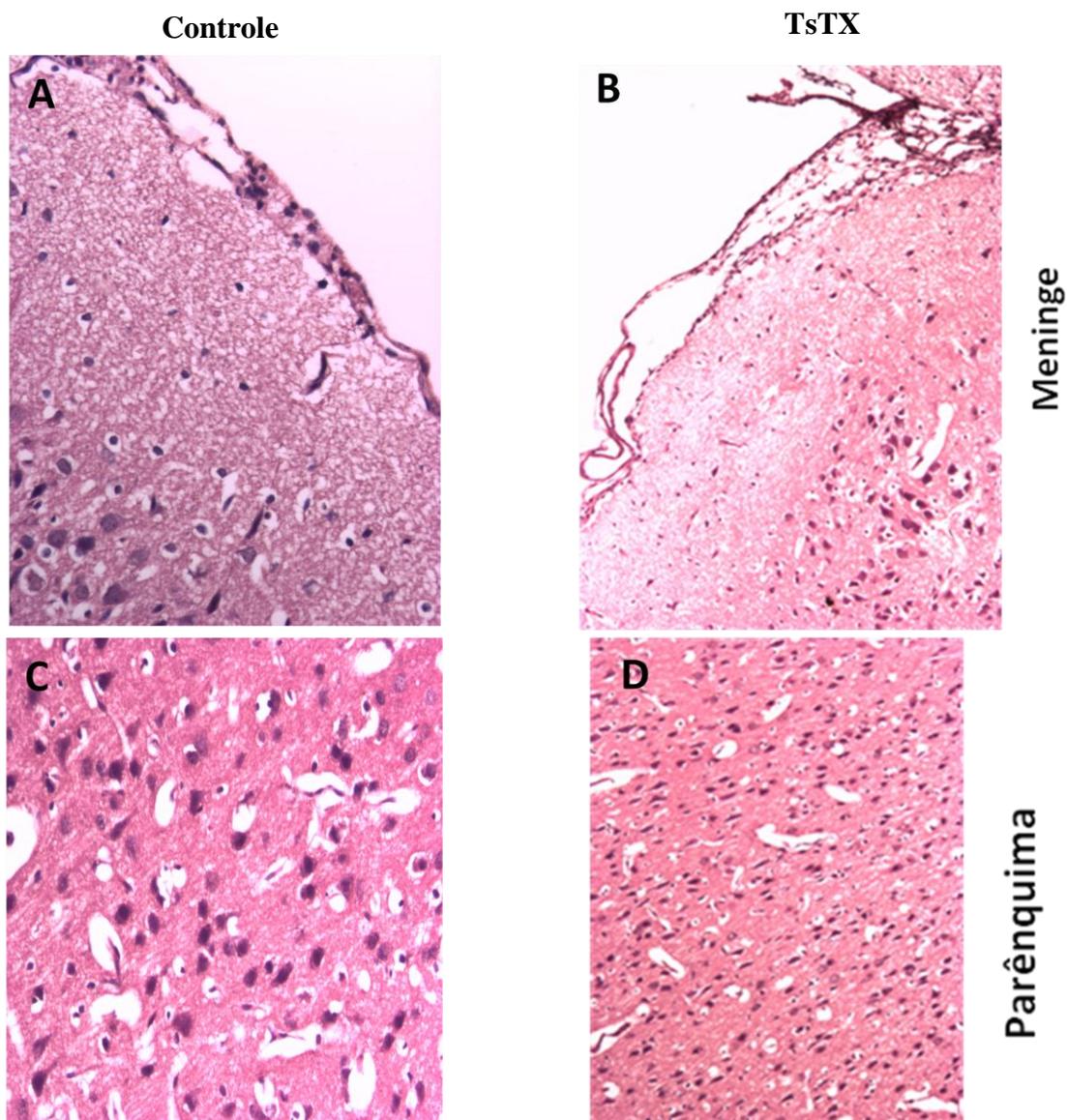


FIGURA 8- Técnica de hematoxilina e eosina em ratos controle e intoxicados com TsTX (2DL50).

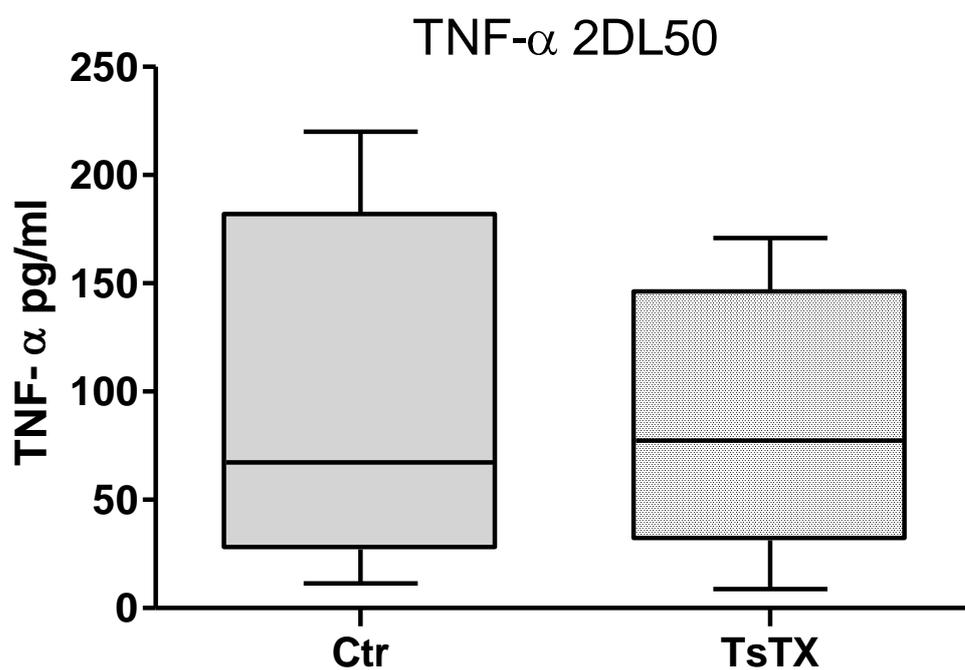
As letras A, C e B, D referem-se a ratos Wistar de 21 dias injetados com salina e TsTX, respectivamente. As letras A, B e C, D representam áreas de meninge e parênquima, respectivamente.

5.3 Determinação de TNF- α por ELISA para a Dose de 2DL50

Considerando o aumento do recrutamento de leucócitos na microcirculação cerebral após a injeção de TsTX na dose de 2DL50, foi realizada a quantificação cerebral da citocina TNF- α , envolvida nos casos de envenenamento escorpiônico, e associada a expressão de moléculas de adesão celular .

A quantificação protéica do TNF- α no homogenato de cérebro, após a injeção s.c. de TsTX ou salina, em ratos Wistar machos com 21 dias de vida (n=6/grupo) foi realizada através do método de Elisa. Não foi observada diferença significativa na produção dessa citocina nos homogenatos de cérebro no grupo toxina em relação ao grupo controle (salina), com $p > 0,05$ (Figura 9).

FIGURA 9 – Níveis de concentração da citocina TNF- α em sobrenadante de homogenato de cérebro de ratos (n=6) Wistar machos com 21 dias de idade que receberam salina e



TsTX (2DL50, s.c.).

Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com $p > 0,05$.

5.4 Avaliação da Permeabilidade Vascular

Os ratos Wistar, machos, (n=6/grupo), com 21 dias de vida, receberam TsTX (2DL50) ou salina (Figura 10). Através da quantificação do extravasamento do corante azul de Evans para o parênquima cerebral pode-se avaliar indiretamente o grau de permeabilidade da BHE. Os animais intoxicados receberam azul de Evans, pela veia da cauda, concomitante à injeção s.c. da toxina. Através da determinação espectrofotométrica da quantidade de azul de Evans presente no parênquima cerebral, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratado com TsTX (2DL50), $p=0.0952$.

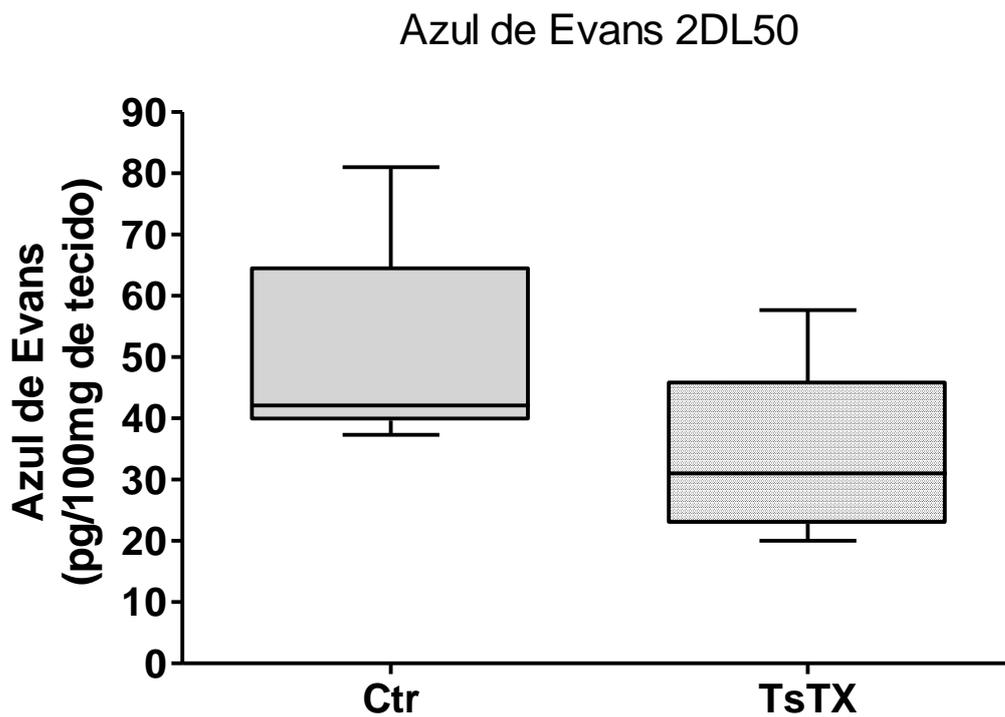


FIGURA 10 – Concentração do corante azul de Evans extravasado para o parênquima cerebral de ratos Wistar machos com 21 dias de vida(n=6/grupo) após a injeção de TsTX (2DL50).

Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney $p > 0,05$.

5.5 Microscopia Intravital ¼DL50

Na figura 11A observa-se a adesão leucocitária na microvasculatura da pia-máter nos animais que receberam a TsTX na dose de ¼DL50. Os animais foram avaliados nos tempos 4, 8 e 12 horas após a administração da TsTX. Os animais foram sacrificados após o tempo limite determinado.

Houve um aumento significativo na adesão leucocitária dos animais que receberam TsTX nessa dose após 4hs ($7,0 \pm 7,0 / 7,75$ leucócitos aderidos / $100\mu\text{m}$) em relação ao grupo controle ($0,01 \pm 0,0 / 0,0$ leucócitos aderidos/ $100\mu\text{m}$), o mesmo ocorrendo para 8hs ($0,0 \pm 0,0 / 0,0$ leucócitos aderidos) para o grupo que recebeu salina diferente do grupo que recebeu TsTX após 8hs ($6,0 \pm 5,25 / 6,75$ leucócitos aderidos/ $100\mu\text{m}$), bem como, para 12 horas ($6,0 \pm 5,25 / 6,75$ leucócitos aderidos / $100\mu\text{m}$), com $p < 0,0001$.

Ao avaliarmos o perfil dos animais injetados para o rolamento, também houve significativo aumento no rolamento dos leucócitos no grupo TsTX para o tempo de 4 horas ($1,5 \pm 0,25 / 3,5$ leucócitos rolando/min) em relação aos animais controle ($0,0 \pm 0,0 / 0,0$ leucócitos rolando/min), bem como para o tempo de 8 horas ($0,0 \pm 0 / 1,5$ leucócito rolando/ min) e 12 horas após a injeção sub-cutânea de TsTX na ¼ da DL50 ($4,0 \pm 4,0 / 4,0$ leucócitos rolando/min) $p < 0,0001$.

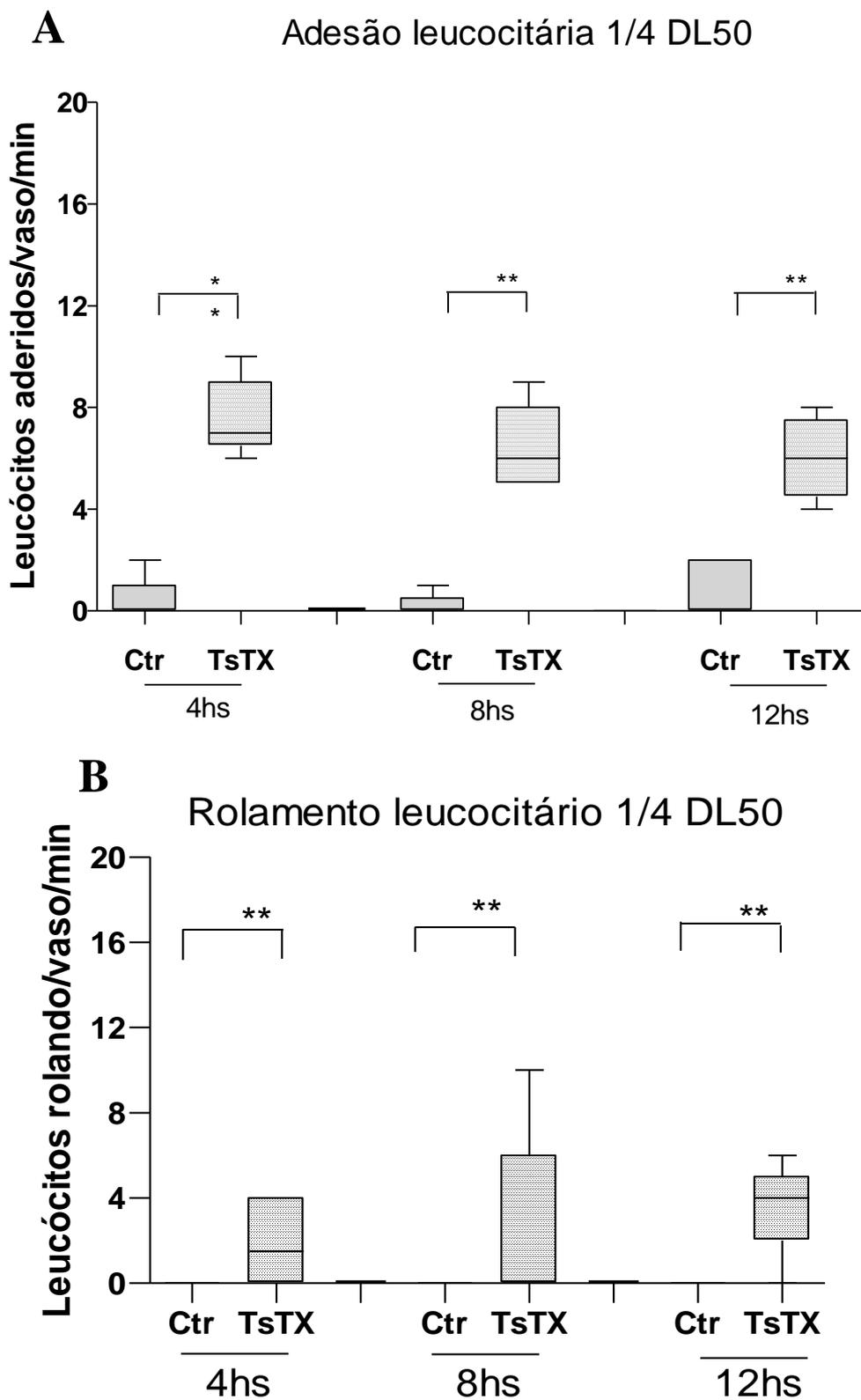


FIGURA 11 – Número de leucócitos em processo de adesão(A) e rolamento (B) nos vasos da pia-máter de ratos Wistar machos (n=6/grupo e em cada tempo), com 21 dias de idade após 4, 8 e 12 horas de administração 1/4 de TsTX, via sub-cutânea.

Os resultados foram submetidos à análise de variância seguida do teste de Mann-Whitney onde *** $p < 0,0001$, em ambos eventos, representando diferenças fortemente significativas entre os grupos.

5.6 Histologia (TsTX ¼DL50)

Através de análise histológica, evidenciou-se que após tratamento com TsTX, na dose de ¼ da DL50, há uma intensificação dos fenômenos vasculares para o tempo de 4 horas após a injeção de toxina, em relação ao controle, com edema, congestão e discreta presença de células inflamatórias nos espaços meníngeos, inclusive com formação de edema protéico. Essas alterações são difusas e atingem não somente as meninges como também o parênquima cerebral.

O aspecto das meninges dos animais injetados e controle, após 8 horas de injeção da toxina e salina, respectivamente, não apresentou alteração. A imagem histológica do parênquima às 8hs tem o mesmo aspecto às 4hs e 12 hs para o grupo TsTX, por isso, não foi documentado. Evidencia-se na área cortical dos animais envenenados, alterações significativas em relação aos controles, as quais estão documentadas em aumentos consecutivos (10, 40 e 80X) e comparativos, nos mesmos locais. Observam-se alterações degenerativas nas células corticais e os vasos nesta região mostram-se dilatados, ramificados, e com “cuffing” (espaços claros perivasculares acentuados) em relação ao controle. Há muitas células em necrose (**Figura 12, letras D e F**) ou com aspecto apoptótico, o que não se observa nos controles.

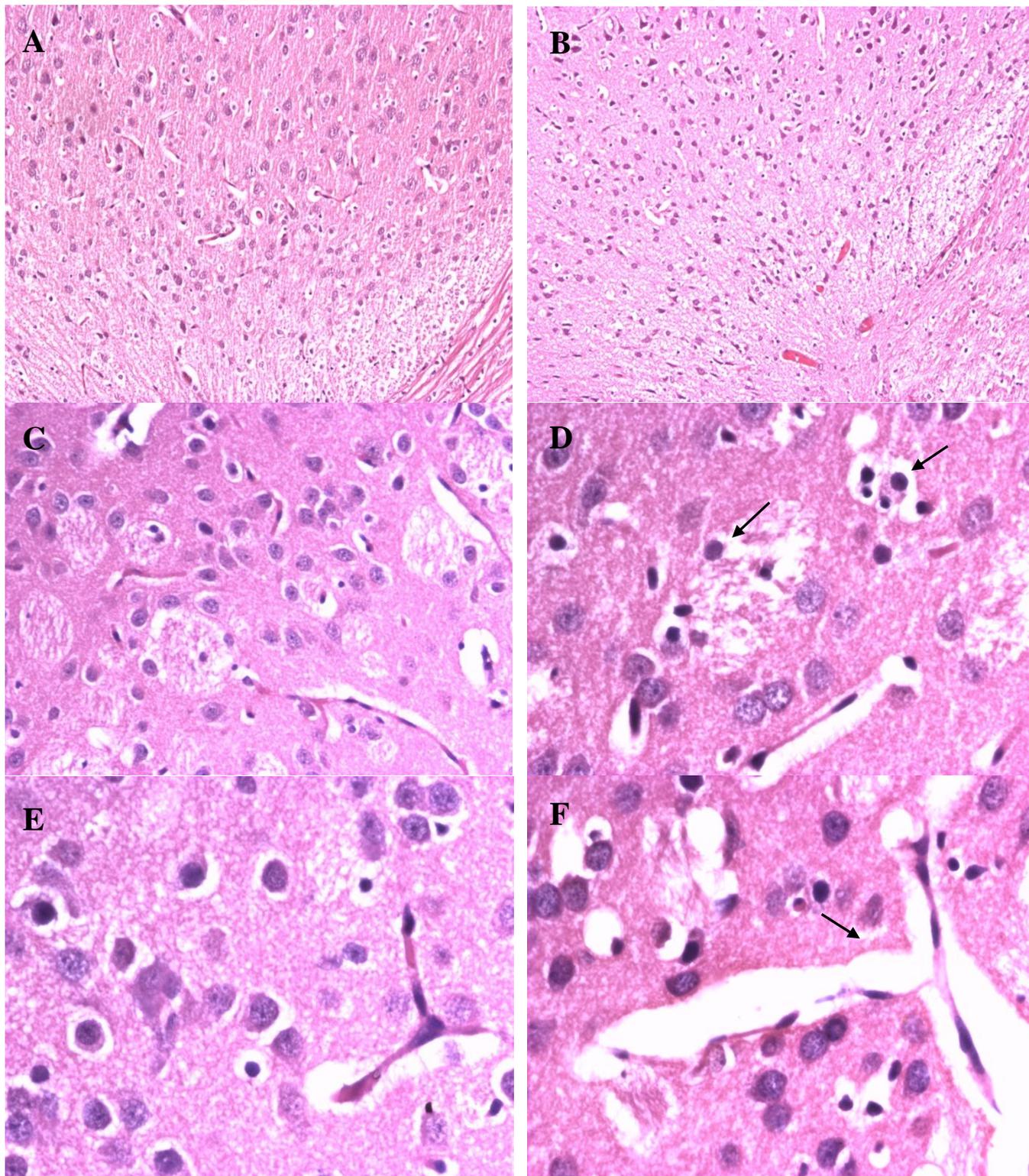
CONTROLE**TsTX ¼DL50**

FIGURA 12 –Técnica de Hematoxilina e eosina para coloração de cérebro de ratos Wistar machos com 21 dias idade, após receberem ¼ da DL50 de TsTX, sacrificados após 8 horas.

As letras A, C e E mostram os animais controle com aumentos de 10X, 40X e 80X, respectivamente, sacrificados após 8 horas. As letras B, D e F representam os animais que receberam ¼ da TSTX, sacrificados após 8 horas, com os mesmos aumentos, apresentando edema perivascular e células em necrose e com aspecto apoptótico (setas **D e F**)

5.7 Cresil violeta

A coloração por cresil violeta demonstrou aumento da vascularidade no grupo TsTX em relação ao grupo controle, bem como aumento de celularidade, com as células neuronais com retração citoplasmática e condensação da substância de Nissl. Em todos os tempos analisados, observamos tais alterações e optamos por colocar as imagens de oito horas pois apresentarem melhor visualização.

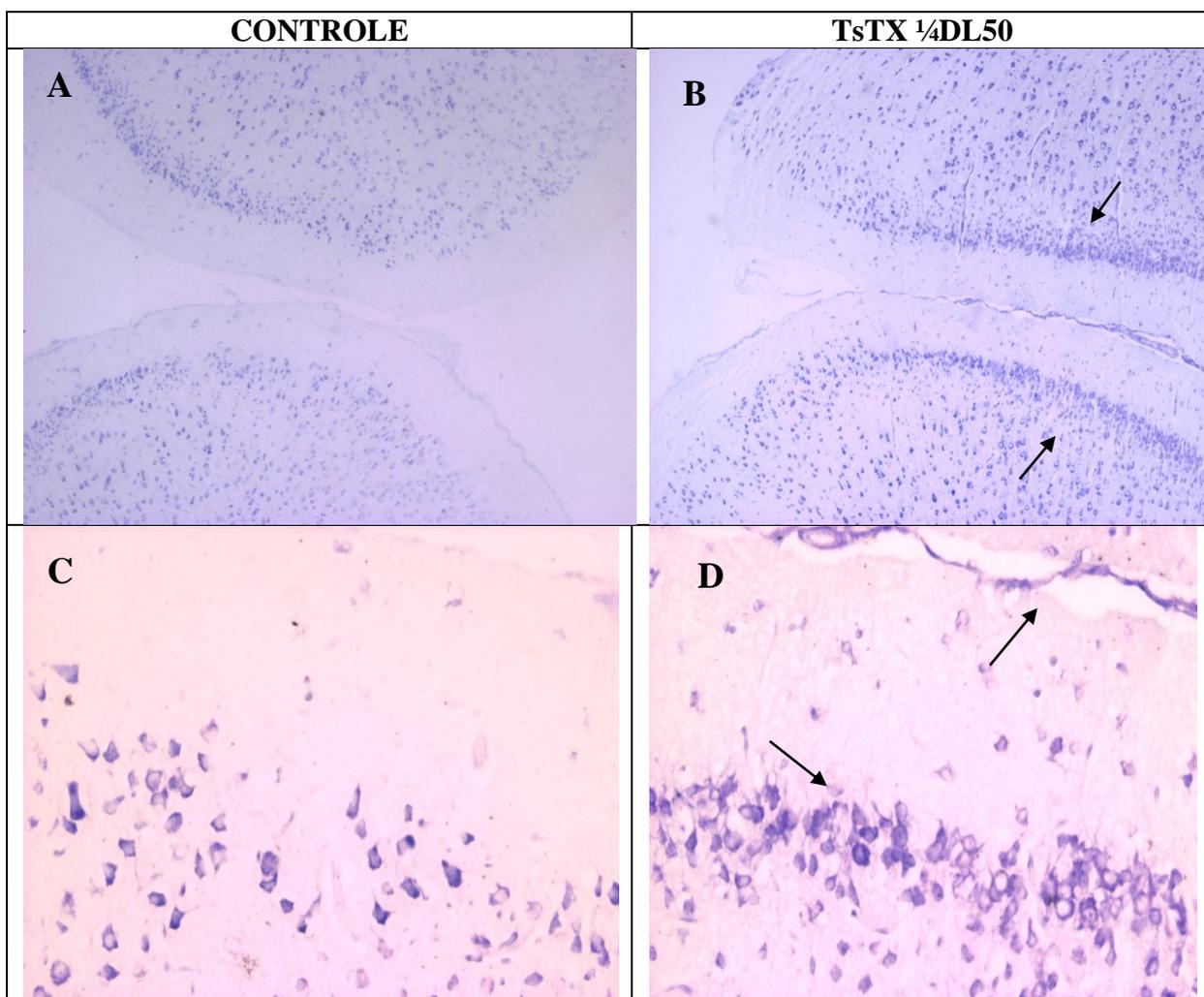


FIGURA 13- Técnica do cresil- violeta do cérebro de ratos Wistar, machos com 21 dias de idade, após 8 horas da injeção s.c. de TsTX ($\frac{1}{4}$ da DL50).

Regiões de córtex A e B (no aumento de 4X), animais controle e injetados, respectivamente, evidenciando-se aumento da celularidade no grupo TsTX $\frac{1}{4}$ DL50, (setas); e córtex **C e D** (aumento de 20X), animais controle e injetado, respectivamente, evidenciando-se contração da substância de Nissl, retração citoplasmática e morte neuronal (setas).

5.8 Determinação de TNF- α por ELISA

Considerando o aumento do recrutamento de leucócitos na microcirculação cerebral após a injeção de TsTX na $\frac{1}{4}$ da DL50, nos tempos 4, 8 e 12 horas, foi quantificado os níveis protéicos da citocina, TNF- α , que se encontram em mais elevados nos casos de envenenamento escorpiônico.

A avaliação estatística foi feita por análise de variância com delineamento inteiramente casualizado do tipo fatorial 2x3(dois tratamentos e três tempos) onde a concentração de TNF- α no homogenato de cérebro mostrou-se aumentada para o grupo que recebeu $\frac{1}{4}$ da DL50 de TsTX após 4 horas($187,23 \pm 171 / 215,21$), 8 horas ($211,8 \pm 195,94 / 224,07$) e 12 horas ($158,9 \pm 158,57/212,4$) em relação ao grupo controle para 4horas($127,191 \pm 11,42 / 134,71$),8 horas($87,87 \pm 80,73 / 95,71$) e finalmente, 12 horas($70,03 \pm 42,88 / 121,5$)com $p < 0,05$.**Figura 14**

TNF-alfa 1/4 DL50

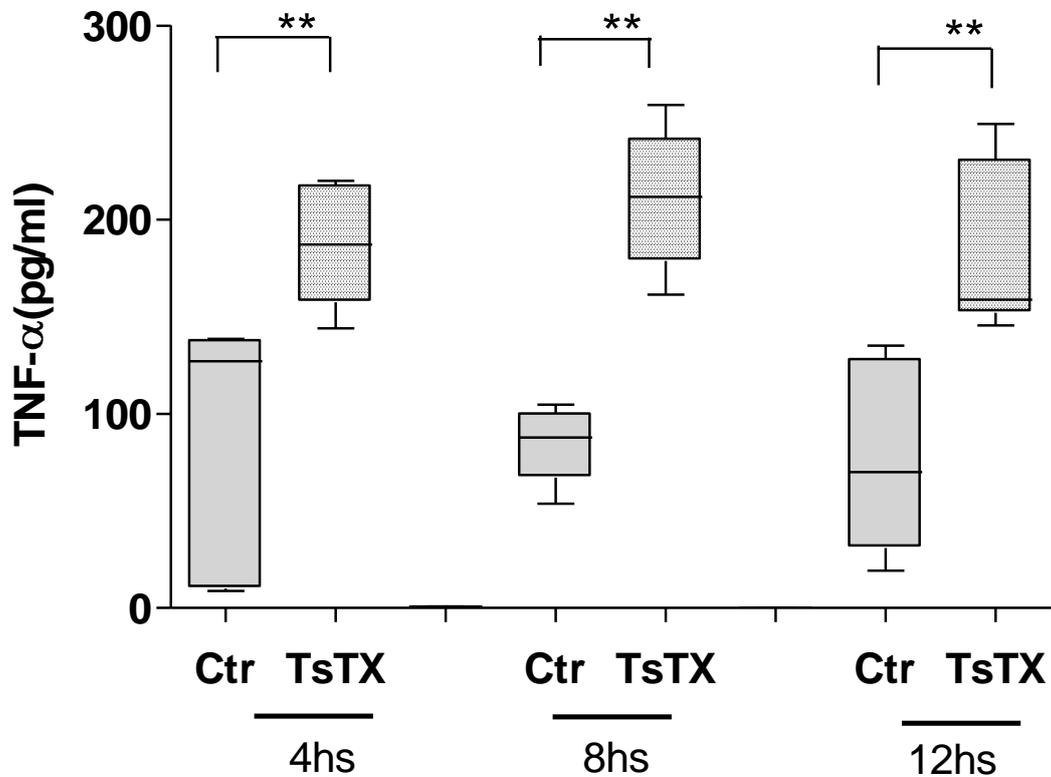


FIGURA 14 – Níveis de concentração de citocina TNF- α em homogenato de cérebros de ratos Wistar, machos com 21 dias de idade, após a injeção de salina e de 1/4 da DL50 de TsTX.

Observamos diferença estatística entre os grupos controle e intoxicado. Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos, $p < 0,05$.

5.9 Avaliação da Permeabilidade Vascular

Através da avaliação do extravasamento de azul de Evans para o parênquima cerebral pode-se avaliar a permeabilidade da BHE. Nossos resultados (n=46 animais), mostraram maior extravasamento de azul de Evans em ambos os grupos, controle e TsTX, para o tempo de 8 horas (**Figura 15**), porém sem diferenças estatisticamente significativas entre estes grupos, controle e injetado com a TsTX. Para análise estatística foi feita análise de variância, com delineamento inteiramente casualizado do tipo fatorial 2X3(dois tratamentos e três tempos), sem interação estatisticamente significativa entre dose X tempo, com $p < 0,0002^{***}$ para o tempo e $p > 0,05$ para a dose.

Permeabilidade Vascular 1/4 DL50

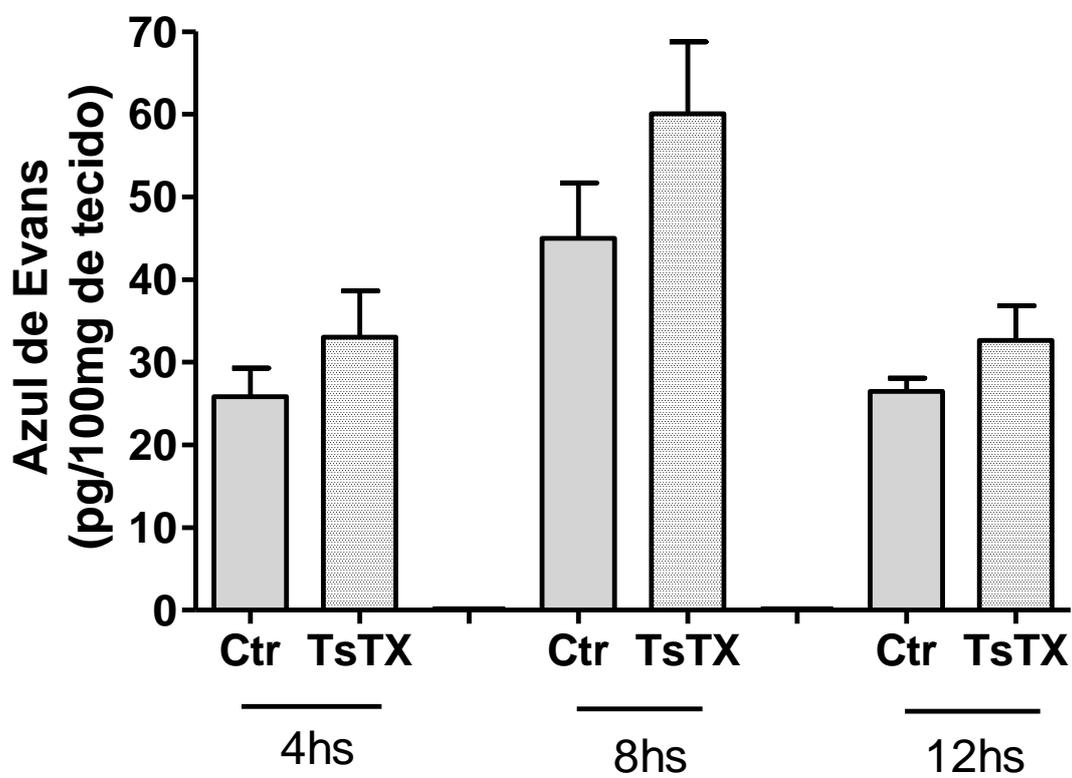


FIGURA 15 - Concentração do corante azul de Evans extravasado para o parênquima cerebral de ratos Wistar machos, com 21 dias de vida, que receberam TsTx (1/4 da DL50) e salina, nos tempos de 4, 8 e 12 horas, respectivamente.

Os resultados foram analisados através de análise de variância, sendo o delineamento inteiramente casualizado, com amostra desbalanceada, do tipo fatorial 2x3, $p < 0,00024^{***}$, para o tempo de 8 horas.

5.10 Avaliação ponderal ao longo do tempo após injeção s.c. de TsTX ¼ da DL50

Considerando-se que a dose de ¼ da DL50 é sub-letal (100% animais sobreviveram), realizamos uma análise da ação da toxina TsTX sobre o peso ao longo do tempo, a partir 14º dia de vida dos animais (injeção TsTX) até o 21º dia (sacrifício) (**Figura 16**). A data de sacrifício foi determinada como 21º dia, a qual corresponde a data do desmame dos animais.

Os animais tratados com ¼ da DL50 TsTX apresentaram seu peso estável ($34.52025 \pm 4,139g$) desde a administração da toxina até o dia do sacrifício.

Os animais que receberam salina apresentaram ganho ponderal normal para esta fase de seu desenvolvimento, havendo diferença estatisticamente significativa, entre grupo salina e toxina, indicando que com o tempo houve um ganho de peso para o grupo controle o que não ocorreu com o grupo toxina.

O estudo do ganho de peso para os grupos de animais controle e toxina apresentou uma forte significância do efeito da interação, **dose X tempo**, através de um delineamento inteiramente casualizado em parcela subdividida (2X7). Assim, os efeitos isolados dos dois tratamentos não podem ser discutidos isoladamente, ou seja, o efeito da dose (controle ou injetado) só pode ser feito à luz de um tempo específico, assim como, o efeito do tempo só pode ser discutido separadamente para cada um dos grupos anteriores. Desta maneira, não se verificou diferenças significativas entre as doses em cada tempo específico. Contudo, a interação fica claramente demonstrada quando observa-se significativo ganho de peso dos animais controle, dentro do período de 7 dias estudados. Resultados distinto do grupo TsTX que, por sua vez, não apresentou ganho significativo de peso dentro do mesmo período.

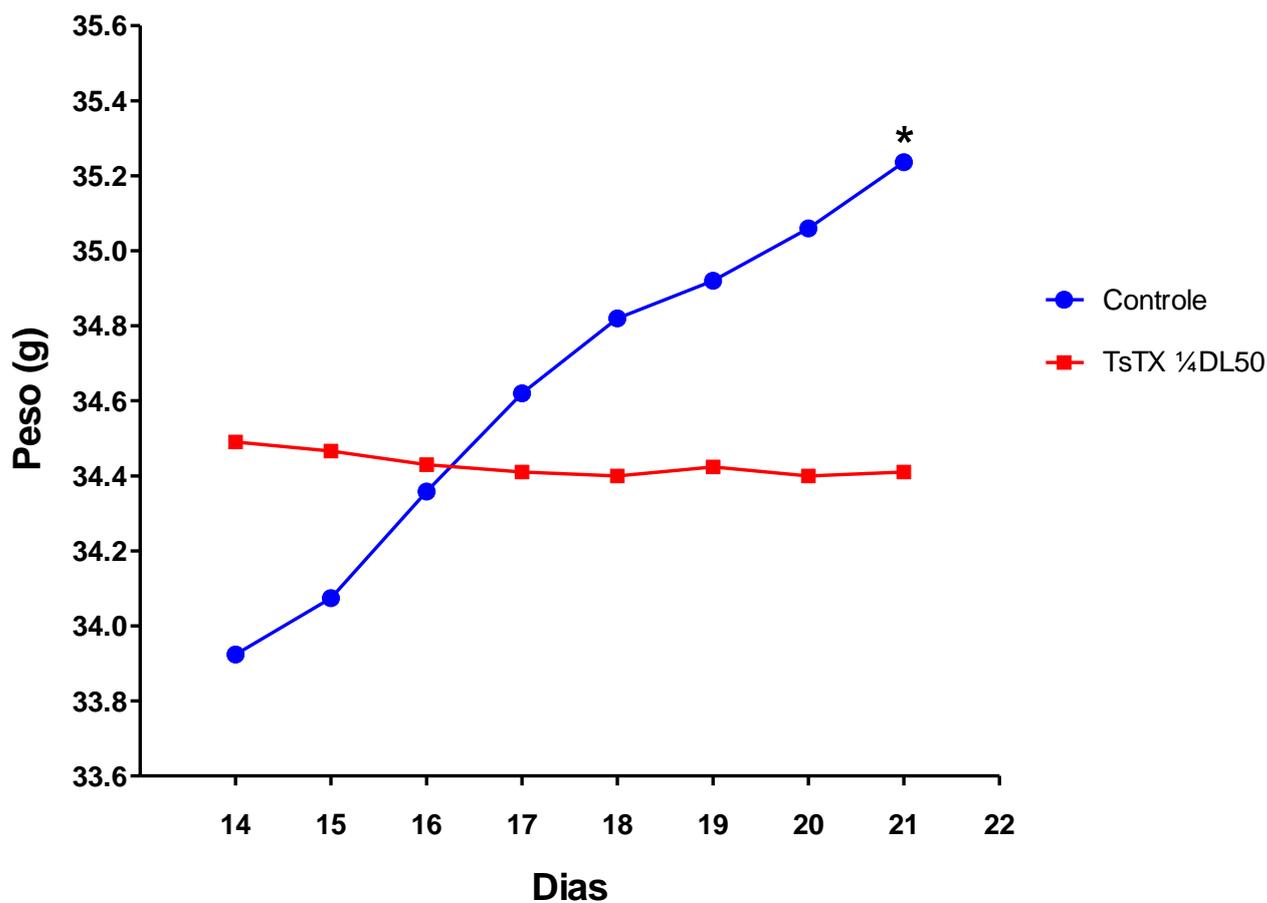


FIGURA 16 – Avaliação do ganho ponderal em ratos Wistar machos(n=10) ao longo do tempo de 7 dias após administração de 1/4 da TsTx e salina.
 DIC(DELINEAMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO) em parcela subdividida, 2 x7, teste de Mann-Whitney, $p < 0,001$.

5.11 Microscopia Intravital para sete dias (TsTX ¼ da DL50)

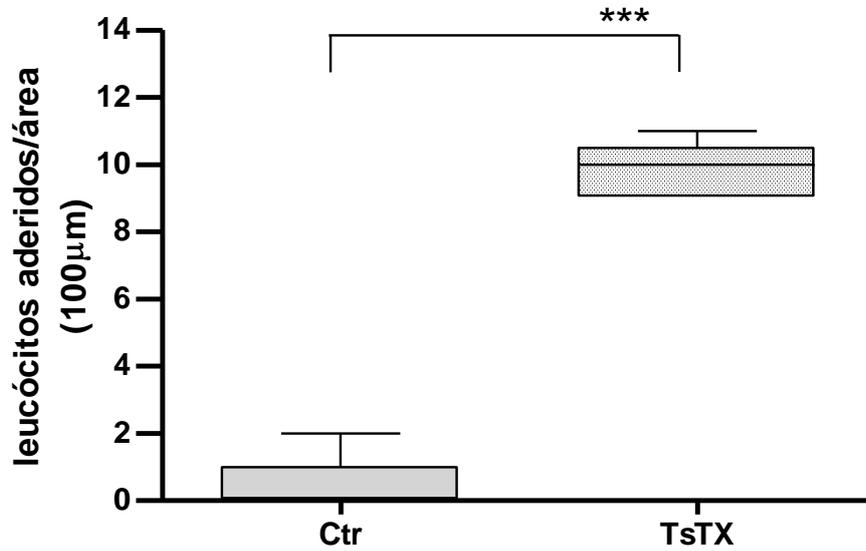
Os animais que receberam ¼ da TsTX tiveram as interações leucócito endotélio avaliadas na microvasculatura da pia-máter pela microscopia intravital após sete dias.

Os animais toxina apresentaram maior adesão leucocitária ($10,0 \pm 9,0 / 10,0$) que os animais do grupo controle ($0,0 \pm 0,0 / 0,0$ leucócitos aderidos/ $100\mu\text{m}$), $p < 0,05$.

O mesmo ocorreu para o rolamento sendo que o grupo que recebeu salina não apresentou rolamento leucocitário ($0,0 \pm 0,0 / 0,0$) diferente do grupo que recebeu TsTX na dose de ¼ da DL50 ($4,5 \pm 4,0 / 4,5$ leucócitos rolando/min)

Adesão 1/4 DL50 7 dias

A



B

Rolamento 1/4DL50 - 7dias

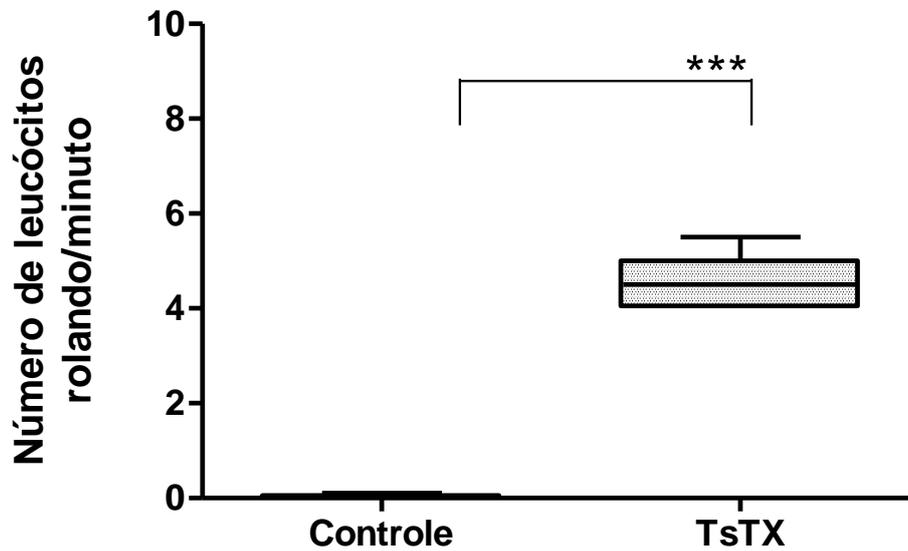


FIGURA 17- Número de leucócitos em processo de adesão (A) e rolamento (B) na microvasculatura da pia-máter de ratos Wistar machos com 21 dias de idade após sete dias da injeção s.c. de TsTX (1/4 daDL50).

Houve diferença estatística para a adesão e rolamento leucocitários entre os grupos controle e TsTX ($p < 0,0001$). Teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

5.12 HISTOLOGIA (TsTX ¼ da DL50, 7 dias)

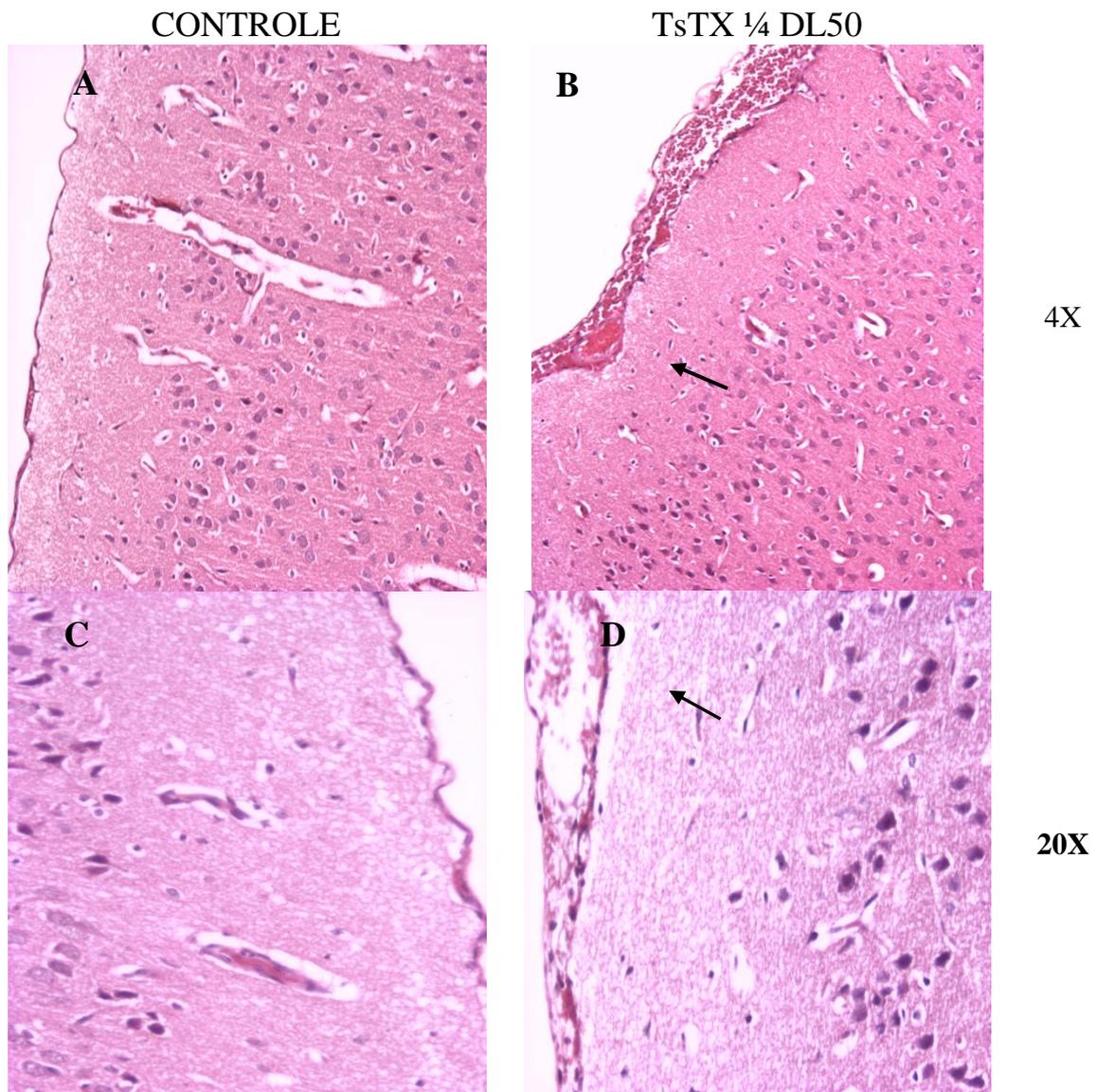


FIGURA 18 –Perfil do córtex cerebral de ratos Wistar machos após receberem ¼ da DL50 de TsTX. Técnica de Hematoxilina e eosina para coloração de cérebro de ratos Wistar machos com 21 dias idade, após receberem ¼ da DL50 de TsTX, sacrificados após sete dias.

As alterações histológicas no grupo toxina mostram-se mais intensas em córtex, com edema e hemorragia perivascular (setas - B e D)

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO GERAL

As manifestações tóxicas induzidas após exposição ao veneno de escorpião, tem sido explicadas, pela habilidade das toxinas presentes no veneno, de agirem em canais de sódio ou potássio, levando a liberação de neurotransmissores, os quais podem estimular vários órgãos.

Inicialmente, acreditava-se que os efeitos sistêmicos do veneno de escorpião eram uma consequência de sua ação sobre o sistema nervoso periférico, descartando qualquer envolvimento do sistema nervoso central (SNC), devido a presença da barreira hematoencefálica (BHE). Entretanto, posteriormente, vários estudos, tem sugerido a ação central do veneno e da toxina TsTX do escorpião *Tityus serrulatus*. Mesquita e colaboradores (2003) observaram arritmias cardíacas graves, convulsões, edema pulmonar e óbito em todos os animais (ratos adultos) após injeção i.c.v. de TsTX . A TsTX , toxina do tipo alfa, é encontrada em maior concentração no veneno bruto do escorpião desencadeia acidentes com maior letalidade (Kalapothakis e cols., 1997).

Por outro lado, dados recentes do nosso grupo demonstraram que a injeção subcutânea de TsTX em ratos em desenvolvimento foi capaz de induzir alterações eletroencefalográficas no núcleo do trato solitário, aumento de metabolismo em regiões do tronco encefálico e diminuição do volume sanguíneo cerebral (Guidine e cols., 2008).

Considerando que a TsTX é capaz de causar alterações microvasculares, neste trabalho avaliamos o potencial efeito inflamatório de diferentes doses (letal e sub-letal) de TsTX na microcirculação cerebral de ratos jovens.

Para mimetizar as condições de acidentes de maior gravidade os quais ocorrem geralmente com crianças abaixo de seis anos, utilizamos ratos jovens com 21 dias (Januário e Campolina, 1996; Fan e cols., 1994). Por outro lado dados anteriores, também demonstraram a presença da toxina de *Androctonus australis* marcada com iodo radioativo no SNC de camundongos de 3 e 7 dias de vida após sua injeção sub-cutânea(Sofer e cols., 1988).

No primeiro protocolo, os animais foram inoculados com a TsTX (2DL50, via s.c.). O período máximo de sobrevivência foi de 30 minutos, o que pode estar relacionado a maior velocidade de absorção e distribuição da toxina, além de uma eliminação mais lenta, parâmetros farmacocinéticos já descritos para ratos jovens.

Utilizando a técnica de microscopia intravital, avaliamos na dose de 2DL50, o recrutamento de leucócitos “in vivo” na microcirculação cerebral. A visualização da interação de leucócitos com o endotélio em vasos inflamados tem revelado que leucócitos, inicialmente, rolam ao longo da parede do vaso e, após uma firme aderência, transmigram através do endotélio (Kerfoot & Kubes, 2002). Os animais que receberam toxina em doses letais (2DL50) apresentaram aumento significativo da adesão leucocitária, em relação aos animais do grupo controle. Na literatura, há dados que demonstram que o veneno bruto de *Tityus serrulatus* é capaz de induzir recrutamento (quimiotaxia) de neutrófilos, in vitro.

Para melhor elucidar os mecanismos inflamatórios induzidos por TsTX, avaliamos as possíveis alterações morfológicas cerebrais, nos animais tratados com toxina na dose de 2DL50. Observamos discreto edema meningeano no grupo toxina em relação ao grupo controle, sem alterações significativas em parênquima cerebral. Estudos de Sandoval e colaboradores (2003) demonstraram que as alterações histológicas como degeneração neuronal e gliose hipocampal, após a aplicação icv da TSII, a fração β do veneno bruto do escorpião, eram dose-dependente (Sandoval e cols., 2003). O fato de não observarmos tais alterações, pode ser explicado pelo uso de uma toxina diferente, pela via administração da toxina e a dose utilizada.

A resposta inflamatória é engatilhada por uma cascata de eventos celulares (interações leucócito-endotélio) e moleculares, como, liberação de mediadores. As citocinas tem um

papel relevante na amplificação desta cascata inflamatória, e podem ser divididas em citocinas pró- ou anti-inflamatórias.

Vários estudos avaliaram a ação inflamatória dos venenos e toxinas escorpionicas, especialmente as toxinas do *Tityus serrulatus*, através da dosagem sérica de citocinas: TNF- α , IL-1, IL-6 e INF- γ (Magalhães e cols., 1999; D'Suze e cols., 2003, FuKuhara e cols., 2003; Petricevich e cols., 2004; Abdel-Haleem e cols., 2006). Estas citocinas relacionam-se ao aumento da permeabilidade vascular, apresentam ação quimiotática, e até pró-convulsivante como a IL-1 β (Vezzani e cols., 2008). Entretanto, não há relato na literatura, da quantificação de citocina inflamatória cerebral TNF- α , após intoxicação com TsTX em animais jovens.

O TNF- α é uma proteína não glicosilada de 17KDa com potente ação pró-inflamatória. O TNF- α é importante no disparo e propagação do processo inflamatório. Ele é produzido principalmente pelos linfócitos e macrófagos e seus principais alvos de ação são os fibroblastos e o endotélio. O TNF- α induz a proliferação neutrofílica durante a inflamação mas também induz à apoptose pela sua ligação ao receptor TNF-R55 (Murray e cols.,1997). Esta citocina estimula o aumento do fluxo sanguíneo, aumenta a permeabilidade vascular e a adesão endotelial para leucócitos e plaquetas (Beutler, 1995; Bemelmans e cols.,1996). Além disso, o TNF- α também induz secreção de quimiocinas pelas células endoteliais, as quais atuam no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamado amplificando a resposta inflamatória.

Ao quantificarmos pelo método de ELISA, os níveis protéicos de TNF- α cerebral, não encontramos diferença estatística entre os grupos controle e toxina na dose 2DL50. Provavelmente, a alta dose de TsTX utilizada nestes protocolos, a qual levou os animais ao óbito dentro de um curto intervalo de tempo, não permitiu a expressão gênica e quantificação protéica desta citocina.

Além de recrutamento de leucócitos, e aumento de citocinas, a resposta inflamatória pode levar a ruptura da BHE, a qual facilita a migração de células para o parênquima cerebral. O principal papel da BHE é manter a homeostase no SNC, impedindo que flutuações na composição do leito vacular alterem o equilíbrio do tecido neural (Neuwelt, 2004). Dados anteriores, demonstraram que a injeção i.v. do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, em ratos Wistar adultos, leva a um aumento da permeabilidade da BHE na região do hipocampo e cerebelo (Raposo e cols, 2007). A disfunção na permeabilidade da BHE pode ser avaliada através da quantificação do extravasamento do corante azul de Evans da circulação para o parênquima cerebral (Belayev e cols., 1996).

Nossos dados, mostram que animais tratados com TsTX 2DL50 (s.c.), não apresentaram diferença em relação ao grupo controle, quanto ao extravasamento de azul de Evans para o parênquima cerebral. Estes dados corroboram os dados de Guidine e cols (dados não publicados), nos quais utilizando o agente de contraste gadolínio, foi observado uma redução na quantidade de gadolínio presente na vasculatura encefálica de ratos jovens tratados com TsTX. Uma possível explicação para esta menor quantidade de azul de Evans no parênquima cerebral dos animais TsTX, seja um efeito vasoconstritor causado pela toxina.

Considerando que a dose de 2 DL50 é letal, poderia estar afetando a avaliação temporal da resposta inflamatória no cérebro, decidimos realizar o próximo protocolo experimental; injetar nos animais jovens uma dose sub-letal de TsTX (1/4DL50). Injetamos a toxina nos ratos aos 21 dias de idade, e avaliamos os parâmetros inflamatórios (recrutamento “in vivo”, alterações morfológicas, dosagem de TNF- α e ruptura da BHE) após quatro, oito e doze horas.

Os animais injetados com TsTX 1/4DL50 apresentaram aumento significativo do número de leucócitos aderidos e rolando sobre o endotélio cerebral, quando comparados com o controles, nos diferentes tempos examinados.

Associadas às alterações no recrutamento de leucócitos visualizados por microscopia intravital, a histologia demonstrou aumento do edema meningeano e perivascular no grupo toxina em relação ao grupo controle, assim como aumento de celularidade, edema protéico perivascular, células neuronais com aspecto degenerativo, com retração citoplasmática e condensação da substância de Nissl, eventos não observados no grupo controle. Nossos dados, se assemelham a dados da literatura, os quais demonstraram, após injeção sub-cutânea do veneno de *Tityus discrepans*, em carneiros o aumento de celularidade e infiltração leucocitária em tecidos como pulmão, fígado, pâncreas, intestino e pele indicando a ação inflamatória geralmente presente em casos de acidentes escorpiônicos (D'suze e cols., 2004).

Além disso, nos animais injetados com TsTX 1/4DL50, observamos um aumento dos níveis protéicos de TNF- α no homogenato de cérebro, quando comparado aos animais controle, em todos os tempos avaliados. Nossos dados corroboram os dados da literatura que demonstram a elevação das citocinas, especialmente o TNF- α e sua participação ativa nos envenenamentos escorpiônicos graves (Petricevich, 2004).

O aumento do TNF- α exerce seu efeito pró-inflamatório no envenenamento através de seus efeitos sobre a expressão de moléculas de adesão, as quais estão diretamente envolvidas com as etapas de rolamento e adesão de leucócitos no endotélio. Por outro lado, o TNF- α também estimula a síntese de óxido nítrico (NO), o qual está envolvido em ativação celular. Trabalhos anteriores mostraram que grandes quantidades de NO são produzidas por células tratadas com veneno bruto de escorpião *Tityus serrulatus* (Petricevich, 2002 e 2004).

Ao realizarmos a análise do extravasamento do azul de Evans para o parênquima cerebral para os três períodos de tempo, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre o grupo TsTX e controle, embora foi observado maior extravasamento para os dois grupos analisados para o tempo de oito horas. A ausência de diferença entre controle e

tratados (TsTX), poderia, ainda, ser explicado por um efeito vasoconstritor da toxina, mesmo em uma dose mais baixa.

E, como último protocolo decidimos avaliar o efeito da toxina TsTX a longo prazo, 7 dias. Sabe-se que o peso é um bom preditor de eventos patológicos ao desenvolvimento das crianças a longo prazo, visto que em pediatria utiliza-se a curva de peso para avaliar o desenvolvimento infantil. Assim sendo, injetamos a dose sub-letal de TsTX em ratos Wistar, com 14 dias de vida e os pesamos diariamente até que eles completassem 21 dias, dia este em que os animais eram desmamados e sacrificados.

Os animais injetados com a toxina apresentaram seu peso estacionado, diferente dos animais controle que continuaram ganhando peso normalmente. A diferença entre grupo controle e toxina foi fortemente significativa. Pela microscopia intravital, observamos um aumento de adesão e rolamento leucocitário o que não foi observado no grupo controle. Corroborando as alterações vasculares de recrutamento de leucócitos, utilizando H&E, detectou-se aumento de celularidade, com edema meningeano e infiltrado perivascular nos animais tratados com TsTX. Além disso, através do cresil violeta foram visualizadas células com contração citoplasmática e condensação da substância de Nissl nos cérebros dos animais que receberam toxina 1/4DL50 durante 7 dias.

Esses dados juntos reforçam a capacidade da toxina TsTX em doses sub-letais de induzir uma resposta inflamatória no cérebro. A gravidade dos acidentes escorpionicos pode estar não só relacionada a capacidade das toxinas cruzar a barreira hematoencefálica com rapidez, e apresentar uma alta afinidade pelas células neuronais e uma eliminação lenta (Santana e cols., 1996; Nencionni e cols., 2009; Petricevich 2002, Fukuhara 2003, Suze 2003, Abdel Haleem e cols, 2006), mas também pelos seus efeitos inflamatórios sistêmicos e na vasculatura cerebral. Estudos futuros serão necessários para entender como a TsTX atua na

comunicação entre as células do sistema imune e os neurônios, isto é, no acoplamento neurovascular.

Nosso estudo ajuda a ampliar o entendimento dos mecanismos neuroimunofisiológicos associados aos envenenamentos escorpionicos, estudados há mais de um século por pesquisadores do mundo inteiro e com uma letalidade tão elevada principalmente entre as crianças. Vislumbrando novas propostas de tratamento como os corticóides que em associação a soroterapia antiescorpionica e aos anticonvulsivantes poderiam ser uma nova opção de tratamento.

CONCLUSÕES

7 Conclusões

A TsTX injetada por via-subcutânea em doses sub-letais ($1/4$ DL50) é capaz de induzir resposta inflamatória cerebral, aumento o recrutamento de leucócito, a produção de TNF- α , e alterações morfológicas vasculares e no parênquima cerebral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-HALLEN A. ABDEL-HALLEN. et al. Serum levels of IL-6 and its soluble receptor, TNF- α and chemokine Rantes in scorpion envenomed children: Their relation to scorpion envenomation outcome. *Toxicon*. v.47, p.437-444, 2006.
2. ABROUG, F. et al. Serotherapy in scorpion envenomation: a randomized controlled trial. *Lancet*, London, v.11, n.9, p.906-909, sep. 1999.
3. ADAMS, S. et al. Breaking down the blood-brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? *Trends in parasitology*. v.18, p. 360-366, 2002.
4. BAHOUL, M., et al. Cardiovascular dysfunction following severe scorpion envenomation. *Mechanisms and pathophysiology (Pres Med.)*, v.34, p.115-120, 2005.
5. BARHANIN, J. et al. *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. *Tityus* gamma toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na⁺ channel. *The Journal of Biological Chemistry*. Baltimore, v.257, n.1, p.12553-12558, nov.1982.
6. BECERRIL, B.; MARANGONI, S.; POSSANI, L.D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*, Oxford, v.35, n.6, p.821-835, jun. 1997.
7. BEKER, M.A., FREIRE-MAIA, L., Neutrophil leukocytosis induced by injection of tityustoxin in the anesthetized rat. *Br. J. Med. Biol. Res.* 16, 478.1983
8. BELAYEV, L. et al. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Research*, Amsterdam, v.739, n.1-2, p.88-96, nov. 1996.
9. BEMELMANS, M.H. et al. Tumor necrosis factor: function, release, clearance. *Crit. Rev. Immunol.*, v.16, p.1-11.1996
10. BERTAZZI, D.T. et al. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon*, v.41, p.501-508, 2003.

11. BERTAZZI, D.T. et al. Activation of the complement system and leucocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *International Immunopharmacology*.v.5,p1077-1084, 2005.
12. BEUTLER, B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J. Invest. Med.*,v.43, p.227-235.1995
13. BIBER, K.; ZUURMAN, M.W.;DUKSTRA, I.M., BODDKE, H.Chemokines in the brains: neuroimmunology and beyond. *Cur Opin Pharmacol*. 2:63-68, 2002.
14. BUTCHER, E. C., PIKER, L.J. Lymphocyte homing and homeostases. *Science*, v. 272, p.60-66.1996.
15. BUCHERL, W. Escorpiões e escorpionismo no Brasil. *Memórias do Instituto Butantan* 34:9-24, 1959
16. CAMPOLINA, D., CARDOSO, M. F. E. C. Aspectos Epidemiológicos das intoxicações por animais peçonhentos atendidos no serviço de Toxicologia do hospital João XXIII, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil ver Med. Minas Gerais 2000; 10(1): 2-7.
17. CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B.Acidentes provocados por contatos com animais peçonhentos In: Atualização Terapêutica 2005 :Manual Prático de Diagnóstico e Tratamento. BORGES, D. R.; ROTHSCILD, H.A. 22^a ed.São Paulo. Artes Médicas 2005.
18. CAMPOLINA, D. *Georreferenciamento e estudo clínico-epidemiológico dos acidentes escorpiônicos atendidos em Belo Horizonte, no serviço de toxicologia de Minas gerais*. 2006. 154f. Dissertação (Mestrado em Infectologia e Medicina Tropical) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
19. CANDIDO, D.M. Escorpiões. In: Joly, C.A, Dicudo, C.E.M. (eds) Biodiversidade do Estado de São Paulo, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo.1999 : 25-34.

20. CASALI et al. Differential effects of calcium channel antagonists on tityustoxin and ouabain-induced release of [3H] acetylcholine from brain cortical slices. *Neuropharmacology*, Oxford, v.34, n.6, p.599-603, jun. 1995.
21. CHAVEZ-OLORTEGUI, C. et al. ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, Oxford, v.32, n.12, p.1649-1656, dec. 1994.
22. CLOT-FAYBESSE, O. et al. Toxicity during early development of the mouse nervous system of a scorpion neurotoxin active on sodium channels. *Life Sciences*, Berkeley, v.66, n.3, p.185-192, jan. 2000.
23. CUPO, P.AZEVEDO-MARQUES, M.M.; MENEZES, J.B.;HERING, S.E. Escorpionismo. In: Barravieira, B.Venenos animais: uma visão integrada Rio de Janeiro, 1994: 229-312.
24. CUPO, P.; HERING, S.E. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, 2002; 40: 823-830.
25. D'SUZE, G. et al. Hystopatological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon*, Oxford, v.44, p.851-860, 2004.
26. D'SUZE, G. et al. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumor necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon*, v.4, p. 367-375, 2003.
27. DAVSON, H., AND SEGAL, M.B.(1995). *Physiology of the CSF and Blood-Brain Barriers*, CRC Press, Boca Raton, FL.
28. DE MATOS, I. M., ROCHA, O. A., LEITE, R., FREIRE MAIA, L., 1997. Lung edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118, 143-148.
29. DE MATOS, I. M. D., et al. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in the rats. *Toxicon*, Oxford, v.39, p.863-867, 2001.

30. DENAC, H. MEVISSSEN, M.; SCHOLTYSIK, G. 2000. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 362, 453-479.
31. DEVI, C.S., REDDY, C.N., DEVI, S.L., SUBRAHMANYAM, Y.R., BHATT, H.V., SUVARNAKUMARI, G., MURTHY, D.P., REDDY, C.R.R.M., 1970. Defibrination syndrome due to scorpion venom poisoning. *BMJ* 1, 345-347.
32. DIAS D.S., VIANA PUBLIO, C.C., DE MELO, A.R., FAZAN, R., JR., RUSCONE, T.G., PORTA, A., MALLIANI, A., SALGADO, H.C., MONTANO, N., 2002. Intravenous amiodarone modifies autonomic balance and increases baroreflex sensitivity in conscious rats. *Auton. Neurosc.* 95, 88-96.
33. DIAZ-CUETO, L., GERTON, G.L. The influence of growth factors on the development of perimplantation mammalian embryos. *Archives of Medical Research*, 2001; 32:619-626.
34. DIETCH, E.A. Multiple organ failure: pathophysiology and potential future therapy. *Ann. Surg.*, v.216, p. 117-134, 1992.
35. DORCE, V.A.C.; SANDOVAL, M.R.L. Effects of *Tityus serrulatus* crude venom on the GABAergic and dopaminergic systems of the rat brain. *Toxicon*, Oxford, v.32, n.12, p.1641-1647, dec.1994.
36. FASSEMBER, K. et al. Interleukin-6 and acute phase protein concentration in surgical intensive care unit patients: diagnostic signs in nosocomial infection. *Crit. Care Med.* v.21, p. 1175-1180, 1993.
37. FATANI, A.J., HARVEY, A.L., FURMAN, B.L., ROWAN, E.G. 2000. The effects of lignocaine on action of the venom from yellow scorpion "*Leiurus quinquestriatus*" in vivo and in vitro. *Toxicon* 38, 1787-1801.
38. FERNANDES, V.M.V. et al. Effects alpha-scorpion toxin, tityustoxin on the release of [3H] dopamine of rat brain prefrontal cortical slices. *Neurochemistry International*, v.44, n.22, p.91-97, jan. 2004.

39. FREIRE-MAIA, L.;CAMPOS, J. A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. *Natural toxin*, Oxford: Pergamon Press, 1989. p.139-159.
40. FREIRE-MAIA, L.;CAMPOS, J. A.; AMARAL,C. F. Approaches of scorpion envenoming. *Toxicon*, Oxford, v.32, n.9, p.1009-1014, sep. 1994.
41. FUKUHARA, Y.D. et al. Increased plasma levels of IL-1BETA, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately on severely envenomed *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*, Oxford, v.41, p.49-55, 2003.
42. FUKUHARA, Y.D. et al. The kinin system in the envenomation caused by the *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicology and Applied Pharmacology*, New York, v.196, n.3, p.390-395, may, 2004.
43. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhetos*. Brasília, 2001.
44. GUIDINE, P.A.M. et al. Carbamazepine protects the CNS of wistar rats against the central effects of scorpion envenomation. *Neurotoxicology*, v.29, p.136-142, 2008.
45. HAMED, M.I. Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12-years experience with serotherapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v.21, n.2, p.170-174, feb. 2003.
46. HAMILTON, P.J., OGSTON, D., DOUGLAS, A.S.,1974.Coagulant activity of the scorpion venom *Palamneus gravimanus* and *Leiurus quinquestriatus*.*Toxicon* 12, 291-296.
47. HIRANO, T. et al. Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunol. Today*. v.11, p.443-449, 1990.
48. ISMAIL, M. ABD-ELSALAM, M.A. Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue related to tissue venom concentration? *Toxicon*, Oxford, v.26, n.3, p.233-256, 1988.
49. ISMAIL, M. et al. Distribution of ¹²⁵I labeled scorpion (*Leiurus Quinquestriatus* H and E) venom in rat. *Toxicon*, Oxford, v.12, n.2, p.209-211, mar, 1974.

50. ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*, Oxford, v.33, n.7, p.825-858, jul.1995.
51. JANUÁRIO, M.C., CAMPOLINA, D. Acidentes por animais peçonhetos. In: *Manual de urgências em pronto socorro*. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica Ltda. 1996.
52. KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon*, Oxford, v.35, n.10, p.1523-1529, oct 1997.
53. KRENSKY, A.M. Biology and therapeutic implications of the chemokine RANTES. *A.C.I. Int.* v.5, p. 16-21, 1999.
54. KRIFI, M.N., KHARRAT, H., ZAGHAL, K., ABDAULI, M., ABROUG, F., BOUCHOUCHA, S., DELLAGI, K., EL, A.M., 1998. Developement of an ELISA for detection of scorpion venoms in sera of humans envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus*(Bot): correlation with clinical severity of envenoming in Tunisia. *Toxicon* 36, 887-900.
55. KUBES, P. The complexities of leukocyte recruitment. *Semin Immunol.* v.14, n.2, p. 65-72, 2002.
56. KUBES, P. & KERRFOOT, S.M. Leukocyte in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. *News Physiol. Sci.*, v.16, p.76-80, 2001.
57. LEY, K. *Physiology of Inflammation*. New york: Oxford University Press, 2001.
58. LOMONTE, B., et al. Host response Bothrops asper snake venom: analisys of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*, v.17, p.93-105, 1993.
59. LONGENECKER, G.L., LONGENECKER, H.E., 1981. Centuroides sculpturatus venom and platelet reactivity : possible role in scorpion venom induced defibrination syndrome. *Toxicon* 19, 153-157.
60. LOURENÇO, W.R. Description of a new species of *Tityus* (Scorpiones, Buthidae) from Serra do Cipó in the State of Minas Gerais, Brazil. *Revue Suisse de Zoologie*, 110 (2) : 427-435, 2003.

61. LOURENÇO, W.R. Scorpions of Brazil. Éditiones de l'If, Paris, 2002.
62. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
63. LUCAS, S.M; SILVA JR., P.I. Escorpiões de interesse médico no Brasil. In: Schvartsman, S. Plantas Venenosas e animais peçonhentos. São Paulo: Sarvier, 1992, p.211-215.
64. MAGALHÃES, M.M. et al. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*, Oxford, v.37, n.8, p.1155-1164, aug 1999.
65. MASSENSINI, A.R. et al. Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i. *Neuropharmacology*, Oxford, v.37, n.3, p.289-297. may 1998.
66. MEKI, A-R. M.A.; MOHEY EL-DEAN, Z.M. Serum Interleukin-1beta, Interleukin-6, Nitric oxide and alpha1-Antitripsin in scorpion envenomed children. *Toxicon*, v.36, n.12, p.1851-1859, 1998.
67. MESQUITA, M.B.S. et al. Centrally injected tityustoxin produces the systemic manifestation observed in severe scorpion poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology*, New York, v. 187, n.1, p.58-66, feb. 2003.
68. MESQUITA, M.B.S. et al. Phenobarbital blocks the lung edema induced by centrally injected Tityustoxin in adult wistar rat, *Neurosci. Lett*, v.332, p.119-122, 2002.
69. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/pdf/casos_escorpiões.pdf.
70. MOOS T., MORGAN EH., Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier mechanisms. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1999(in press)
71. MURRAY, J. et al. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirements for TNF-R55 and TNF-R75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood*, v.90, n.7, p. 2772-2783, 1997.

72. NENCIONE, A.L.A., et al. Central effects of *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* scorpion venoms after intraperitoneal injection in rats. *Neuroscience letters*, v.463, p.234-238.2009.
73. NEUWELT, E.A. Mechanisms of disease: the blood-brain barrier. *Neurosurgery* 54, 131-140.2004.
74. NUNAN, E.A., et al. Effect of age on body distribution of tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Life Sciences*, v.73, p.319-325, 2003.
75. NUNAN, E.A., et al. Lethal effect of the scorpion *Tityus serrulatus* venom: comparative study on adult and weanling rats. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*,v.37, n.1, jan/abr. 2001.
76. ONO, S.J., et al. Chemokines: roles in leucocyte development, trafficking and effector function. *J Allergy Clin Immunol.* v.111, n. 6, p.1185-1199, 2003.
77. PETRICEVICH, V.L.; PENA, C.F. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Mediators of Inflammation*,[S.I.], v.11, n.3, p.173-180, jun. 2002.
78. PETRICEVICH, V.L.Citokine and nitric production following severe envenomation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* v.3,n.3, p.325-332, 2004.
79. PETRICEVICH, V.L.Toxin gama from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages.*Toxicon*, v.50,p666-675,2007
80. PETRICEVICH, V.L.Scorpion venom and the inflammatory response.*Mediators os Inflammation*.2010;90329510, p.1-16, 2010.
81. PICCIO, L. et al. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1and heteromeric Gi-linked receptors. *J.Immunol.* v.168, p.1940-1949, 2002.
82. QUEIROZ, L. R. S. 100 animais brasileiros publicados no Estadão. In: O Estado de São Paulo. São Paulo, 1997.

83. RAPOSO, C., ZAGO, G.M., DA SILVA, G.H., DA CRUZ HOFLING, M.A., Acute blood-brain barrier permeabilization in rats after systemic Phoneutria nigriventer venom. *Brain Res.* 1149, 18-29.2007
84. REDDY, C.R.R.M., SUVARNAKUMARI, G., DEVI, C.S., REDDY, C.N., 1972. Pathology of scorpion venom poisoning. *J.Trop. Med. Hyg.* 75, 98-100.
85. REVELO. et al. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon*, Oxford, v.34, n.10, p.1119-1125, oct. 1996.
86. ROMANO-SILVA, M.A., et al. Tityustoxin-mediated Na⁺ influx is more efficient than KCl depolarisation in promoting Ca(2+)-dependent glutamate release from synaptosomes. *Neurosci Lett.*, v.169, n.1-2, p:90-92, 1994.
87. ROODT, A.R. et al. Epidemiological and clinical aspects of scorpionism by *Tityus trivittatus* in Argentina. *Toxicon* 41(8):971-977,2003.
88. SAMPAIO, S.V., et al. Izolation and characterization of toxic proteins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, Oxford, v.21, n.2, p.265-267, 1983.
89. SANDOVAL, M.R.L.; LEBRUM, I. TSII toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom: behavioral, electroencephalographic, and histopatologic. *Brown Research Bulletin*,v.62, p.165-172, 2003.
90. SANTANA, et al. Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by enzyme-linked immunisorbent assay in the rat. *Toxicon*, Oxford, v.34, n.9, p.1063-1066, sep. 1996.
91. SAUNDERS NR. Ontogenetic development of brain barrier mechanisms.In: Bradbury MWB (ed). *Handbook of Experimental Pharmacology vol.103. Physiology and Pharmacology of the Blood-Brain Barrier*. Springer- Verlag, Berlim.1992; Ch. 14.
92. SAUNDERS, N.R., KNOTT, G.W., and DZIEGIELEWSKA, K.M. (1999). Barriers in the immature brain. *Cell Mol. Neurobiol.* 20:29-40.
93. SOARES, M.R.M.; AZEVEDO, C.S.; MARIA, M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical*, 2002; 35(4): 359-363.

94. SHULZE, C.; FIRTH, A. Interendothelial junctions during blood-brain barrier development in the rat: morphological changes at the level of individual tight junctional contacts. *Development Brain Research*, v.69, n.1, p.85-95, 1992.
95. SOFER, S., et al. Interleukin-6 release following scorpion sting in children. *Toxicon*, v.34, p.389-392, 1996.
96. SOFER, S.; GUERON, M. Respiratory failure in children following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus*: hemodynamic and neurologic aspects. *Toxicon*, Oxford, v.26, p.931-939, 1988.
97. SPRINGER, T.A., Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Ann. Rev. Physiol.*, v.57, p.827-872, 1996.
98. TARASIUK, A. et al. Effects of antivenom serotherapy on hemodynamic pathophysiology in dogs injected with *L. quinquestriatus* scorpion venom. *Toxicon*, Oxford, v.36, n.7, p.963-971, jul. 1998.
99. TORRES, J.B; MARQUES, M.G.B; MARTINI, R.K.; BORGES, V.A. Acidente por *Tityus serrulatus* e suas implicações epidemiológicas no Rio Grande do Sul. *Revista Saúde Pública*, 2002;36(5):631-633.
100. UENO, M. et al. Blood-brain barrier permeability in the periventricular areas of the normal mouse brain. *Acta Neuropathologica*, Berlim, v.99, n.4, p.385-392, mar.
101. VEZZANI, A., et al. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav. Immun.*, v.22, p.797-803, 2008.
102. VIDAL, C.S., ANDRADE, M.V., MELO VIANA, G., et al. Ligation of the abdominal esophagus decreases scorpion toxin-induced gastric secretion in rats. *Acta Cir. Bras.*;19(3):168-174, May-June 2004.tab.
103. VIJVERBERG, H.P., PAURON, D., LAZDUNSKI, M., 1984. The effect of *Tityus serrulatus* scorpion toxin gamma on Na channels in neuroblastoma cells. *Plügers Arch.* 401, 297-303.

104. WARNICK, J.E., et al. Eletrophysiological observations on the action of purified scorpion venom, tityustoxin on nerve and skeletal muscle of rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Baltimore, v.198, p.155-167, 1976.
105. WISLOCKI GB. Experimental studies on fetal absortion. I. The vitally stained fetus. *Contrib. Embriol.* 5:45-42. 1920

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 5/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação do papel da toxina TsTx na microcirculação cerebral de ratos jovens: mecanismos celulares e moleculares envolvidos**", que tem como responsável(is) **Juliana Carvalho Tavares**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **12/ 08/2009**.

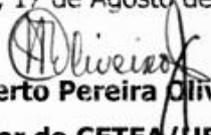
Este certificado expira-se em **12/ 08/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 5/2009**, related to the project entitled "**Avaluation of TsTx mechanisms, celular and molecular, at brain microcirculation in young rats**", under the supervisors of **Juliana Carvalho Tavares**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 12, 2009**.

This certificate expires in **August 12, 2014**.

Belo Horizonte, 17 de Agosto de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 -- Campus Pampulha
Unidade Administrativa II -- 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Apêndice I

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](#)