

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB**

***EFEITOS DA INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR
DA TITYUSTOXINA ESCORPIÔNICA (TsTX) SOBRE O
SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS SUBMETIDOS À
DESNUTRIÇÃO PROTÉICA***

Ouro Preto, 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB**

***EFEITOS DA INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DA
TITYUSTOXINA ESCORPIÔNICA (TsTX) SOBRE O SISTEMA
CARDIOVASCULAR DE RATOS SUBMETIDOS À
DESNUTRIÇÃO PROTÉICA***

**AUTORA: Fernanda Cacilda dos Santos Silva
ORIENTADOR: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Patrícia Alves Maia Guidine**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

Ouro Preto, 2011

S586e Silva, Fernanda Cacilda dos Santos.

Efeitos da injeção intracerebroventricular da Tityustoxina escorpionica (TsTX) sobre o sistema cardiovascular de ratos submetidos à desnutrição protéica [manuscrito] / Fernanda Cacilda dos Santos Silva. - 2011.
xxiv, 79f.: il.; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior.
Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Alves Maia Guidine.

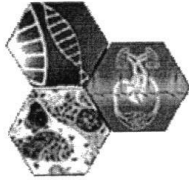
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

1. Desnutrição - Teses. 2. Sistema nervoso central - Teses. 3. Sistema cardiovascular - Teses. 4. Escorpião - Toxina - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 612.39:612.1

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas




164

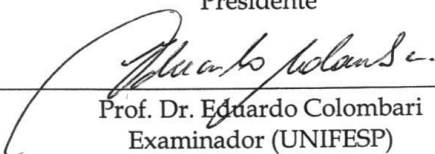
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

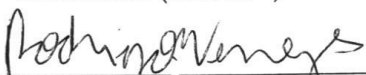
"AÇÃO CENTRAL DA TITYUSTOXINA ESCORPIÔNICA (TsTX) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA"

Aos 31 dias do mês de março de 2011, às 09:00h, na Sala de Seminários do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Fernanda Cacilda dos Santos Silva. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por **APROVAR** a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:


Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior
Presidente


Prof. Dr. Eduardo Colombari
Examinador (UNIFESP)


Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 31/03/2011

Este trabalho foi realizado no *Laboratório de Fisiologia Cardiovascular* do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com o auxílio financeiro da CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFOP.

“Não sou aquele que sabe, mas aquele que busca.”

(Herman Hesse)

“O importante é não parar de questionar.”

(Albert Einstein)

O Aprendizado é uma obra minuciosa e interminável...

Dedicatória

*À minha mãe e ao meu irmão Rodrigo,
meus maiores exemplos de vida, sabedoria e amor,
os grandes incentivadores de todos os meus sonhos.
Ao ensino público por esta valiosa oportunidade.
Àqueles doloridos dias, em que nada deu certo, cuja única
saída era seguir em frente...*

Agradecimentos

À Deus por me conceder a vida e estar comigo em todos os momentos, dos mais venturosos aos mais difíceis...

À minha amada mãe Cristina Constança dos Santos, pelo apoio, amizade e amor incondicionais.

Aos meus queridos irmãos Rodrigo Silva (Digo) e Tatiele Santos (Tatá), pela involuntária, mas constante inspiração.

À prima Janaína Santos (Jana), pela grande amizade, cumplicidade e por incessantemente suscitar o debate de boas idéias.

Ao Luiz Felipe Rabelo, pelo amor, zelo, compreensão, amizade e, principalmente, por me ensinar a ser “livre” e sempre me fazer sorrir.

À Família Doce Mistura, meu refúgio em Ouro Preto. Especialmente, à amiga e irmã Raquel Lana (Royal), pelo dia-a-dia repleto de amor, carinho, assistência, conselhos, broncas e muitas risadas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior (Déo), por me iniciar na carreira científica com tamanho otimismo, confiança, objetividade e competência. Por sua amizade, orientação, ensinamentos e, sobretudo, pela paciência e estímulo constantes... Por, incontestavelmente, acreditar em meu potencial. Muito obrigada por toda oportunidade oferecida desde a iniciação científica.

À Profa. Dra. Patrícia Alves Maia Guidine (Pat), por aceitar me co-orientar e fazê-lo com tanta doçura, dedicação, entusiasmo, paciência e brilhantismo. Muito obrigada por todo ensinamento,

pelas doces palavras de incentivo e por me fazer acreditar que anjos existem...

À Mara Fernandes Ribeiro (Maravilha), pelos ótimos momentos compartilhados, amizade, cumplicidade, torcida, dedicação e contribuição para o cumprimento deste projeto.

Aos Professores da banca examinadora, Prof. Dr. Eduardo Colombari e Prof. Dr. Rodrigo Menezes, por investirem seu valioso tempo na análise deste trabalho e oferecerem sua fundamental contribuição intelectual para a conclusão do mesmo.

Ao Professor Allan Cristian Gonçalves, exemplo de educador e competência, meu primeiro Mestre de Fisiologia, responsável por despertar em mim o entusiasmo e respeito por esta linda ciência.

Ao Prof. Dr. Luciano Gonçalves Fernandes, pelos ensinamentos e auxílio no início desta caminhada.

Ao Prof. Dr. Tasso-Moraes pelo constante e gentil fornecimento de Tityustoxina.

Ao Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva, pela prontidão e cortesia em ceder vários animais para experimentação.

Aos Técnicos, Milton Alexandre de Paula e Jair Pastor Mota, que com muita dedicação, carinho, simplicidade, alegria e exatidão na conduta de seu exercício, forneceram a mim o indispensável para a realização do meu trabalho.

Aos Profs. Drs. Márcio Moraes e André Ricardo Massensini, além de todos os membros do Núcleo de Neurociência da UFMG, por contribuírem para realização deste trabalho e por sempre me receberem amistosamente em sua "casa".

À Profa. Dra. Cláudia Carneiro e demais membros do LIMP, por gentilmente abrirem as portas do Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Ao Prof. Dr. Elísio Alberto Evangelista, por fazer do ensino, uma arte. Pela excelência, simplicidade e disponibilidade em ensinar.

Aos Amigos Joyce Ferreira da Costa Guerra e Ramon de Freitas Santos por compartilharem não só momentos de vitória, mas muitos momentos de estudo, esforço e insegurança e, sobretudo, por me ajudarem a superá-los.

Ao grande amigo José Luiz Marques Rocha (Phorçado), por nunca medir esforços em me ajudar e me fazer feliz. Por me inspirar, acompanhar e auxiliar moralmente e cientificamente desde a graduação.

À Secretária do NUPEB e amiga, Maria Aparecida Reis Trópia (querida Cidoca), por sua competência, paciência, dedicação, carinho e sorriso constante. Por tornar o NUPEB um ambiente descontraído, sem comprometer a seriedade do seu ofício.

Aos “velhos” e “novos” amigos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFP, que nesses 5 anos, tanto me ensinaram. Por me proporcionarem um ambiente de trabalho extremamente agradável. Em especial:

À amiga Arlete Penitente, exemplo de solidariedade e competência. Obrigada por sempre me auxiliar e torcer por mim!

Às “Ativistas da Liberdade de Expressão”: Vanessa Bezerra, Fabiana Rodrigues e Joelma Gomide. Pela amizade, companheirismo, ensinamentos e pelos inúmeros e saudosos momentos felizes.

Aos Amigos Luiz Henrique Fortes (Lulu), Aline Rezende (Tchuca) e Natália Machado (Nat) por serem imprescindíveis...

Aos amigos João Victor Albuquerque, Aline Souza, Alessandra Rezende (Leça), Allisson Granato, Ana Carolina Barcelos, Arthur Alves, Gabriel Borges, Marcela D’Marchi, Míriam Rodrigues, Pedro Miranda e Sílvia Zebra, pela descontração e prontidão em ajudar.

À Universidade Federal de Ouro Preto, gratuita e de qualidade, por todos os ensinamentos desde a graduação.

Às instituições de apoio a pesquisa, que acreditam no jovem pesquisador e proporcionam condições para realização do trabalho científico.

Aos colegas de Mestrado, professores e demais membros do NUPEB, pelo convívio, auxílio e aprendizado.

A todos que contribuíram para minha formação moral e acadêmica...

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1-Escorpionismo	1
1.1.1- Epidemiologia.....	1
1.1.2- Quadro Clínico, Classificação e Tratamento	3
1.1.3- Principal agente causal: <i>Tityus serrulatus</i>	4
1.1.4- Veneno e Toxinas do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> : composição, purificação e mecanismo de ação	5
1.1.5-Ação da TsTX sobre o Sistema Nervoso Central e Cardiovascular	7
1.2- O Sistema Nervoso Central e a regulação Cardiovascular	8
1.3-Desnutrição.....	10
1.3.1- Definição e Epidemiologia	10
1.3.2- Desnutrição Experimental e seus efeitos sobre os sistemas fisiológicos	10
1.4- Escorpionismo vs. Desnutrição	12
2 – OBJETIVOS	13
2.1 – Objetivo Geral:	13
2.2 – Objetivos Específicos:	13
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 – Modelo Animal.....	14
3.2 – Metodologia da Desnutrição	14
3.3 – Composição Química da Dieta para Desnutrição	15
3.4 - Preparo de drogas/substâncias utilizadas.....	16
3.5- Confeção de Cânulas-guia, agulha de implantação e agulha injetora	17
3.6– Confeção de Cânulas arteriais e venosas	18
3.7– Confeção de eletrodos para registro eletrocardiográfico	18
3.8- Cirurgias	19
3.8.1- Implante de cânula-guia dirigida ao Ventrículo Lateral Esquerdo (VLE) ...	19
3.8.2- Implante de cânulas femorais e eletrodos.....	19
3.8.3- Cuidados pós-operatórios	21
3.9- Registros de Pressão arterial e Eletrocardiograma	22
3.10- Protocolos experimentais.....	23
3.10.1 – Efeitos da injeção i.c.v. de TsTX sobre o Sistema Cardiovascular (SC) e sobrevida em diferentes estados nutricionais.....	23
Microinjeção de TsTX no VLE	24
3.10.2- Efeitos das diferentes doses de Carbamazepina sobre as manifestações cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX.....	24

3.10.3 – Efeitos da Carbamazepina sobre as respostas cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em diferentes estados nutricionais	26
3.10.4 – Efeitos do bloqueio autonômico sobre as respostas cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em diferentes estados nutricionais.....	26
3.11- Histologia	27
3.12- Análise dos dados	28
3.12.1- Análise da Frequência Cardíaca (FC) e da Pressão Arterial Média (PAM)... ..	28
3.12.2- Análise da porcentagem de sobrevida após a microinjeção (i.c.v.) de TsTX no VLE.....	29
3.12.3- Análise estatística	29
4 – RESULTADOS	30
4.1- Efeitos da desnutrição protéica pós-desmame sobre o peso corpora, peso cerebral e níveis basais de PAM e FC.	30
4.2- Efeitos da injeção i.c.v. de TsTX sobre o Sistema Cardiovascular e sobrevida em diferentes estados nutricionais	32
4.3- Efeitos das diferentes doses de Carbamazepina sobre as manifestações cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX.....	34
4.4- Efeitos da Carbamazepina sobre as respostas cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em diferentes estados nutricionais	36
4.5 – Efeitos do bloqueio autonômico sobre as respostas cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em diferentes estados nutricionais	39
4.6- Sítio de microinjeção da TsTX no Ventrículo Lateral Esquerdo	43
6- CONCLUSÕES	50
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8- APÊNDICES	59
9- PRODUÇÃO CIENTÍFICA	78
9.1- Resumos publicados em Congressos Nacionais.....	78
9.2- Resumos publicados em Congressos Internacionais	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** (A) Escorpião *Tityus serrulatus* e (B) *T. serrulatus* com filhotes no dorso. Fonte: Manual de Controle de Escorpiões. Ministério da Saúde; 2009.....5
- Figura 2:** Topologia de um CSDV. (A) Subunidade α do canal, com seus 4 domínios (I a IV), cada um com 6 segmentos transmembrana (S1 a S6). (B) Poro do canal circundado pelos 4 domínios. (C) Sítios de ligação: (3) sítio de ligação da TsTX, (4) sítio de ligação da TsTX-I. Fonte: adaptação de Denac et al. (2000).....6
- Figura 3:** Cronograma da metodologia de desnutrição protéica. Após o nascimento, os animais foram amamentados por um período de 28 dias. Em seguida, foram divididos em dois grupos: normonutrido (dieta com 15% de proteína) e desnutrido (dieta com 6% de proteína) por um período de 35 dias. Após esse período, os animais foram utilizados para experimentação por no máximo 7 dias.....15
- Figura 4:** Imagem representativa de um conector RJ45 conectado aos fios de cobre. Fio 1 – (V2), fio 2 - (terra), fio 3 - (V1). O posicionamento dos fios será descrito detalhadamente no item 3.8.2.....18
- Figura 5:** As letras A e B ilustram de forma esquemática, respectivamente: **A** – Local de dissecação do trígono femoral e **B**- Isolamento da artéria e veia femoral e inserção dos cateteres. Fonte: (Fortes, 2010).....20
- Figura 6:** Desenho esquemático do implante de eletrodos para aquisição do sinal eletrocardiográfico. Fonte: (Fortes, 2010).....21
- Figura 7:** Representação da janela de visualização do software Kananda® durante o registro eletrocardiográfico e de pressão arterial. Canais de registro: 1- ECG, 2-PAP, 3-FC e 4-PAM.....22
- Figura 8:** Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação da injeção i.c.v. da TsTX sobre o Sistema Cardiovascular. As setas representam, da esquerda para a direita, o início do registro ou a administração de substâncias (Veículo, PBS e TsTX). A via de inoculação e a dose utilizada estão indicadas entre parênteses. O registro do protocolo experimental foi dividido em 4 períodos, da esquerda para direita: Intervalo anterior aos períodos, VEC, PBS e TsTX, cujas janelas temporais estão representadas em minutos.....23
- Figura 9:** Escala temporal do protocolo experimental para avaliação do efeito das diferentes doses da Carbamazepina sobre as manifestações cardiovasculares desencadeadas pela ação central da TsTX. As setas representam, da esquerda para a direita, o início do registro pós-tratamento ou a administração de substâncias (Veículo ou CBZ, PBS e TsTX). A via de inoculação e a dose utilizada estão indicadas entre parênteses. O registro do protocolo experimental foi dividido em 4 períodos, da esquerda para direita: Intervalo anterior aos períodos, VEC/CBZ, PBS e TsTX, cujas janelas temporais estão representadas em minutos.....25

Figura 10: Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação dos efeitos da Carbamazepina (50mg/kg) sobre as respostas cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em diferentes estados nutricionais. As setas representam, da esquerda para a direita, o início do registro pós-tratamento ou a administração de substâncias (Veículo ou CBZ, PBS e TsTX). A via de inoculação e a dose utilizada estão indicadas entre parênteses. O registro do protocolo experimental foi dividido em 4 períodos, da esquerda para direita: Intervalo anterior aos períodos registrados, VEC/CBZ, PBS e TsTX, cujas janelas temporais estão representadas em minutos.....26

Figura 11: Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação dos efeitos do bloqueio autonômico sobre as respostas cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em diferentes estados nutricionais. As setas representam, da esquerda para a direita, a administração de substâncias (PBS, Prazosin ou Metil-atropina e TsTX). A via de inoculação e a dose utilizada estão indicadas entre parênteses. O registro do protocolo experimental foi dividido em 4 períodos, da esquerda para direita: Basal, PBS, Prazosin ou Metil-atropina e TsTX, cujas janelas temporais estão representadas em minutos.....27

Figura 12: (A) Efeito da desnutrição protéica pós-desmame sobre o peso corporal (g), e (B) efeito da desnutrição protéica sobre o peso cerebral (g) do grupo Normonutrido e Desnutrido. Barras representam média \pm EPM. *; Diferença estatística ($p < 0,05$; Test t - não pareado).....30

Figura 13: (A) Níveis basais de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) dos grupos Normonutrido e Desnutrido. Barras representam média \pm EPM. *; Diferença estatística ($p < 0,05$; Test t - não pareado).....31

Figura 14: (A) Níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos e desnutridos pré-tratados com veículo (NV e DV). Os símbolos representam média \pm EPM. *; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e #; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).....33

Figura 15: Porcentagem de sobrevida (%) em relação ao tempo (min) após injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com veículo. * Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).....34

Figura 16: (A) Níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) de ratos Normonutridos inoculados com TsTX após o pré-tratamento com veículo (NV) ou com diferentes doses de Carbamazepina (NCBZ50, NCBZ75 e NCBZ100). Barras representam média \pm EPM. *; Diferença estatística em relação ao grupo (NV), ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Tukey).....35

Figura 17: Porcentagem de sobrevivência (%) em relação ao tempo (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos pré-tratados com veículo (NV) ou com diferentes doses de Carbamazepina (NCBZ50, NCBZ75 e NCBZ100). *Diferença estatística em relação ao grupo Veículo ($p < 0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas) e; Diferença estatística em relação ao grupo NCBZ50 ($p < 0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).....36

Figura 18: (A) Níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos pré-tratados com veículo (NV) ou Carbamazepina na dose de 50 mg/kg (NCBZ). Os símbolos representam média \pm EPM. *; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni).....37

Figura 19: (A) Níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos desnutridos pré-tratados com veículo (DV) ou com Carbamazepina na dose de 50 mg/kg (DCBZ). Os símbolos representam média \pm EPM. *; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni).....38

Figura 20: Porcentagem de sobrevivência (%) em relação ao tempo (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos e desnutridos pré-tratados com veículo (NV e DV) ou com 50mg/kg de Carbamazepina (NCBZ e DCBZ). *Diferença estatística em relação ao grupo Normonutrido Veículo ($p < 0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).....39

Figura 21: (A) Níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos pré-tratados com Prazosin. Os símbolos representam média \pm EPM. **; Diferença estatística entre os grupos no período PZS ($p < 0,05$; Teste t- não pareado);*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni); #, Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova One-way, pós-teste de Dunnett).....40

Figura 22: Porcentagem de sobrevivência (%) em relação ao tempo (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com veículo (NV e DV) ou Prazosin (NP e DP). *; Diferença estatística em relação ao grupo Normonutrido Veículo ($p < 0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).....41

Figura 23: (A) Níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg), (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos pré-tratados com Metil-atropina e (C) Níveis de PAM e FC após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos pré-tratados com Veículo (NV, DV) e com Metil-atropina (NM e DM). Os símbolos representam média \pm EPM. *Diferença estatística entre os grupos NM e DM ($p < 0,05$, Anova two-way; Pós teste de Bonferroni); **Diferença estatística entre os grupos DV e DM ($p < 0,05$, Anova two-way; Pós teste de Bonferroni); #, Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$, Anova One-way, pós-teste de Dunnetts).....42

Figura 24: Porcentagem de sobrevivência (%) em relação ao tempo (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV e DV) ou Metil-atropina (NM e DM). *; Diferença estatística em relação ao grupo Normonutrido Veículo ($p < 0,05$, estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).....43

Figura 25: Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de um rato Normonutrido (A) e Desnutrido (B), com seus respectivos sítios de microinjeção no VLE.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Epidemiologia do Escorpionismo (2006): número de casos, incidência (x 100.000 hab.), óbitos e letalidade por UF. Fonte: Manual de Controle de Escorpiões. Ministério da Saúde; 2009.....	2
Tabela 2: Acidentes escorpiônicos: Classificação, manifestação clínicas e tratamento. Fonte: Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Ministério da Saúde, 2001.....	4
Tabela 3: Composição química da dieta de desnutrição (g/100g de ração).....	15
Tabela 4: Confeção de cânulas femorais.....	18
Tabela 5: Análise da FC e PAM.....	28
Tabela 6: Efeito da desnutrição sobre o peso corporal dos ratos (g). *; Diferença estatística entre os grupos (p<0,05; Test t - não pareado).....	59
Tabela 7: Efeito da desnutrição sobre o peso cerebral dos ratos (g).....	60
Tabela 8: Níveis basais de PAM (mmHg) e FC (bpm) dos grupos Normonutrido e Desnutrido. *; Diferença estatística entre os grupos (p<0,05; Test t - não pareado).....	60
Tabela 9: Níveis de PAM (mmHg) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos e desnutridos pré-tratados com veículo (NV e DV). *; Diferença estatística entre os grupos (p<0,05; Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e #; Diferença estatística intra-grupo (p<0,05; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).....	61
Tabela 10: Níveis de FC (bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos e desnutridos pré-tratados com veículo (NV e DV). *; Diferença estatística entre os grupos (p<0,05; Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e #; Diferença estatística intra-grupo (p<0,05; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).....	62
Tabela 11: Tempo de sobrevivência (min) após injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com veículo. *; Diferença estatística entre os grupos (p<0,05, estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).....	62
Tabela 12: Níveis de PAM (mmHg) de ratos Normonutridos inoculados com TsTX após o pré-tratamento com veículo (NV) ou com diferentes doses de Carbamazepina (NCBZ50, NCBZ75 e NCBZ100). *; Diferença estatística em relação ao grupo (NV), (p<0,05; Anova one-way, pós-teste de Tukey) e #; Diferença estatística intra-grupo (p<0,05; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).....	63

Tabela 13: Níveis de FC (bpm) de ratos Normonutridos inoculados com TsTX após o pré-tratamento com veículo (NV) ou com diferentes doses de Carbamazepina (NCBZ50, NCBZ75 e NCBZ100). *; Diferença estatística em relação ao grupo (NV), ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Tukey) e #; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).....64

Tabela 14: Tempo de sobrevivência (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos após o pré-tratamento com veículo (NV) ou com diferentes doses de Carbamazepina (NCBZ50, NCBZ75 e NCBZ100). *; Diferença estatística em relação ao grupo (NV); °; Diferença estatística em relação ao grupo (NCBZ50); ($p < 0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).....65

Tabela 15: Níveis de PAM (mmHg) antes e após injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos pré-tratados com veículo (NV) ou com Carbamazepina na dose de 50mg/Kg (NCBZ). *; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e #; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$, Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).....66

Tabela 16: Níveis de FC (bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos pré-tratados com veículo (NV) ou com Carbamazepina na dose de 50mg/Kg (NCBZ). *; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e #; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).....67

Tabela 17: Níveis de PAM (mmHg) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos desnutridos pré-tratados com veículo (DV) ou com Carbamazepina na dose de 50mg/kg (DCBZ). *; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e #; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).....68

Tabela 18: Níveis de FC (bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos desnutridos pré-tratados com veículo (DV) ou com Carbamazepina na dose de 50mg/kg (DCBZ).*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e #; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).....68

Tabela 19: Tempo de sobrevivência (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV, DV) ou Carbamazepina 50mg/kg (NCBZ, DCBZ).*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).....69

Tabela 20: Níveis de PAM (mmHg) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Prazosin (NP,DP).**; Diferença estatística entre os grupos no período PZS ($p < 0,05$; Teste t- não pareado);*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni); #, Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova One-way, pós-teste de Dunnett).....69

Tabela 21: Níveis de PAM (mmHg) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV, DV) e com Prazosin (NP,DP). *; Diferença estatística entre os grupos (p<0,05; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni).....	70
Tabela 22: Níveis de FC(bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Prazosin (NP,DP). *; Diferença estatística entre os grupo (p<0,05; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni); #, Diferença estatística intra-grupo (p<0,05; Anova One-way, pós-teste de Dunnett).....	71
Tabela 23: Níveis de FC (bpm) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV, DV) e com Prazosin (NP,DP). *; Diferença estatística entre os grupos (p<0,05; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni).....	72
Tabela 24: Tempo de sobrevida (min) após injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV, DV) ou com Prazosin (NP, DP). *; Diferença estatística em relação ao grupo (NV); (p<0,05; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).....	73
Tabela 25: Níveis de PAM (mmHg) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Metil-atropina (NM,DM). *; Diferença estatística entre os grupos (p<0,05; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni); #, Diferença estatística intra-grupo (p<0,05; Anova One-way, pós-teste de Dunnett).....	73
Tabela 26: Níveis de PAM (mmHg) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV, DV) e com Metil-atropina (NM,DM). *; Diferença estatística entre os grupos Desnutrido Veículo e Desnutrido Metil (p<0,05, Anova two-way; Pós teste de Bonferroni).....	74
Tabela 27: Níveis de FC (bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Metil-atropina (NM,DM). *; Diferença estatística entre os grupos (p<0,05; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni); #, Diferença estatística intra-grupo (p<0,05; Anova One-way, pós-teste de Dunnett).....	75
Tabela 28: Níveis de FC (bpm) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV, DV) e com Metil-atropina (NM,DM). *; Diferença estatística entre os grupos Desnutrido Veículo e Desnutrido Metil (p<0,05, Anova two-way; Pós teste de Bonferroni).....	76
Tabela 29: Tempo de sobrevida (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV, DV) ou com Metilatropina (NM, DM). *; Diferença estatística em relação ao grupo (NV), (p<0,05; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

a.a	Aminoácidos
AP	Ântero-posterior
AS	Soro antiescorpiônico
BHE	Barreira Hematoencefálica
bpm	Batimentos por minuto
CBZ	Carbamazepina
CEUA	Comissão de Ética de Uso Animal
CG	Cânula-guia
CSDVs	Canais para Sódio dependentes de voltagem
CVLM	Bulbo caudoventrolateral
Da	Daltons
DCBZ	Grupo Desnutrido Carbamazepina
DM	Grupo Desnutrido Metil-atropina
DP	Grupo Desnutrido Prazosin
DV	Dorso-ventral
DV	Grupo Desnutrido Veículo
ECG	Eletrocardiograma
FC	Frequência Cardíaca
HDM	Hipotálamo Dorsomedial
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.m.	Intramuscular

i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
LL	Látero-lateral
mmHg	Milímetros de mercúrio
NCBZ	Grupo Normonutrido Carbamazepina
NCBZ100	Grupo Normonutrido Carbamazepina (100 mg/kg)
NCBZ50	Grupo Normonutrido Carbamazepina (50 mg/kg)
NCBZ75	Grupo Normonutrido Carbamazepina (75 mg/kg)
NM	Grupo Normonutrido Metil-atropina
NP	Grupo Normonutrido Prazosin
NTS	Núcleo do Trato Solitário
NV	Grupo Normonutrido Veículo
p/v	Peso por volume
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PAM	Pressão Arterial Média
PBS	Salina tamponada com fosfato (pH: 7,2)
PE	Tubo de polietileno
PPG	Propilenoglicol
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
PZS	Prazosin
RVLM	Bulbo rostroventrolateral
s.c.	Subcutâneo

SC	Sistema Cardiovascular
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TiTX- γ	Toxina Gama (β -toxina)
TsTX	Tityustoxina (α -toxina)
TsTX1	Início do registro do Período TsTX
TsTX2	Meio do registro do Período TsTX
TsTX3	Final do registro do Período TsTX
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
VEC	Período Veículo
VEC/ CBZ	Período Veículo ou CBZ
VLE	Ventrículo Lateral Esquerdo

RESUMO

A Síndrome do envenenamento escorpiónico constitui um problema de saúde pública mundial, com prevalência alta em países subtropicais, principalmente na faixa etária infantil. A Tityustoxina (TsTX), alvo deste estudo, é uma das principais toxinas extraídas do veneno bruto do *T. serrulatus* e possui toxicidade elevada. Liga-se ao sítio III dos canais para sódio dependentes de voltagem (CSDVs), retarda o processo de inativação destes canais, aumenta a permeabilidade da membrana ao sódio e, conseqüentemente, eleva a excitabilidade celular. Há indícios de que as alterações cardiovasculares observadas no envenenamento grave decorrem da ação direta destas toxinas sobre o sistema nervoso central (SNC). Adicionalmente, é sabido que alguns fatores, como a saúde prévia do paciente, podem influenciar na sintomatologia do escorpionismo. Neste contexto, a desnutrição também é uma síndrome de importância epidemiológica mundial que acomete, principalmente, crianças em países em desenvolvimento. Dados prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que ratos desnutridos apresentam alterações nos mecanismos de controle cardiovascular. Assim, a hipótese de que a desnutrição pode ser um fator modificador da ação central da TsTX e de seus efeitos decorrentes torna esse modelo um importante instrumento para o entendimento fisiopatológico do escorpionismo. Esse trabalho objetiva avaliar os efeitos da injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de TsTX sobre o Sistema Cardiovascular (SC) de ratos Fischer submetidos à desnutrição protéica. Os ratos (n=69) foram divididos em dois grupos: Normonutrido e Desnutrido, que receberam, respectivamente, 15% e 6% de proteína na dieta. Os animais foram submetidos ao implante de cânulas-guia no Ventrículo Lateral Esquerdo para a microinjeção de TsTX e ao implante de cateteres femorais (venosos e arteriais) e eletrodos, para a infusão de drogas e aquisição dos valores de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC). Os resultados mostraram que a desnutrição protéica reduziu o peso corporal e aumentou os níveis basais de PAM e FC. A microinjeção de TsTX (1,74 µg/µL) induziu o aumento de PAM em ambos os grupos, embora este aumento tenha sido menor e ocorrido com maior latência no grupo Desnutrido. Adicionalmente, elevou a FC apenas no grupo Normonutrido, mas provocou óbito em 100% dos animais dos dois grupos. Contudo, o Grupo Desnutrido apresentou maior sobrevida. O bloqueio dos CSDVs com Carbamazepina (50mg/kg; i.p.) atenuou o aumento de PAM evocado pela TsTX e aumentou a sobrevida apenas dos animais normonutridos. O bloqueio dos receptores $\alpha 1$ -

adrenérgicos com Prazosin reduziu os níveis basais de PAM nos dois grupos, sendo essa redução mais acentuada nos ratos desnutridos. No entanto, aumentou os níveis basais de FC apenas no grupo Normonutrido. Já o bloqueio dos receptores muscarínicos com Metil-atropina não modificou os níveis basais de PAM em nenhum grupo, mas aumentou a FC basal no grupo Normonutrido. Adicionalmente, alterou o perfil das respostas pressora e cronotrópica cardíaca resultantes da ação da TsTX (maior aumento de PAM e elevação da FC), exclusivamente no grupo Desnutrido. Contudo, os bloqueios autonômicos não alteraram a sobrevivência dos animais. Finalmente, estes resultados sugerem que a desnutrição atenua a sintomatologia decorrente da ação direta da TsTX sobre o SNC, provavelmente, devido à diminuição dos sítios de ligação (CSDVs) para a toxina. Sendo assim, a gravidade dos sintomas evocados pela injeção i.c.v. de TsTX pode estar estreitamente relacionada à intensidade com que esta toxina age sobre o SNC.

ABSTRACT

The scorpion envenomation syndrome is a public health matter in tropical regions around the world, mainly in children. The Tityustoxin (TsTX), the target of our study, is one of the main toxins extracted from the *T. serrulatus* scorpion venom. It binds to the site III of the voltage-gated sodium channels (VGSC), slowing its inactivation and increasing the membrane permeability to sodium and cellular excitability. There are evidences that the cardiovascular changes observed in severe scorpion envenomation result from the direct action of these toxins on the central nervous system (CNS). Additionally, it is known that some factors as the patient's previous health may influence scorpion symptoms. In this context, undernutrition is also an important global epidemiological syndrome that mainly affects children in developing countries. Previous data from our laboratory have shown that undernourished rats present changes in cardiovascular control mechanisms. Thus, we hypothesized that undernutrition may be a modifying factor for the TsTX central action and its effects makes the undernutrition model an important tool to understand the scorpion envenomation. The objective of this work was to assess the effects of TsTX injection in left lateral ventricle (LLV) on the Cardiovascular System (CS) of Fischer rats submitted to protein restriction diet. Rats (n=69) were divided into two groups: Wellnourished and Undernourished groups, which received, respectively, 15% and 6% of protein in the diet composition. Animals were submitted to guide cannulae implantation into the LLV for TsTX microinjection, femoral catheters (arterial and venous) and electrodes implantation for drugs infusion and mean arterial pressure (MAP) and heart rate values acquisition (HR). Our results showed that the undernutrition model reduced the body weight and increased the MAP and HR baseline values. The TsTX microinjection (1.74 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) induced a MAP increase in both groups, although this increase was smaller and occurred with higher latency in the Undernourished group. Moreover, the TsTX induced a HR elevation only in the Wellnourished group. It induced death in 100% of the animals from both groups. Nevertheless, the Undernourished group had a greater survival time. The VGSC blockade with Carbamazepine (50mg/kg, i.p.) attenuated the MAP increase evoked by TsTX microinjection and increased the survival time only in Wellnourished group. The α 1- adrenergic receptors blockade with Prazosin (1mg/kg/mL; i.v.) reduced MAP basal levels in both groups, mainly in the Undernourished rats. However, there was an increase in HR basal levels only in Wellnourished group. On the other hand, the muscarinic

receptors blockade with methyl-atropine (1mg/kg/mL; i.v.) did not affect MAP basal levels in both groups, although there was an increase in HR only in the Wellnourished group. Additionally, it changes the pressor and chronotropic cardiac responses profile resulting from the TsTX action (higher increase in MAP and HR elevation), exclusively in Undernourished group. Besides, the blockade with both drugs did not modify the survival rate in neither group. Finally, these results suggest that the protein restriction attenuates the manifestations resulting from TsTX action on CNS, probably due to a reduction in binding sites (VGSCs) for TsTX. Thus, the severity of symptoms evoked by TsTX injection in LLV may be closely related with the intensity which this toxin acts on CNS.

1-INTRODUÇÃO

1.1-Escorpionismo

1.1.1- Epidemiologia

O escorpionismo, ou síndrome do envenenamento escorpiônico, configura um relevante problema de saúde pública mundial, devido à sua elevada incidência e potencial gravidade dos sintomas (Ministério Da Saúde, 2009a).

Esse tipo de acidente ocorre principalmente em países tropicais, onde o clima quente e úmido favorece a proliferação dos escorpiões. No Brasil, a ocorrência do escorpionismo é elevada. De caráter predominantemente urbano, sua incidência elevou-se nos últimos anos, particularmente nas regiões Nordeste e Sudeste, apresentando mais de 35.000 acidentes em 2005 (um aumento de 55% em relação a 2004). Apenas em 2006, ocorreram mais de 38.000 notificações, com coeficiente de incidência de aproximadamente 21 casos/100.000 habitantes, sendo o estado de Minas Gerais o recordista de notificações com quase 10.000 casos (**Tabela 1**) (Ministério Da Saúde, 2009a). De forma semelhante, as notificações nacionais ultrapassaram 37.000 casos em 2008 (Ministério Da Saúde, 2009b).

Grande parte das ocorrências apresenta evolução benigna. Entretanto, apesar do discreto índice nacional de letalidade (0,08%), as manifestações graves e o óbito se tornam preocupantes na faixa etária pediátrica. Crianças abaixo de 10 anos exibem maior risco de evoluir para o óbito (0,7%). Dos 86 óbitos registrados em 2008, 52,3% corresponderam a menores de 14 anos (Ministério Da Saúde, 2009b). Adicionalmente, Fan et al relataram que os casos graves e óbitos, frequentemente, estão associados a menores de 6 anos (Fan *et al.*, 1994). Sendo assim, as crianças representam um grupo vulnerável a um prognóstico ruim.

UF	Casos		Óbitos	
	nº	inc.	nº	letal.
RO	140	9,0	1	0,71
AC	48	7,0	-	-
AM	200	6,0	-	-
RR	34	8,4	-	-
PA	1.268	17,8	3	0,24
AP	149	24,2	-	-
TO	216	16,2	1	0,46
MA	159	2,6	-	-
PI	297	9,8	-	-
CE	555	6,8	-	-
RN	1.551	51,0	-	-
PB	899	24,8	-	-
PE	6.899	81,1	1	0,01
AL	2.586	84,8	-	-
SE	131	6,5	-	-
BA	6.041	43,3	12	0,2
MG	9.955	51,1	10	0,1
ES	757	21,9	-	-
RJ	238	1,5	-	-
SP	4.576	11,1	1	0,02
PR	561	5,4	-	-
SC	149	2,5	-	-
RS	59	0,5	-	-
MS	160	7,0	-	-
MT	321	11,2	1	0,31
GO	761	13,3	-	-
DF	122	5,1	-	-
Brasil	38.878	20,8	30	0,08

Tabela1: Epidemiologia do Escorpionismo (2006): número de casos, incidência (x 100.000 hab.), óbitos e letalidade por UF. Fonte: Manual de Controle de Escorpiões. Ministério da Saúde; 2009.

1.1.2- Quadro Clínico, Classificação e Tratamento

As manifestações clínicas podem ser divididas em locais ou sistêmicas. Dentre as manifestações locais, a mais comum é a dor cuja intensidade depende da sensibilidade individual e da quantidade de veneno inoculado (Hering *et al.*, 1992). Também podem ocorrer parestesias (sensação cutânea subjetiva: frio, calor, formigamento, pressão, etc.), hiperemia, edema, sudorese localizada, além de piloereção. Estas manifestações apresentam duração de até 24 horas, embora o quadro mais intenso ocorra nas primeiras horas após o acidente. Já as manifestações sistêmicas, como sudorese profusa, agitação psicomotora, tremores, náuseas, vômitos, sialorréia, hipertensão ou hipotensão arterial, arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca congestiva, edema pulmonar agudo e choque, podem aparecer dentro de minutos a horas após o envenenamento (Ministério Da Saúde, 2001).

A classificação dos casos de envenenamento escorpiônico é realizada de acordo com a gravidade dos sintomas, manifestações clínicas e tratamento instituído (**Tabela 2**).

Alguns fatores como idade e saúde prévia do paciente, espécie do escorpião, conteúdo do veneno nas glândulas do artrópode, local e número de picadas, além da quantidade de veneno inoculado influenciam a gravidade do envenenamento (Dehesa-Davila e Possani, 1994). Assim, o diagnóstico e tratamento precisos são importantes para evolução favorável do caso.

As abordagens utilizadas na terapia do envenenamento englobam o soro antiescorpiônico (SA), cujo principal alvo terapêutico é neutralizar o veneno circulante, além do tratamento sintomático e suporte das funções vitais. Apesar da ampla utilização do SA, sua efetividade é questionada em função das diferentes propriedades farmacocinéticas apresentadas pelo veneno e seu antídoto (Gueron *et al.*, 1992; Hamed, 2003). Enquanto as toxinas do veneno possuem baixo peso molecular, difundindo-se rapidamente para os tecidos (meia-vida de distribuição de 4 a 7 minutos e meia-vida de eliminação de 4,2 a 13,4 horas), as imunoglobulinas do soro possuem elevado peso molecular, apresentando absorção e distribuição lentas (Abroug *et al.*, 1999; Hamed, 2003). Assim, o SA parece ser eficaz somente quando administrado de forma precoce após a inoculação do veneno. Esse fator, associado à dificuldade de se encontrar o SA em unidades de saúde de menor porte, torna necessário a busca por outras medidas que sejam eficazes no combate aos sintomas decorrentes do escorpionismo.

Quadro V
Acidentes escorpiônicos
Classificação dos acidentes quanto à gravidade, manifestações clínicas e
tratamento específico

Classificação	Manifestações Clínicas	Soroterapia (n° de ampolas) SAEEs ou SAAR**
Leve*	Dor e parestesia locais	-
Moderado	Dor local intensa associada a uma ou mais manifestações, como náuseas, vômitos, sudorese, sialorréia discretos, agitação, taquipnéia e taquicardia.	2 a 3 IV
Grave	Além das citadas na forma moderada, presença de uma ou mais das seguintes manifestações: vômitos profusos e incoercíveis, sudorese profusa, sialorréia intensa, prostração, convulsão, coma, bradicardia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar agudo e choque.	4 a 6 IV***

* Tempo de observação das crianças picadas: 6 a 12 horas.

** SAEEs = Soro antiescorpiônico/SAAR = Soro antiaracnídico.

*** Na maioria dos casos graves quatro ampolas são suficientes para o tratamento, visto que neutralizam o veneno circulante e mantêm concentrações elevadas de antiveneno circulante por pelo menos 24 horas após a administração da soroterapia.

Tabela 2: Acidentes escorpiônicos: Classificação, manifestação clínicas e tratamento. Fonte: Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Ministério da Saúde, 2001.

1.1.3- Principal agente causal: *Tityus serrulatus*

Os escorpiões de importância médica pertencem ao gênero *Tityus*, sendo o *Tityus serrulatus* (**Figura 1**) considerado o de maior relevância epidemiológica, devido principalmente, ao seu potencial em causar envenenamentos graves (Cupo *et al.*, 1994).

Esta espécie, que possui ampla distribuição regional, principalmente no Sudeste, apresenta alta facilidade de proliferação (reprodução por partenogênese: processo em que os óvulos desenvolvem-se no organismo materno sem a fertilização pelo macho, o qual inexistente na natureza), e elevada adaptação ao meio urbano (Ministério Da Saúde, 2009b).

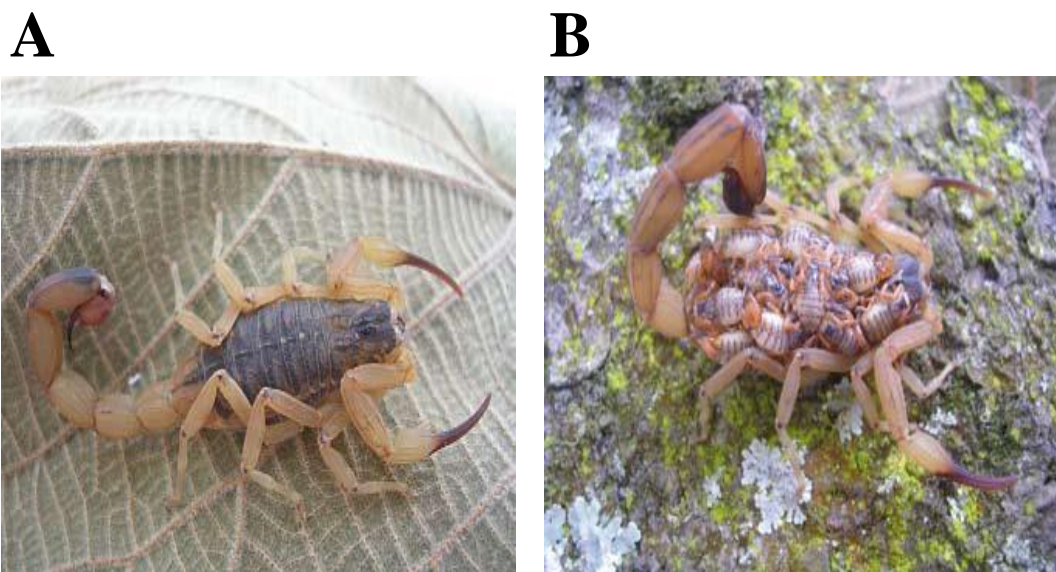


Figura 1: (A) Escorpião *Tityus serrulatus* e (B) *T. serrulatus* com filhotes no dorso. Fonte: Manual de Controle de Escorpiões. Ministério da Saúde; 2009.

1.1.4- Veneno e Toxinas do escorpião *Tityus serrulatus*: composição, purificação e mecanismo de ação

O veneno do escorpião *Tityus serrulatus* é composto por serotonina, histamina, enzimas líticas (hialuronidases), lípidos, nucleotídeos, aminoácidos, além de peptídeos tóxicos e não tóxicos (Diniz e Gonçalves, 1960).

A primeira purificação do veneno bruto foi realizada em 1966, por cromatografia em gel de filtração, gerando duas frações tóxicas (Gomez e Diniz, 1966). Uma delas foi parcialmente caracterizada e, mais tarde, nomeada Tityustoxina (TsTX). Posteriormente, o método proposto foi modificado e as frações passaram a ser purificadas por cromatografia de troca iônica (Sampaio *et al.*, 1983).

As toxinas escorpiônicas atuam em canais iônicos dependentes de voltagem (cálcio, cloreto, potássio e sódio) (Becerril *et al.*, 1997), alterando a excitabilidade celular e a propagação do impulso elétrico. Dentre elas, destacam-se duas principais neurotoxinas, cujos alvos são os canais para sódio dependentes de voltagem (CSDVs), considerados componentes-chave na geração e propagação dos potenciais de ação (Barhanin *et al.*, 1982). Estas neurotoxinas são classificadas como α ou β , de acordo com seu sítio específico de ligação.

A TsTX é uma proteína básica, composta por 63 aminoácidos, cujo peso molecular é estimado em 7200 Da (Sampaio *et al.*, 1983). Classificada como α -toxina por se ligar ao

sítio III dos CSDVs (**Figura 2**), retarda o processo de inativação, prorrogando o tempo de abertura desses canais (Barhanin *et al.*, 1982). Esta condição aumenta a permeabilidade da membrana ao sódio, eleva a excitabilidade celular e acentua a liberação de neurotransmissores, como glutamato, acetilcolina, GABA e dopamina, conforme observado em várias preparações teciduais (Dorce e Sandoval, 1994; Casali *et al.*, 1995; Massensini *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 2004)

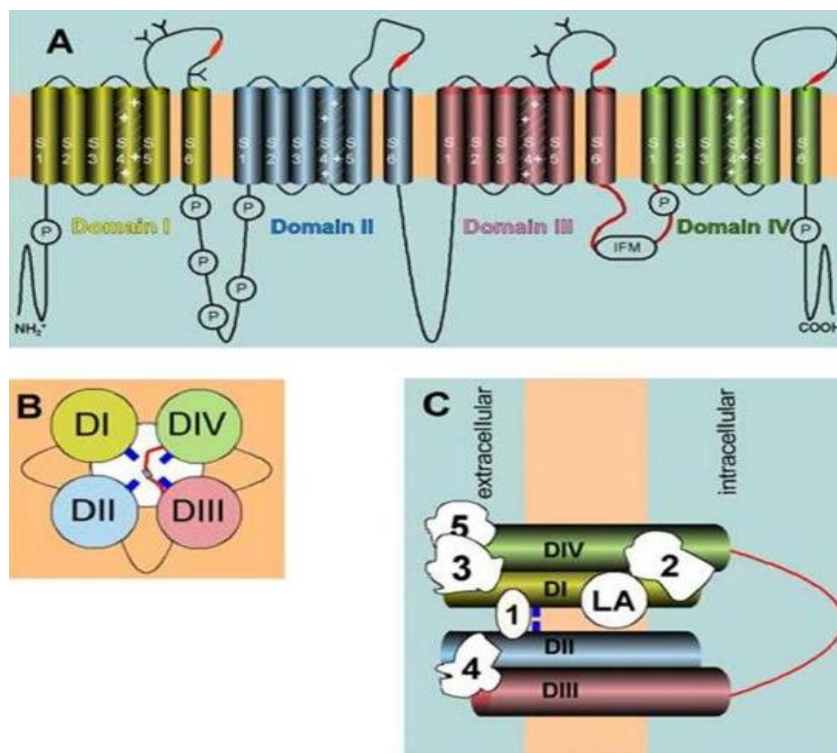


Figura 2: Topologia de um CSDV. (A) Subunidade α do canal, com seus 4 domínios (I a IV), cada um com 6 segmentos transmembrana (S1 a S6). (B) Poro do canal circundado pelos 4 domínios. (C) Sítios de ligação: (3) sítio de ligação da TsTX, (4) sítio de ligação da TsTX-I. Fonte: adaptação de (Denac *et al.*, 2000).

A TiTX- γ (toxina gama) é uma proteína básica, composta por 61 aminoácidos, cujo peso molecular é de aproximadamente 6675 Da (Sampaio *et al.*, 1983). Classificada como β -toxina por se ligar ao sítio IV dos CSDVs, aumenta a probabilidade de abertura desses canais em potenciais transmembrânicos mais negativos. Assim, eleva a ocorrência de potências de ação decorrentes de menores despolarizações da membrana e viabiliza disparos espontâneos (Barhanin *et al.*, 1982; Vijverberg *et al.*, 1984).

O complexo TsTX-CSDV possui uma constante de dissociação (Kd) de aproximadamente 30nM (Barhanin *et al.*, 1982). Esse valor denota uma menor afinidade da TsTX com o CSDV, quando comparado à TiTX- γ , que possui uma constante de

dissociação entre 2,3 e 5,5 pM. Contudo, venenos com concentrações maiores de α - toxina parecem ser mais letais (Kalapothakis e Chavez-Olortegui, 1997); por isso, optamos pela utilização da TsTX neste trabalho.

1.1.5-Ação da TsTX sobre o Sistema Nervoso Central e Cardiovascular

A ação central das toxinas escorpiônicas tem sido negligenciada por alguns autores devido ao entendimento de que os peptídeos tóxicos constituintes do veneno não seriam capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). De fato, pouca radioatividade foi encontrada no encéfalo de ratos adultos submetidos à injeção periférica de toxina marcada (Ismail *et al.*, 1974; Revelo *et al.*, 1996).

Entretanto, outros trabalhos sugeriram a passagem destes peptídeos tóxicos através da BHE. Clot-Faybesse *et al.* realizaram injeção (s.c.) de toxina marcada com tecnécio-99 e a detectaram no SNC de camundongos neonatos (Clot-Faybesse *et al.*, 2000). Nunan *et al.* observaram aumento na permeabilidade da BHE à TsTX (8 vezes maior) em ratos jovens comparados a adultos (Nunan *et al.*, 2003). Mesquita *et al.* constataram sintomas clássicos do envenenamento escorpiônico grave (arritmias cardíacas graves, convulsões, edema pulmonar e óbito) em todos os ratos submetidos à injeção i.c.v. de 1,74 μ g de TsTX. Também observaram que essa mesma dose, quando administrada periféricamente (i.v.), não era capaz de promover tais sintomas (Mesquita *et al.*, 2003). Após injeção i.c.v., estes mesmos pesquisadores encontraram toxina marcada com ALEXA corante fluorescente AF568 ligada a neurônios do NTS, bem como neurônios adjacentes ao sistema ventricular (Mesquita, 2002). Esses dados indicam a sensibilidade do SNC à ação da TsTX.

Além disso, a administração intramuscular (i.m.) de fenobarbital, agonista gabaérgico, foi eficiente em bloquear o edema pulmonar induzido pela microinjeção de TsTX i.c.v. (Mesquita *et al.*, 2002). A administração de lignocaína, bloqueador dos CSDVs, atenuou os sintomas e diminuiu a letalidade após o envenenamento escorpiônico em coelhos (Fatani *et al.*, 2000). Em ratos tratados com carbamazepina, bloqueador de CSDVs, e injetados (i.c.v.) com TsTX, foi observado menor índice de edema pulmonar, além de arritmias cardíacas menos graves, que ocorreram com maior latência (Guidine *et al.*, 2008c) . Em ratos jovens, a injeção s.c. de TsTX gerou descargas epileptiformes de alta amplitude no NTS (importante núcleo bulbar de controle cardiovascular), as quais

correlacionaram-se a alterações eletrocardiográficas, como: bloqueios atrioventriculares de diferentes graus, batimentos ectópicos, bradicardia ou taquicardia sinusal e despolarização atrial e ventricular prematura (Guidine *et al.*, 2009).

Estas informações, agregadas a observações clínicas que ressaltam a vulnerabilidade de crianças aos sintomas graves e óbito, sugerem um importante envolvimento do SNC na gênese das manifestações sistêmicas graves do escorpionismo.

Como já mencionando, a síndrome do envenenamento escorpiônico compromete outros sistemas além do SNC (Sistema Respiratório, Sistema Imune, Sistema Gastrointestinal, Sistema Cardiovascular (SC)).

As manifestações cardiorespiratórias são as principais *causa mortis* do acidente escorpiônico (Bahloul *et al.*, 2002), o que justifica estudos extensivos investigando o envolvimento do SC no escorpionismo. Alterações cardíacas (arritmias e infarto) e hemodinâmicas são frequentes. Pode ocorrer hipertensão de longa duração, principalmente na faixa etária pediátrica, a qual pode estar associada à falência cardíaca e edema pulmonar. Hipotensão arterial tardia, acompanhada de bradicardia intensa também é comum (Gueron e Sofer, 1992). Tais efeitos, possivelmente, são exercidos pela estimulação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), com predomínio do Sistema Nervoso Simpático (SNS) e conseqüente liberação expressiva de catecolaminas (Yarom e Braun, 1970). Estudos experimentais com microinjeção i.c.v. de TsTX mostram correlações temporais entre disparos epileptiformes registrados na PAG (região envolvida em respostas simpatoexcitatórias) e um aumento da atividade simpática cardíaca (Guidine, 2005).

Outras alterações cardiovasculares como: isquemia miocárdica, elevação sérica de enzimas cardíacas e infarto do miocárdio também podem ser evocadas pela TsTX (Teixeira *et al.*, 2001; Cupo e Hering, 2002; Mesquita *et al.*, 2003).

Diante do exposto, a ação da TsTX sobre o SNC e SC é evidente e relevante.

1.2- O Sistema Nervoso Central e a regulação Cardiovascular

A função primordial do Sistema Cardiovascular é manter, constantemente, a pressão arterial em níveis adequados sob diferentes situações, a fim de assegurar uma perfusão orgânica ideal. Parte dos ajustes cardiovasculares são realizados por meio do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), cuja atividade é gerada e modulada em vários

núcleos do SNC. O SNA opera via neurônios parassimpáticos que inervam o coração, e simpáticos que inervam vasos sanguíneos, coração, rins e adrenais (Guyenet, 2006).

A atividade simpática é regulada por diferentes circuitos neurais. Mesmo em repouso, as fibras vasomotoras simpáticas possuem um nível de atividade basal (tônus basal), o qual pode ser modificado por três tipos de estímulos: 1) estímulos neurais aferentes (via barorreflexo, quimiorreflexo e reflexo cardiopulmonar); 2) estímulos cognitivos (integrados no córtex); e 3) estímulos humorais (via órgãos circunventriculares que não possuem BHE) (Tibiriçá, 2001). Este último pode justificar o mecanismo pelo qual a TsTX age sobre o SNC (Mesquita *et al.*, 2003; Guidine *et al.*, 2009).

As diferentes informações vindas da periferia são processadas no SNC com o objetivo de produzir resposta autonômica apropriada de acordo com os ajustes necessários para o funcionamento do sistema circulatório (Machado *et al.*, 1997).

Algumas estruturas importantes para o controle cardiovascular, como o Hipotálamo Dorsomedial (HDM), Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) e Núcleo do Trato Solitário (NTS), se encontram adjacentes aos órgãos circunventriculares; sendo assim, poderiam estar susceptíveis à ação de substâncias presentes na circulação (Guyenet, 2006; Price *et al.*, 2008). Além disso, eles exercem influência direta ou indireta sobre outros núcleos autonômicos, igualmente relevantes, como Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG), o bulbo rostroventrolateral (RVLM), e o bulbo caudoventrolateral (CVLM).

O HDM envia projeções para o NTS e para a PAG, que, por sua vez, comunicam-se com a RVLM, uma região envolvida principalmente na simpatoexcitação- considerada o sítio de neurônios geradores do tônus simpático vasomotor (Fontes *et al.*, 2006; Guyenet, 2006). O NTS também pode fazer conexão indireta com a RVLM via PVN, além de enviar projeções à CVLM (área simpatoinibitória), e ao Núcleo Ambíguo, que, quando ativado, estimula neurônios pré-ganglionares parassimpáticos e promove o aumento do tônus vagal para o coração (Machado *et al.*, 1997). Assim, o NTS pode ser considerado a principal estação sináptica integradora das diferentes aferências cardiovasculares, as quais realizam suas primeiras sinapses neste núcleo (Palcovits e Zaborszky, 1974; Cirriello *et al.*, 1994) e, a partir dele, se conectam a outras regiões de controle autonômico, como as áreas hipotalâmicas e bulbares supracitadas.

Em função da estreita correlação entre SNC e regulação cardiovascular, é relevante investigar a participação deste sistema na gênese das alterações cardíacas e hemodinâmicas decorrentes da ação central da TsTX.

1.3-Desnutrição

1.3.1- Definição e Epidemiologia

A desnutrição, uma síndrome de natureza clínico-social multifatorial, cujas raízes se encontram na pobreza (Ministério Da Saúde, 2005), é caracterizada por condições patológicas decorrentes da deficiência de aporte, transporte ou utilização de nutrientes pelas células do organismo. Ainda hoje, a desnutrição é, mundialmente, uma das causas de morbidade e mortalidade mais comuns entre crianças. No Brasil, embora a prevalência da desnutrição na infância tenha reduzido nas últimas décadas, o percentual de óbitos por desnutrição ainda é preocupante (cerca de 20%) (Ministério Da Saúde, 2005).

1.3.2- Desnutrição Experimental e seus efeitos sobre os sistemas fisiológicos

A utilização de ratos em estudos de carências nutricionais apresenta bons resultados, os quais se assemelham aos encontrados em humanos.

Há várias formas de induzir a desnutrição experimental, como: aumento do número de filhotes por ninhada durante o período de aleitamento (Bell e Slotkin, 1988); diminuição do conteúdo protéico oferecido à fêmea no período da amamentação dos filhotes (Pedrosa e Moraes-Santos, 1987); redução do teor de proteínas oferecido às fêmeas gestantes (Tonkiss *et al.*, 1998); e diminuição do conteúdo protéico da dieta pós-desmame (Agarwal *et al.*, 1981; Benabe *et al.*, 1993; Tropia *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004; Gomide, 2007; Martins, 2007; Penitente *et al.*, 2007; Rodrigues, 2008; Fortes, 2010). Este último modelo corresponde ao adotado neste trabalho.

A desnutrição protéica é prejudicial, haja vista que as proteínas fornecem aminoácidos (a.a.) que regulam as funções fisiológicas (Lehninger *et al.*, 2005). Dos vinte a.a. constituintes das proteínas, nove são essenciais (não são sintetizados pelo organismo e devem ser adquiridos pela dieta); portanto, o suprimento adequado de proteína é essencial para a manutenção da integridade orgânica.

Estudos experimentais têm mostrado que a desnutrição pré e pós-natal podem levar a diversas alterações, como: limitação da expectativa de vida, diminuição do peso corporal, hipoalbuminemia, depleção de massa muscular, modificação na composição lipídica do

sangue, aterosclerose, alterações dos níveis de pressão arterial, prejuízo da função renal com redução do número total de néfrons, diminuição da atividade de renina plasmática e da taxa de filtração glomerular, além do aumento da resistência vascular intra-renal e do número de receptores do tipo AT1 tanto no córtex quanto na medula renal (Benabe e Martinez-Maldonado, 1993; Almeida *et al.*, 1996; Lucas *et al.*, 1997; Lucas, 1998; Do Carmo Pinho *et al.*, 2003; Langley-Evans e Sculley, 2006).

A desnutrição protéica também afeta o SNC. Em modelos de desnutrição pós-desmame, foram observados prejuízos na atividade de diversas enzimas cerebrais relacionadas ao metabolismo do glutamato, além de redução nas concentrações de diversos aminoácidos como o ácido aspártico, glutâmico e alanina no cérebro de ratos (Agarwal *et al.*, 1981). A redução da mielinização (Reddy *et al.*, 1979) e de seus constituintes (colesterol, galactolipídeos e fosfolipídeos) também foram observadas (Egwim *et al.*, 1986). Adicionalmente, a carência protéica a longo prazo induziu à diminuição no número de neurônios e na formação de sinapses no hipocampo (Lukoyanov e Andrade, 2000).

Outros trabalhos demonstraram que a desnutrição também acomete o SNA. Leon-Quinto *et al.* sugeriram um aumento da atividade simpática e diminuição da atividade parassimpática em ratos submetidos à desnutrição protéica pós-desmame após evidenciarem um prejuízo do potencial secretório das células β pancreáticas (Leon-Quinto *et al.*, 1998). Alterações no mecanismo de regulação da liberação central de noradrenalina, com conseqüente aumento deste neurotransmissor no córtex cerebral também foram observadas (Benabe *et al.*, 1993; Belmar *et al.*, 1996). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram alterações nos mecanismos de controle do sistema cardiovascular frente à desnutrição protéica. Observamos aumento do tônus simpático vasomotor, da sensibilidade do barorreflexo e do reflexo Bezold-Jarisch (Tropia *et al.*, 2001), elevação dos valores basais de frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) e da variabilidade desses parâmetros quando analisados no domínio do tempo (Oliveira *et al.*, 2004), modificações no ganho do barorreflexo antes e após bloqueios autonômicos, além de alteração no período de latência da resposta barorreflexa (Loss *et al.*, 2007). Também constatamos um aumento da responsividade do quimiorreflexo (Penitente *et al.*, 2007), aumento da atividade eferente simpática e redução da atividade eferente parassimpática cardíaca após bloqueio autonômico (Martins, 2007). E ainda, dados não publicados evidenciaram resposta pressora aumentada em baixas concentrações de L-

glutamato, sugerindo uma sensibilidade aumentada nos neurônios do bulbo rostral ventrolateral (RVLM) (Rodrigues, 2008).

Portanto, a desnutrição protéica pós-desmame afeta os sistemas como um todo prejudicando, sobretudo, o SNC, o SNA e o SC. Este comprometimento nutricional, além de alterar o funcionamento orgânico, pode favorecer a instalação de quadros insalubres.

1.4- Escorpionismo vs. Desnutrição

Embora o Escorpionismo e a Desnutrição sejam síndromes frequentes e preocupantes em áreas com baixo índice sócio-econômico, principalmente na faixa etária infantil, poucos estudos abordam essa interface.

Alguns estudos sugeriram diferenças no mecanismo de ação central da toxina gama, mostrando que a (TiTX- γ) estimulou menor liberação de glutamato (Barbosa, 2007) e de acetilcolina (Silva, 2008) no SNC de ratos desnutridos. Também foi constatado menor acúmulo de TiTX- γ no encéfalo destes animais, após esta β -toxina atravessar a BHE, quando comparado a animais normonutridos (Silva, 2008). Entretanto, nenhum estudo explorou a ação da TsTX (α - toxina relacionada à maior letalidade) em animais desnutridos.

Portanto, considerando os indícios de que as manifestações cardiovasculares presentes no envenenamento escorpionico grave decorrem da ação direta de neurotoxinas no SNC, aliado ao fato de que a desnutrição promove alterações centrais e cardiovasculares, hipotetizamos que a desnutrição protéica é capaz de modificar a ação central da TsTX e seus efeitos sobre o SC, interferindo na sintomatologia e vulnerabilidade ao óbito. Assim, o modelo de desnutrição torna-se um importante instrumento de estudo para o entendimento fisiopatológico do escorpionismo.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral:

Avaliar o efeito da microinjeção intracerebroventricular (i.c.v.) da toxina escorpiônica (TsTX) sobre o Sistema Cardiovascular de ratos Fischer submetidos à desnutrição protéica.

2.2 – Objetivos Específicos:

- ✓ Avaliar o efeito da microinjeção i.c.v. da TsTX sobre a PAM, FC e sobrevida de ratos normonutridos e desnutridos.
- ✓ Testar o efeito de diferentes doses de Carbamazepina sobre as manifestações cardiovasculares desencadeadas pela microinjeção i.c.v. da TsTX e sobrevida de ratos normonutridos.
- ✓ Avaliar os efeitos da Carbamazepina sobre as respostas cardiovasculares (PAM e FC) e sobrevida de ratos normonutridos e desnutridos submetidos à microinjeção i.c.v. da TsTX.
- ✓ Investigar a participação das subdivisões do Sistema Nervoso Autônomo na gênese das respostas cardiovasculares (PAM e FC) e sobrevida de ratos normonutridos e desnutridos submetidos à microinjeção i.c.v. da TsTX.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Modelo Animal

Neste trabalho, utilizamos 69 ratos Fischer fornecidos pelo Laboratório de Nutrição Experimental, da Escola de Nutrição da UFOP-MG. Os animais foram mantidos em um biotério anexo ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, em regime de temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo de 12 horas claro (a partir de 7hs da manhã) e 12 horas escuro e livre acesso à água e à dieta.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), através do protocolo número 2009/12. Todas as normas estabelecidas por esta comissão foram respeitadas, de forma a minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos. Além disso, o n de cada grupo foi reduzido ao máximo, sem comprometer a confiabilidade das análises estatísticas. Para tanto, sempre que possível, cada rato foi utilizado como controle dele mesmo.

3.2 – Metodologia da Desnutrição

Após o desmame, realizado com 28 dias, os animais foram divididos em dois grupos:

- 1) Normonutrido: alimentado com dieta comercial Labcil/Socil® (dieta controle), contendo 15% de proteína.
- 2) Desnutrido: alimentado com dieta semi-purificada (dieta para desnutrição), contendo 6% de proteína.

Ambos os grupos receberam suas respectivas dietas por 35 dias. Após esse período, os animais foram utilizados para experimentação por no máximo sete dias - período em que continuaram recebendo a dieta previamente determinada. O cronograma da metodologia de desnutrição está representado na **Figura 3**.

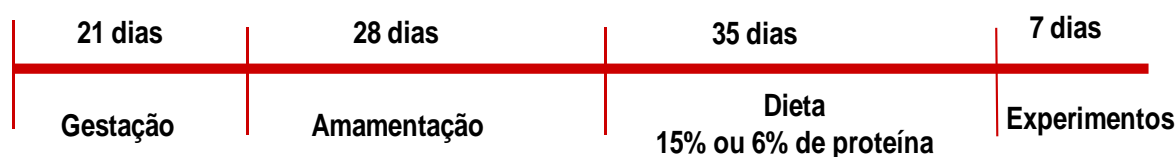


Figura 3: Cronograma da metodologia de desnutrição protéica. Após o nascimento, os animais foram amamentados por um período de 28 dias. Em seguida, foram divididos em dois grupos: normonutrido (dieta com 15% de proteína) e desnutrido (dieta com 6% de proteína) por um período de 35 dias. Após esse período, os animais foram utilizados para experimentação dentro de um período de, no máximo, 7 dias.

3.3 – Composição Química da Dieta para Desnutrição

Uma vez que, utilizamos ratos como modelo animal, e estes são roedores, optamos por “pelletizar” a dieta de desnutrição. Para a formação dos *pellets* desta dieta, utilizamos uma solução do Polímero Polivinilpirrolidona 10% em álcool absoluto, misturada na seguinte proporção: 115ml/ 250g de ração (pó). Os *pellets* secaram por 48 horas, à temperatura ambiente, para completa remoção do álcool. A composição química da dieta de desnutrição está representada na **Tabela 3**.

Tabela 3: Composição química da dieta para desnutrição (g/100g de dieta)

Ingredientes	Quantidade (g/100g de dieta)
Proteína (caseína)	6
Amido de Milho	79
Óleo de Soja	8
Sais Minerais¹	5
Vitaminas²	1
Fibra (Celulose)	1
Teor Calórico	412 Kcal

¹Mistura de minerais (g/Kg de mistura): NaCl – 139,3 / KI – 0,79 / MgSO₄.7H₂O – 57,3 / CaCO₃ – 381,4 / MnSO₄.H₂O – 4,01 / FeSO₄.7H₂O – 27,0 / ZnSO₄.7H₂O - 0,548 / CuSO₄.5H₂O – 0,477 / CoCl₂.6H₂O – 0,023 / KH₂PO₄ – 389,0.

²Mistura de vitaminas (g/Kg de mistura): Acetato de retinol – 0,6 / Colecalciferol – 0,005/ Ácido p-aminobenzóico – 10,00 / I-Inositol – 10,00 / Niacina – 4,00 / Pantotenato de cálcio – 4,00 / Riboflavina – 0,80/ Tiamina HCl – 0,50 / Piridoxina HCl – 0,50 / Ácido fólico – 0,20 / Biotina – 0,04 / Vitamina B12 – 0,003 / Sacarose – q.s.p. 1000. / Colina – 200,0 / α -Tocoferol – 6,7.

3.4 - Preparo de drogas/substâncias utilizadas

PBS (Salina tamponada com fosfato; pH 7,2): solução preparada pela diluição de 8,18g de NaCl P.A., 1,98 g de Na₂HPO₄.7H₂O P.A. e 0,26 g de NaH₂PO₄.H₂O P.A. (Synth, LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP) em água ultra-purificada (Milli – Q®) q.s.p. 1000,0 mL. Ajustou-se o pH da solução para 7,2 com soluções de HCl e NaOH, conforme necessidade. A solução foi esterilizada por autoclavação 120°C e 1,0 Kg/cm² durante 15 minutos, conforme protocolo em vigor no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular.

Anestésico (Solução de Ketamina + Xilazina): solução preparada pela adição de 2 mL de Xilazina 2% (p/v) a 10 mL de Ketamina 10% (p/v). Utilizada da seguinte forma: dose (ketamina: 80mg/kg ; Xilazina: 7mg/kg) e volume (0,1mL/100g de animal; i.m.).

Antiinflamatório [Ketoflex 1% p/v (Cetoprofeno)]: empregado com o objetivo de reduzir inflamação e dor decorrente dos procedimentos cirúrgicos. Utilizado da seguinte forma: dose (4mg/Kg) e volume (0,1 mL/100g de animal; i.m.).

Antibiótico (Pentabiótico Veterinário): utilizado na prevenção de infecções, na seguinte dose: 48.000UI de penicilina, 20mg de estreptomicina e 20mg de diidroestreptomicina/kg. Volume injetado: 0,1 mL/100g de animal; i.m..

Toxina escorpionica (TsTX): obtida a partir do veneno bruto do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*, de acordo com metodologia descrita por (Sampaio *et al.*, 1983). Fornecida pelo Prof. Dr. Tasso Moraes-Santos, do Laboratório de Nutrição Experimental (LNE) da Faculdade de Farmácia da UFMG. A toxina liofilizada foi diluída em PBS e sua concentração foi determinada por espectrofotometria, com absorbância medida em 280nm, em duplicata, para diluições de 1/50 e 1/25. A constante de conversão utilizada (0,48) foi obtida pelo método de dosagem de proteínas descrito por (Lowry *et al.*, 1951). Tal metodologia encontra-se descrita com maiores detalhes no trabalho de (Massensini, 1996). A toxina foi então diluída em PBS até atingir a concentração utilizada neste trabalho (1,74 µg/µl), separada em alíquotas de 10 µl e mantida congelada a -4°C.

Carbamazepina (bloqueador de canais para sódio dependentes de voltagem): obtida em pó (MPBio), e diluída em propilenoglicol e PBS, na proporção de 60/40. Utilizada da seguinte forma: doses (50, 75 e 100mg/Kg) e volume (0,1 mL/100g de animal; i.p.).

Prazosin (antagonista de receptores α_1 - adrenérgicos): a solução foi preparada dissolvendo-se 10 mg de cloridrato de prazosina em 10 mL de PBS. A solução foi protegida da luz para evitar degradação, dividida em alíquotas de 1 mL e armazenada em tubos de polietileno Eppendorf, a -20°C até o momento do uso. A dose utilizada foi de 1mg/kg, volume de 0,1mL/100g de peso do animal; i.v..

Metil-atropina (antagonista de receptores muscarínicos): a solução estoque foi preparada dissolvendo-se 10 mg de Brometo de metil-atropina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em 10 mL de salina (dose 1mg/Kg). A solução foi protegida da luz para evitar degradação, dividida em alíquotas de 1 mL armazenada em tubos de polietileno Eppendorf, a -20°C até o momento do uso. Foi injetada na dose de 1mg/kg, volume de 0,1mL/100g de peso do animal; i.v..

3.5- Confeção de Cânulas-guia, agulha de implantação e agulha injetora

A cânula-guia (CG) i.c.v. foi confeccionada utilizando-se agulha 25x6, ajustada até o comprimento de 10 mm, através de eletrocorrosão.

Para a confecção da agulha de implantação, utilizamos duas agulhas: a G30, que se encaixa na cânula-guia, e a 25x6, usada para fixar a agulha de implantação na torre do estereotáxico. Depois de cortadas, a agulha G30 foi parcialmente introduzida e presa na 25x6 de forma que extremidade medisse 10 mm (mesmo comprimento da CG).

A agulha injetora foi confeccionada a partir da agulha G30 e ajustada a 11 mm através de eletrocorrosão. Assim, no momento da microinjeção, a extremidade da injetora permanecia 1mm abaixo da extremidade da CG, correspondendo ao sistema ventricular, de acordo com as coordenadas utilizadas (ver item 3.8.1).

3.6– Confeção de Cânulas arteriais e venosas

Para a confecção das cânulas femorais, utilizamos tubos de polietileno PE-50 previamente conectados a tubos de PE-10 (Clai Adams, Parsipanny,NJ, EUA). As dimensões dos tubos foram ajustadas de acordo com o peso do animal (**Tabela 4**).

Tabela 4: Confeção de cânulas femorais

	Normonutrido		Desnutrido	
	PE50	PE10	PE50	PE10
Artéria	16 cm	4 cm	12 cm	2 cm
Veia	16 cm	2 cm	12 cm	1,5 cm

3.7– Confeção de eletrodos para registro eletrocardiográfico

Para a confecção dos eletrodos, utilizamos conectores RJ45 (**Figura 4**) de quatro pinos, conectados a fios de cobre rígido.

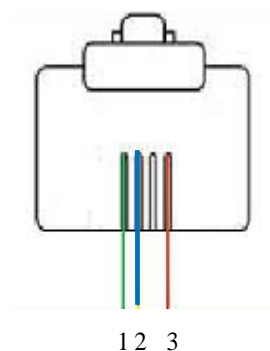


Figura 4: Imagem representativa de um conector RJ45 conectado aos fios de cobre. Fio 1 – (V2), fio 2 - (terra), fio 3 - (V1). O posicionamento dos fios está descrito detalhadamente no item 3.8.2.

3.8- Cirurgias

3.8.1- Implante de cânula-guia dirigida ao Ventrículo Lateral Esquerdo (VLE)

Com o auxílio de um estereotáxico (Stoelting Co., Illinois, EUA), implantamos a CG de 10 mm em direção ao VLE. Anestesiámos os animais com solução anestésica de Ketamina e Xilazina (i.m.) e em seguida, administramos cetoprofeno (i.m.). Posteriormente, tricotomizamos a região entre os pavilhões auditivos e os olhos, e acomodamos e fixamos o animal ao aparelho estereotáxico. A região tricotomizada foi submetida à assepsia com PVPI degermante e, posteriormente, anestesiada com lidocaína com vasoconstritor (Lidostesim 2%, 0,1 mL). A região superior do crânio foi exposta e lavada com PBS. A torre do estereotáxico foi angulada em zero e a cabeça do animal ajustada até que o Bregma e Lâmbda ficassem horizontalizados. Em seguida, realizamos as leituras dos parâmetros ântero-posterior (AP), látero-lateral (LL) e dorso-ventral (DV), tomando-se como referência o Bregma. Determinamos os parâmetros utilizados para atingir o VLE a partir do atlas estereotáxico (Paxinos e Watson, 1986): AP = -0,3 mm; DV= - 2,4 mm; LL= + 1,2 mm. Utilizados esses mesmos parâmetros nos Grupos Normonutrido e Desnutrido, uma vez os cérebros destes animais não diferem de tamanho (ver item 4.1). Em sequência, introduzimos a cânula-guia e fechamos a abertura cirúrgica com resina odontológica (acrílico auto-polimerizante). Um parafuso óptico de aço inoxidável, previamente fixado, facilitou a adesão do acrílico ao crânio do animal. Para evitar a obstrução da cânula-guia, introduzimos um mandril de aço inoxidável de mesmo comprimento. Feito isso, os animais foram submetidos a cuidados pós-operatórios (ver item 3.8.3) e passaram por um período de recuperação entre 4 e 7 dias.

3.8.2- Implante de cânulas femorais e eletrodos

Passado o período de recuperação, os animais foram novamente submetidos aos procedimentos pré-cirúrgicos (sedação e anestesia) para a realização do implante das cânulas femorais e dos eletrodos. Para melhor compreensão, esse procedimento será descrito em duas etapas.

Primeira etapa: tricotomia da região inguinal, do dorso e do tórax, seguida de assepsia destes locais com PVPI degermante. Através de uma pequena incisão na região inguinal, o trígono femoral foi exposto (**Figura 5**), os vasos femorais identificados e separados do nervo femoral. A cânula arterial foi inserida na artéria femoral até a aorta abdominal e, a cânula venosa, inserida na veia femoral até a veia cava inferior. Em seguida, as cânulas foram exteriorizadas no dorso do animal com o auxílio de um pequeno tubo de metal (trocáter) – essa disposição permitiu o registro e a administração de drogas com livre movimentação do animal. Terminado o procedimento, os locais de incisão foram suturados.

Segunda etapa: concluído o processo de cateterização, foi realizado o implante de eletrodo para o registro do ECG na região do tórax previamente tricotomizada. Foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente 3 cm na região do esterno. Através da incisão pelo dorso do animal, os fios identificados como 1 e 3 foram cuidadosamente transpassados subcutaneamente próximo à axila esquerda e foram suturados junto à musculatura peitoral. Os fios 1 e 3 foram suturados junto ao terço lateral dos músculos peitorais esquerdo e direito, respectivamente. Os dois fios formaram uma linha na horizontal, constituindo uma derivação do triângulo de Einthoven. O fio 2 remanescente, não transpassado para a região peitoral, foi fixado junto à musculatura da região dorsal e utilizado como fio terra (**Figura 6**).

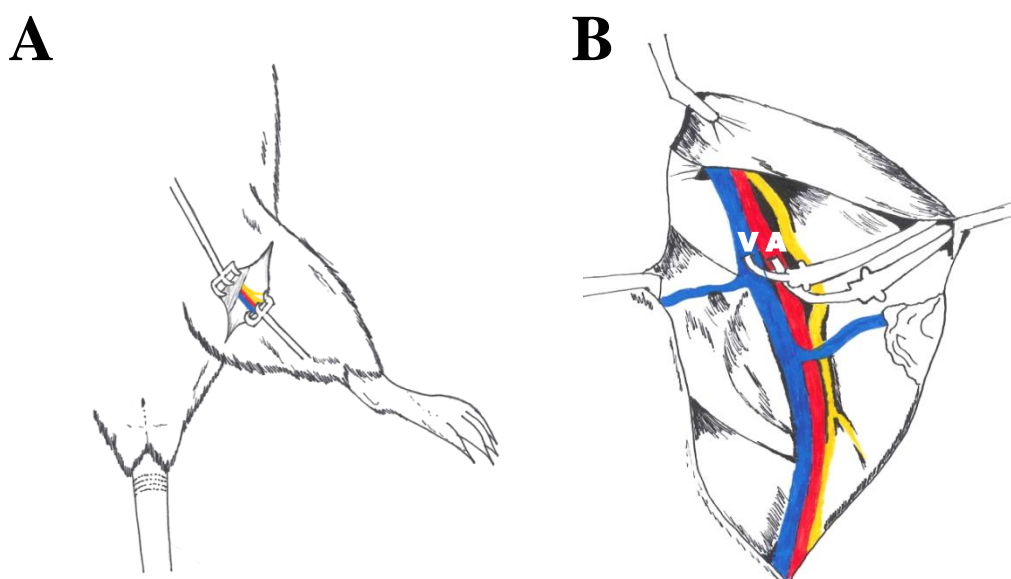


Figura 5: As letras **A** e **B** ilustram, de forma esquemática, respectivamente: **(A)** Local de dissecção do trígono femoral e **(B)** Isolamento da artéria (A) e veia femoral (V) e inserção dos cateteres. Fonte: (Fortes, 2010).

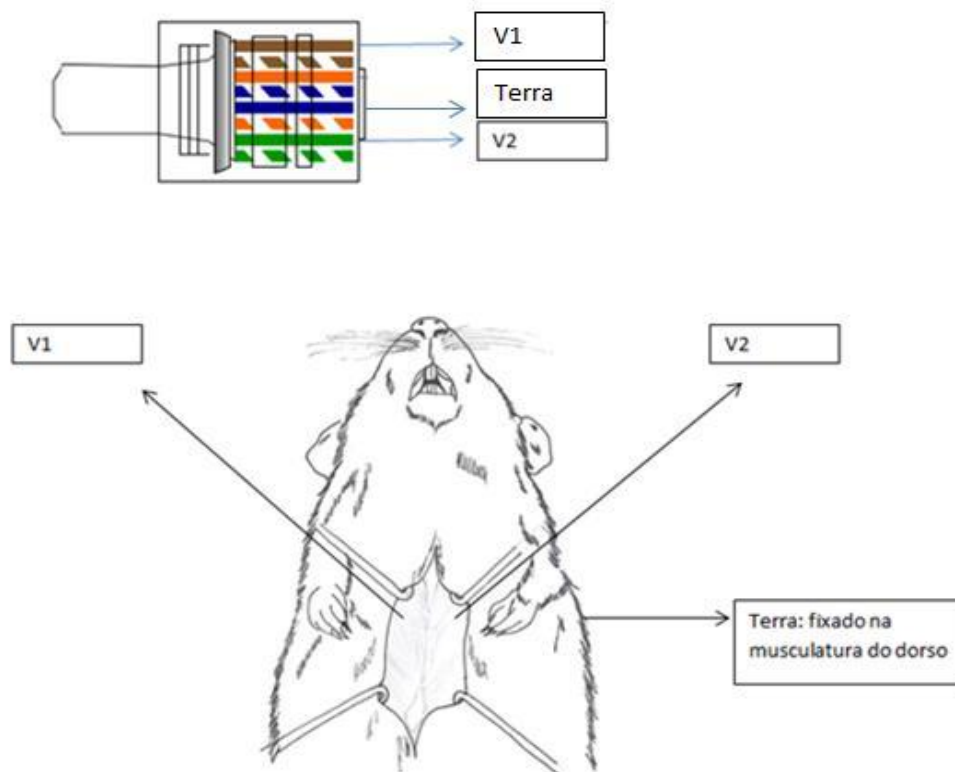


Figura 6: Desenho esquemático do implante de eletrodos para a aquisição do sinal eletrocardiográfico. Fonte: (Fortes, 2010).

3.8.3- Cuidados pós-operatórios

Após as cirurgias, os animais receberam o Pentabiótico Veterinário (Fort Dodge, São Paulo, Brasil - 0,1 mL/rato; i.m.) para cobertura antibiótica profilática. Os ratos foram alocados em gaiolas individuais e mantidos sobre manta térmica até a passagem completa do efeito do anestésico, a fim de evitar hipotermia. Posteriormente, os animais foram mantidos na sala de experimentos sob condições de temperatura, luminosidade e níveis de ruído controlados, com dieta de acordo com o protocolo previamente estabelecido e água purificada *ad libitum*. Após o último procedimento cirúrgico, eles se recuperaram por 24hs antes do experimento de aquisição de PAP, ECG e FC.

3.9- Registros de Pressão arterial e Eletrocardiograma

Para a realização dos registros, os animais foram colocados em uma gaiola de acrílico revestida com tela metálica fina (gaiola de Faraday). Os registros foram sempre realizados na mesma faixa de horário, entre 8 e 17hs. Na gaiola de Faraday, a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (STATHAM P23DB®), o qual foi conectado à placa de aquisição Akilah 4. O eletrodo de ECG também foi conectado ao mesmo sistema de aquisição, e integrado a um computador através de um cabo USB. O registro foi captado através do software Kananda®, em uma frequência de amostragem de 1000 Hz e filtros com banda de passagem entre 0,23 e 200 Hz. A partir do registro da PAP foi calculada a PAM e, a partir do registro de ECG, foi calculada a FC. Um exemplo ilustrativo da janela de aquisição do software Kananda ® está representado na **Figura 7**.

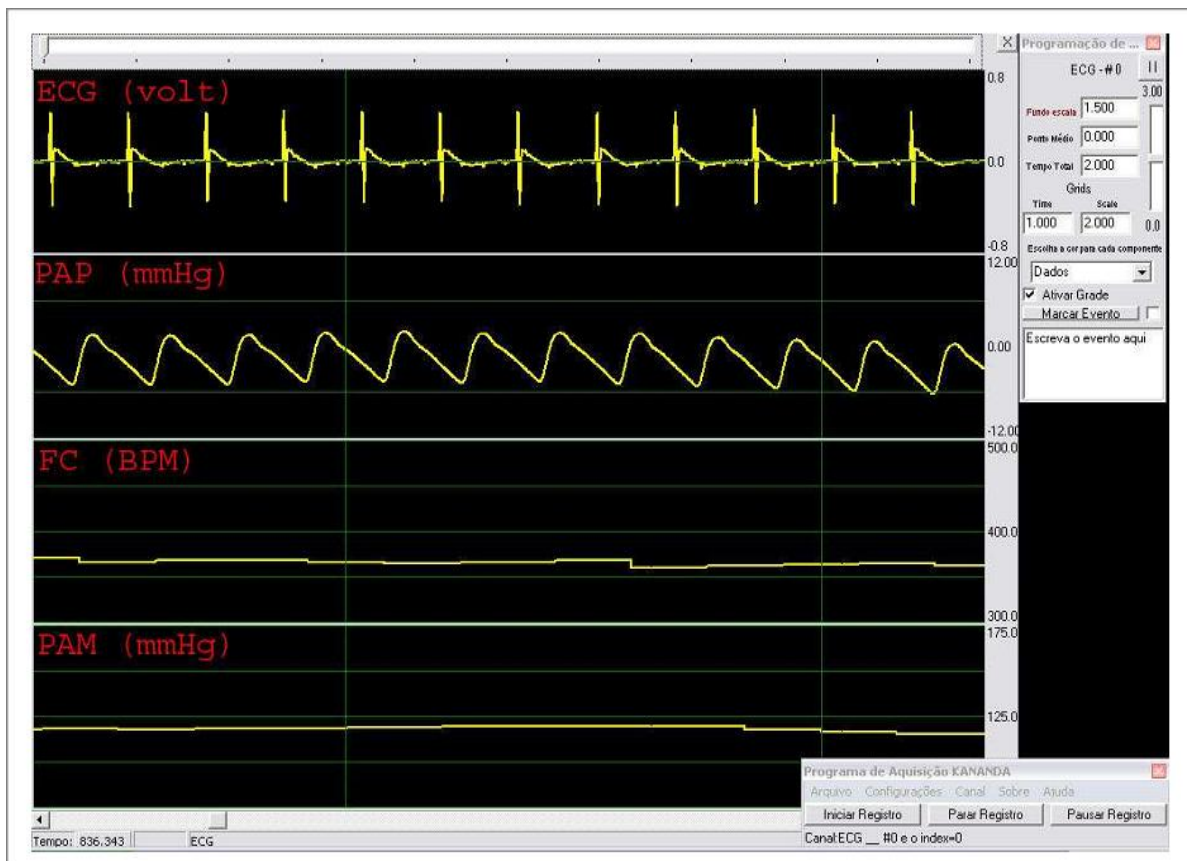


Figura 7: Representação da janela de visualização do software Kananda® durante o registro eletrocardiográfico e de pressão arterial. Canais de registro: 1- ECG, 2-PAP, 3-FC e 4-PAM. Fonte:(Martins, 2007).

3.10- Protocolos experimentais

3.10.1 – Efeitos da injeção i.c.v. de TsTX sobre o Sistema Cardiovascular (SC) e sobrevida em diferentes estados nutricionais

Alguns trabalhos sugerem uma ação central da TsTX sobre núcleos de controle cardiovascular (Mesquita *et al.*, 2002; Guidine *et al.*, 2009). Outros estudos sugerem diferenças no mecanismo de ação central da toxina gama em ratos desnutridos, evidenciados por menor liberação de neurotransmissores (Barbosa, 2007; Silva, 2008). Entretanto, não há estudos na literatura a respeito da atuação da Tityustoxina sobre o SC de animais desnutridos. Sendo assim, decidimos investigar possíveis diferenças na ação central da TsTX e seus efeitos sobre o SC e sobrevida de animais normonutridos e desnutridos.

Para a realização deste protocolo, utilizamos 20 ratos Fischer divididos em 2 grupos experimentais: Normonutrido e Desnutrido Veículo (NV=12; DV=8). Os ratos foram levados para a sala de registro aproximadamente 1 hora antes do experimento, possibilitando sua melhor adaptação ao ambiente. Inicialmente, realizamos a injeção (i.p.) de veículo (Propilenoglicol + PBS; 60:40; 0,1 mL/100g de animal) e, após uma pausa de 50 min, iniciamos o registro. Os primeiros 20 minutos registrados foram chamados de período veículo (VEC). Em seguida, realizamos a microinjeção de PBS no VLE (1 μ L), sendo os 20 minutos seguintes nomeados de período PBS. Logo após, microinjetamos TsTX no VLE (1,74 μ g/ μ L; período TsTX) e realizamos o registro até o óbito do animal. A escala temporal desse protocolo está representada na **Figura 8**.



Figura 8: Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação da injeção i.c.v. da TsTX sobre o Sistema Cardiovascular. As setas representam, da esquerda para a direita, o início do registro ou a administração de substâncias (Veículo, PBS e TsTX). A via de inoculação e a dose utilizada estão indicadas entre parênteses. O registro do protocolo experimental foi dividido em 4 períodos, da esquerda para direita: Intervalo anterior aos períodos, VEC, PBS e TsTX, cujas janelas temporais estão representadas em minutos.

Microinjeção de TsTX no VLE

É importante destacar que a escolha do VLE como sítio de microinjeção foi baseada na facilidade da TsTX fluir pelo sistema ventricular e atingir amplamente o SNC, recrutando regiões (adjacentes aos 3° e 4° Ventrículos) que pudessem interferir no controle cardiovascular. A escolha da dose de 1,74 µg de TsTX, comum a todos os protocolos, foi baseada na literatura, uma vez que esta foi a menor dose capaz de promover, em 100% dos animais, alterações centrais e sistêmicas semelhantes às observadas no envenenamento escorpiônico grave (Mesquita *et al.*, 2003).

Para a microinjeção, utilizamos uma seringa do tipo Hamilton de 5,0 µl conectada à agulha injetora através de um tubo de polietileno (PE10), preenchido com água destilada. Assim, a microinjeção (1 µL) foi realizada por 30 segundos, com livre movimentação dos animais, sem a necessidade de interrupção do registro.

3.10.2- Efeitos das diferentes doses de Carbamazepina sobre as manifestações cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX

Sabendo que a TsTX se liga a CSDVs, preferencialmente no estado ativado, alterando o processo de inativação destes canais (Barhanin *et al.*, 1982), a utilização de uma droga cujo mecanismo de ação seja o bloqueio de CSDVs, possivelmente, inibiria a ação desta neurotoxina.

A Carbamazepina (CBZ) age sobre os CSDVs preferencialmente no estado inativado, reduzindo os potenciais de ação de alta frequência. Adicionalmente, foi descrito que a máxima concentração cerebral e plasmática de Carbamazepina ocorre em 90 minutos, quando injetada por via i.p. (Graumlich *et al.*, 1999). De fato, o pré-tratamento (90 min) com Carbamazepina (50 mg/kg) foi capaz de reduzir aproximadamente 83% da letalidade observada em ratos Wistar microinjetados com TsTX (1,74µg/µL) no VL (Guidine *et al.*, 2008c). Neste contexto, a CBZ configura um importante instrumento farmacológico para analisar a participação do SNC na gênese dos efeitos cardiovasculares desencadeados pela TsTX.

Entretanto, como nesse trabalho utilizamos ratos Fischer, investigamos os efeitos das diferentes doses de CBZ para confirmar a reprodutibilidade dos dados supracitados em

ratos de outra linhagem. É importante mencionar que não realizamos esta metodologia para o grupo Desnutrido diante da dificuldade de obtenção de um número suficiente de ratos (fragilidade desses animais) para garantir a confiabilidade das análises. Além disso, a limitação de tempo disponível para se avaliar a farmacocinética e a farmacodinâmica da CBZ neste grupo foi outro fator determinante, visto que a realização dos protocolos seguintes também era relevante.

Assim, para a efetivação deste protocolo, utilizamos 30 ratos Fischer, divididos em 4 grupos experimentais: Normonutrido Veículo (NV=12) e Normonutrido CBZ 50, 75 e 100mg/Kg (NCBZ50=8; NCBZ75=5 e NCBZ100=5).

Os procedimentos experimentais realizados nesse protocolo foram descritos no protocolo anterior (item 3.10.1). Porém, acrescentamos o tratamento com as diferentes doses de CBZ e registramos o período TsTX por no máximo 60 minutos - janela temporal suficientemente maior que o tempo médio de óbito, permitindo uma análise confiável do aumento de sobrevivência proporcionado pela CBZ. A escala temporal desse protocolo está representada na **Figura 9**.

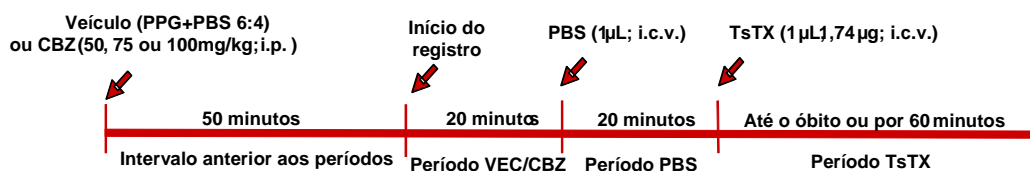


Figura 9: Escala temporal do protocolo experimental para avaliação do efeito das diferentes doses da Carbamazepina sobre as manifestações cardiovasculares desencadeadas pela ação central da TsTX. As setas representam, da esquerda para a direita, o início do registro pós-tratamento ou a administração de substâncias (Veículo ou CBZ, PBS e TsTX). A via de inoculação e a dose utilizada estão indicadas entre parênteses. O registro do protocolo experimental foi dividido em 4 períodos, da esquerda para direita: Intervalo anterior aos períodos, VEC/CBZ, PBS e TsTX, cujas janelas temporais estão representadas em minutos.

3.10.3 – Efeitos da Carbamazepina sobre as respostas cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em diferentes estados nutricionais

Os resultados obtidos no protocolo anterior (ver item 4.3) mostraram que a dose de 50 mg/kg de CBZ foi capaz de reduzir significativamente o aumento de PAM desencadeado pela microinjeção de TsTX, além de aumentar a sobrevida dos animais. Por este motivo, optamos por utilizá-la neste protocolo. Deste modo, acreditamos excluir um possível efeito tóxico da droga no grupo Desnutrido.

Neste protocolo, utilizamos 33 ratos Fischer, divididos em 4 grupos experimentais: Normonutrido e Desnutrido Veículo (NV=12; DV= 8) e Normonutrido e Desnutrido Carbamazepina 50 mg/kg (NCBZ=8; DCBZ=5). Os períodos de registro fora os mesmos do protocolo anterior. A escala temporal desse protocolo está representada na **Figura 10**.

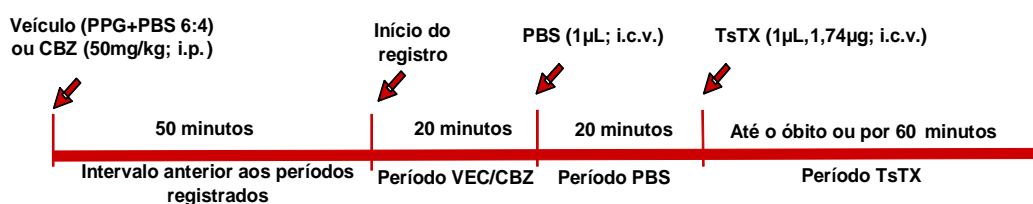


Figura 10: Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação dos efeitos da Carbamazepina (50mg/kg) sobre as respostas cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em diferentes estados nutricionais. As setas representam, da esquerda para a direita, o início do registro pós-tratamento ou a administração de substâncias (Veículo ou CBZ, PBS e TsTX). A via de inoculação e a dose utilizada estão indicadas entre parênteses. O registro do protocolo experimental foi dividido em 4 períodos, da esquerda para direita: Intervalo anterior aos períodos registrados, VEC/CBZ, PBS e TsTX, cujas janelas temporais estão representadas em minutos.

3.10.4 – Efeitos do bloqueio autonômico sobre as respostas cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em diferentes estados nutricionais

- Bloqueio dos receptores α -1 adrenérgicos com Cloridrato de Prazosina
- Bloqueio dos receptores muscarínicos com Brometo de Metil-atropina

Realizamos este protocolo com o objetivo de investigar a participação do SNA nas alterações cardiovasculares e porcentagem de sobrevida desencadeadas pela ação central da TsTX. Optamos por utilizar Brometo de Metil-atropina como forma de bloquear apenas

os receptores muscarínicos periféricos, uma vez que o grupo Metil impede a passagem desta substância pela BHE.

Utilizamos, 27 ratos Fischer divididos em 4 grupos experimentais: Normonutrido e Desnutrido Prazosin (NP=7; DP=7), e Normonutrido e Desnutrido Metil-atropina (NM=6; DM=6). Inicialmente, registramos os animais por 10 minutos para a avaliação dos parâmetros cardiovasculares basais (PAM, FC e ECG; Período basal). Em seguida, realizamos a injeção de veículo (PBS; 0,1 mL/100g de animal, i.v.) sendo os 20 minutos seguintes nomeados de período PBS. Realizamos a injeção de PZS ou Metilatropina (1mg/kg, i.v.), sendo os 20 minutos seguintes nomeados de período PZS ou Metil. Finalmente, microinjetamos TsTX no VLE (1,74 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; período TsTX) e registramos o animal até o óbito ou por uma janela experimental máxima de 60 min. A escala temporal desse protocolo está representada na **Figura 11**.

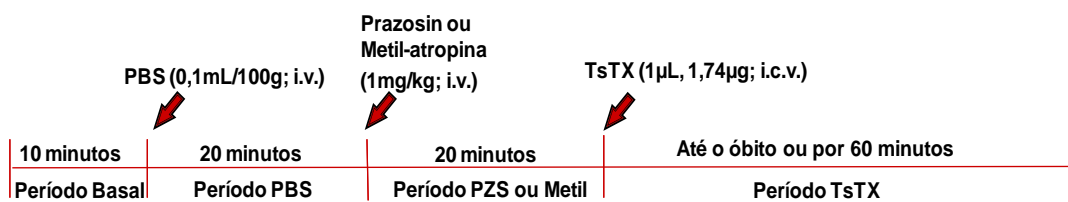


Figura 11: Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação dos efeitos do bloqueio autonômico sobre as respostas cardiovasculares e sobrevida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em diferentes estados nutricionais. As setas representam, da esquerda para a direita, a administração de substâncias (PBS, Prazosin ou Metil-atropina e TsTX). A via de inoculação e a dose utilizada estão indicadas entre parênteses. O registro do protocolo experimental foi dividido em 4 períodos, da esquerda para direita: Basal, PBS, Prazosin ou Metil-atropina e TsTX, cujas janelas temporais estão representadas em minutos.

3.11- Histologia

Ao término do protocolo experimental, injetamos o corante Azul de Evans (1 μL , 2%) no VLE, para confirmar a posição da agulha de injeção. Anestesiemos os animais com solução de Ketamina + Xilazina (descrito no item 3.4), submetendo-os a uma toracotomia para a exposição do coração. Através de punção cardíaca, realizamos a perfusão com solução salina (0,9%), seguida de solução de formalina (10%). Posteriormente, retiramos e fixamos o cérebro em solução de formaldeído tamponado 10% por 48 horas. Seccionamos o cérebro transversalmente em fatias de 50 μm de espessura com o auxílio de um Criostato (Leica CM 1850, Alemanha). Os cortes histológicos foram corados em Vermelho Neutro

para posterior visualização em microscópio óptico. Apenas animais com injeção ventricular confirmada pela microscopia óptica foram incluídos nos resultados.

3.12- Análise dos dados

Realizamos a conversão dos arquivos de registro do formato “.Knd” (originalmente gerado pelo Kananda ®) para “.txt” (arquivos de texto) usando o próprio software Kananda®. Após a conversão, os dados foram carregados no software *Acqknowledge versão 3.5*, para a realização das análises.

3.12.1- Análise da Frequência Cardíaca (FC) e da Pressão Arterial Média (PAM)

Para a realização das análises de FC e PAM, calculamos as médias dos valores obtidos durante 1 minuto de cada período registrado (**Tabela 5**). Em alguns protocolos, o período TsTX foi dividido em três tempos (início, meio e fim), conforme o interesse em investigar alterações das respostas ao longo do tempo. Adicionalmente, em relação ao período TsTX1, não selecionamos o 1º minuto posterior a microinjeção de TsTX, já que até o 2º min observávamos convulsões frequentes que interferiam no sinal eletrocardiográfico e pressórico.

Tabela 5: Análise da FC e da PAM

Protocolos	Períodos	Mínuto selecionado
3.10.1; 3.10.2 e 3.10.3	VEC ou VEC/CBZ	Precedente à microinjeção de PBS
	PBS (i.c.v.)	3º minuto após a microinjeção de PBS
	TsTX1	3º minuto após a microinjeção de TsTX
	TsTX2	Correspondente à metade do período TsTX (tempo total do período TsTX/2)
	TsTX3	Último minuto do registro
3.10.4	Basal	Precedente à administração de qualquer droga
	PBS (i.v.)	Precedente à administração de um dos bloqueadores
	PZS ou Metil	Precedente à microinjeção de TsTX
	TsTX1, TsTX2 e TsTX 3	Igual aos protocolos anteriores

3.12.2- Análise da porcentagem de sobrevivência após a microinjeção (i.c.v.) de TsTX no VLE

Definimos o tempo de sobrevivência dos animais como o período entre a administração de TsTX e o óbito, ou até o final do registro (máximo de 60 min). O óbito foi determinado por um período de apnéia superior a 30 segundos.

3.12.3- Análise estatística

Utilizamos o programa GraphPad Prism 5.00 (Graphpad Inc.) para as análises estatísticas. Utilizamos o teste t de Student - não pareado para análise das variáveis independentes, análise de variância ANOVA One way e Two way para análise de mais de dois grupos sob influência de um ou dois fatores, respectivamente; e estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste Log-rank para a comparação entre curvas de percentual de sobrevivência. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram expressos em Média \pm Erro Padrão das Médias (Média \pm EPM), ou Mediana: 1º Quartil/ 3º Quartil (Med: Q1/Q3).

4 – RESULTADOS

4.1- Efeitos da desnutrição protéica pós-desmame sobre o peso corporal, peso cerebral e níveis basais de PAM e FC.

A desnutrição protéica pós-desmame, induzida pelos 35 dias de dieta, reduziu significativamente o peso corporal dos animais desnutridos, quando comparados aos normonutridos ($D= 79 \pm 3g$ vs. $N=254 \pm 3g$; $p<0,0001$). Entretanto, embora tenha apresentado uma tendência, não houve alteração significativa do peso cerebral ($D= 1,16 \pm 0,02g$ vs. $N= 1,24 \pm 0,03 g$; $p=0,0525$), conforme demonstrado na **Figura 12** e nas **Tabelas 6 e 7**.

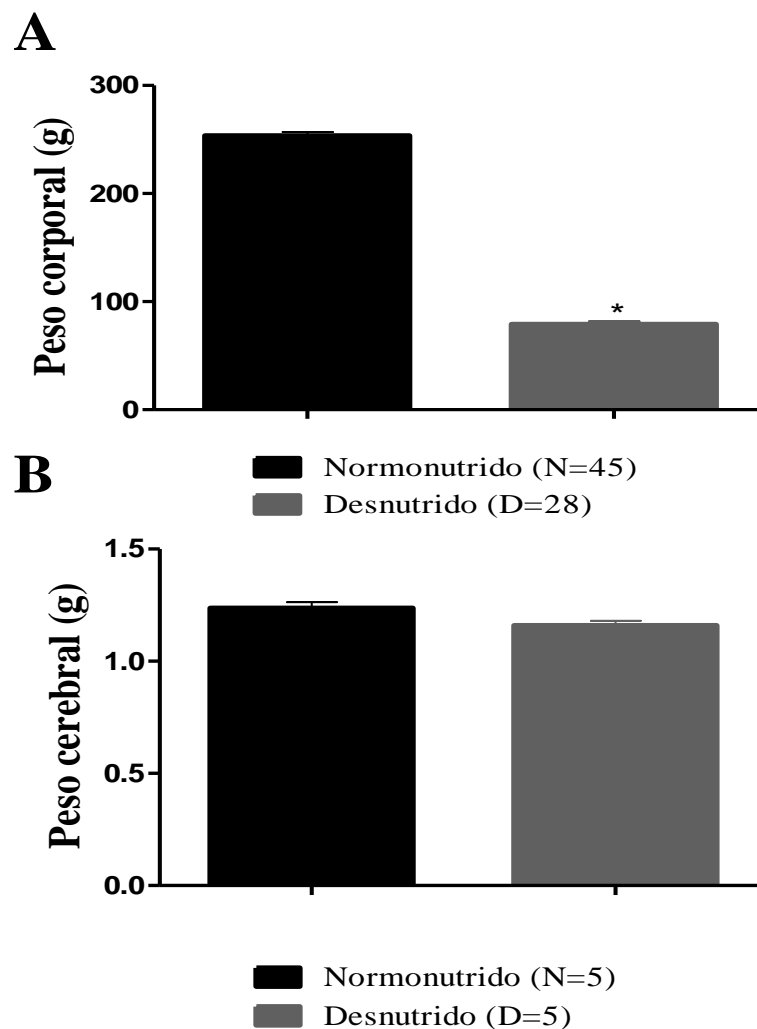


Figura12: (A) Efeito da desnutrição protéica pós-desmame sobre o peso corporal (g) e (B) efeito da desnutrição protéica sobre o peso cerebral (g) dos grupos Normonutrido e Desnutrido. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística ($p<0,05$, Test t - não pareado).

Observamos um aumento significativo dos níveis basais de PAM e FC (**Figura 13: A e B**, respectivamente e **Tabela 8**) no grupo Desnutrido em relação ao grupo Normonutrido (**PAM: D=120±3 mmHg vs. N=111±2 mmHg; p=0,0152**) e (**FC: D=448±13 bpm vs. N= 384±9 bpm; p=0,0005**).

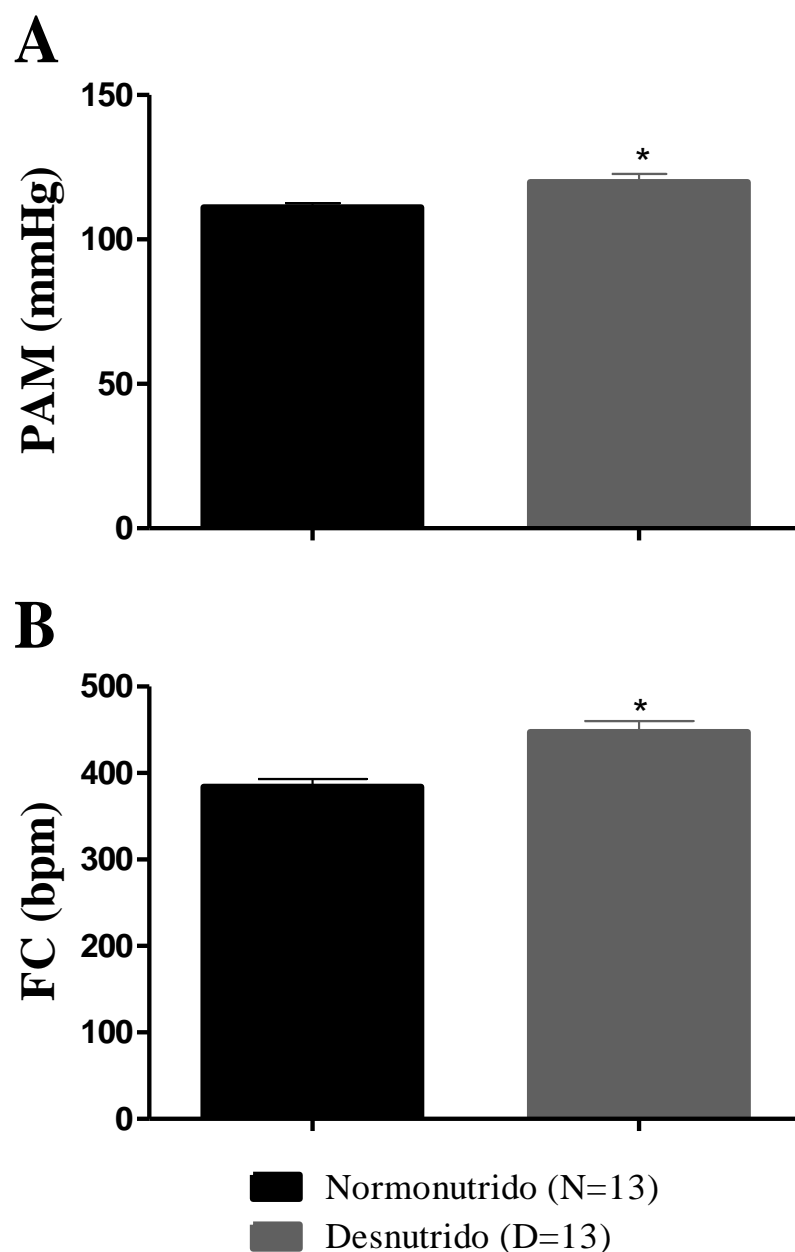


Figura 13: (A) Níveis basais de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) dos grupos Normonutrido e Desnutrido. As barras representam média ± EPM; * Diferença estatística ($p < 0,05$, Test t - não pareado).

4.2- Efeitos da injeção i.c.v. de TsTX sobre o Sistema Cardiovascular e sobrevida em diferentes estados nutricionais

Inicialmente, a microinjeção de TsTX suscitou um aumento significativo de PAM nos grupos Normonutrido e Desnutrido Veículo (**NV= VEC:** 115 ± 4 mmHg, **TsTX1:** 169 ± 4 mmHg, **TsTX2:** 176 ± 4 mmHg; $p < 0,0001$) e (**DV= VEC:** 115 ± 4 mmHg, **TsTX2:** 141 ± 8 mmHg; $p < 0,0001$), embora tal aumento tenha tido uma menor amplitude e ocorrido com maior latência no grupo Desnutrido Veículo, sendo constatado apenas em TsTX2 (interação entre período e dieta em TsTX1 e TsTX2: $F(4,76)=5,135$; $p < 0,001$). Adicionalmente, a TsTX promoveu queda acentuada de PAM no final do registro, em ambos os grupos (**NV= TsTX3:** 63 ± 7 mmHg e **DV= TsTX3:** 54 ± 12 mmHg; $p < 0,0001$). Estes dados podem ser visualizados na **Figura 14A** e **Tabela 9**.

Verificamos um aumento significativo da FC nos dois primeiros intervalos analisados (TsTX1 e TsTX2) apenas no grupo Normonutrido Veículo, (**NV= VEC:** 385 ± 13 bpm, **TsTX1:** 437 ± 15 bpm, **TsTX2:** 444 ± 12 bpm; $p = 0,0013$). Esses resultados podem ser visualizados na **Figura 14B** e **Tabela 10**.

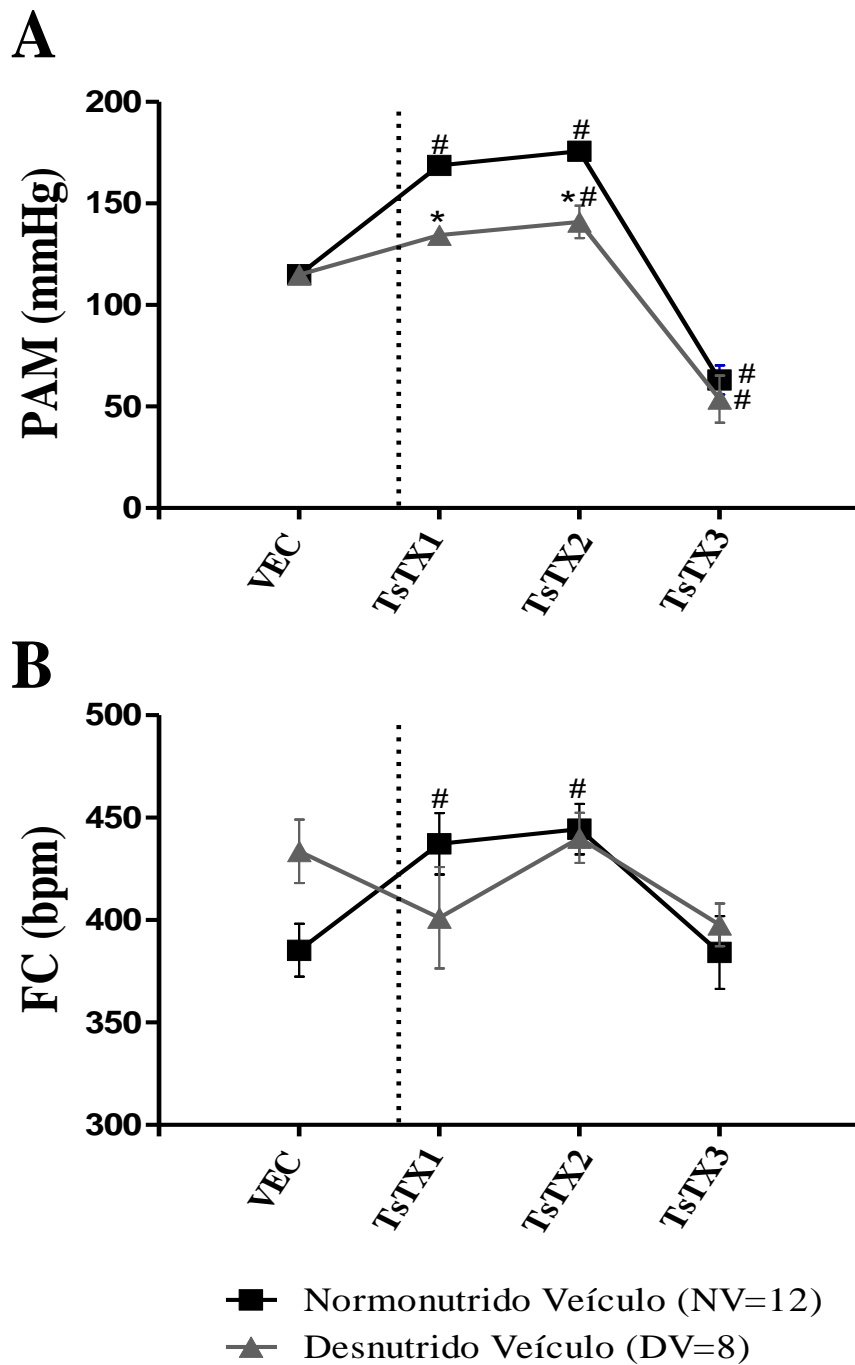


Figura 14: (A) Níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos e desnutridos pré-tratados com veículo (NV e DV). Os símbolos representam média \pm EPM.; * Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e #; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$, Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).

A ação da TsTX conduziu ambos os grupos ao óbito. Contudo, observamos um aumento significativo na porcentagem de sobrevivência do grupo Desnutrido, quando comparado ao Normonutrido Veículo (Med: Q1/Q3; NV= 9:9/13,5 min vs. DV= 15,5:10,5/18 min; $p=0,0009$; **Figura 15** e **Tabela 11**).

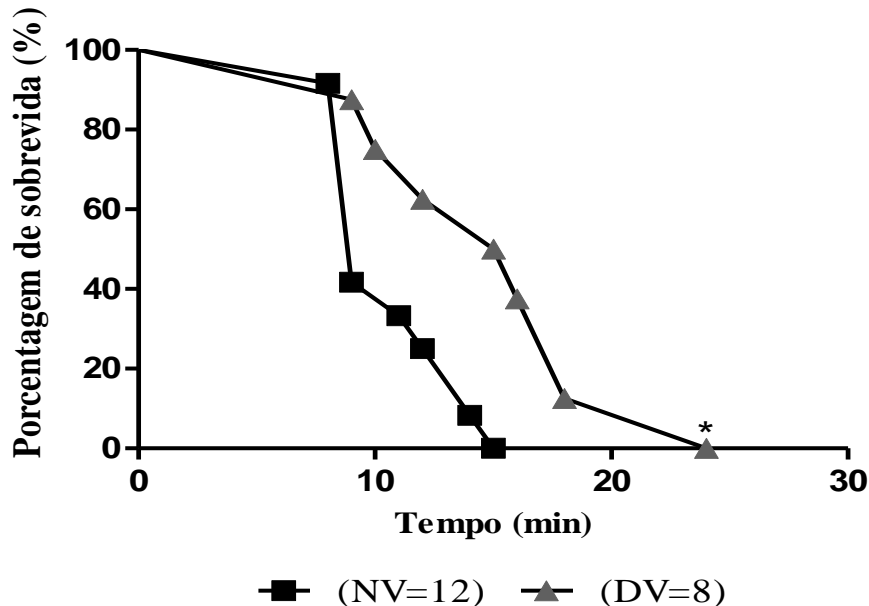


Figura 15: Porcentagem de sobrevivência (%) em relação ao tempo (min) após injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos Veículo. * Diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).

4.3-Efeitos das diferentes doses de Carbamazepina sobre as manifestações cardiovasculares e sobrevivência decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX

Como visto anteriormente, a injeção i.c.v. de TsTX evocou, imediatamente, um aumento significativo da PAM nos animais Normonutridos. Contudo, as doses de 50 e 100 mg/kg de CBZ, respectivamente, reduziram significativamente este aumento (**TsTX1= NV: 169±4 mmHg, NCBZ50: 141±11 mmHg; NCBZ100: 124±9 mmHg; $p<0,0001$; Figura 16A e Tabela 12**).

Além disso, apenas o pré-tratamento com 100 mg/kg de CBZ foi capaz de reduzir significativamente o aumento da FC evocado pela TsTX (**TsTX1= NV: 437 ± 15 bpm; NCBZ100: 305 ± 5 bpm; $p<0,0001$**). Entretanto, esta dose ocasionou bradicardia, já observada no período Veículo/CBZ (**VEC/CBZ= NV: 385 ± 13 bpm; NCBZ100: 287 ± 22 bpm; $p<0,0001$; Figura 16B e Tabela 13**).

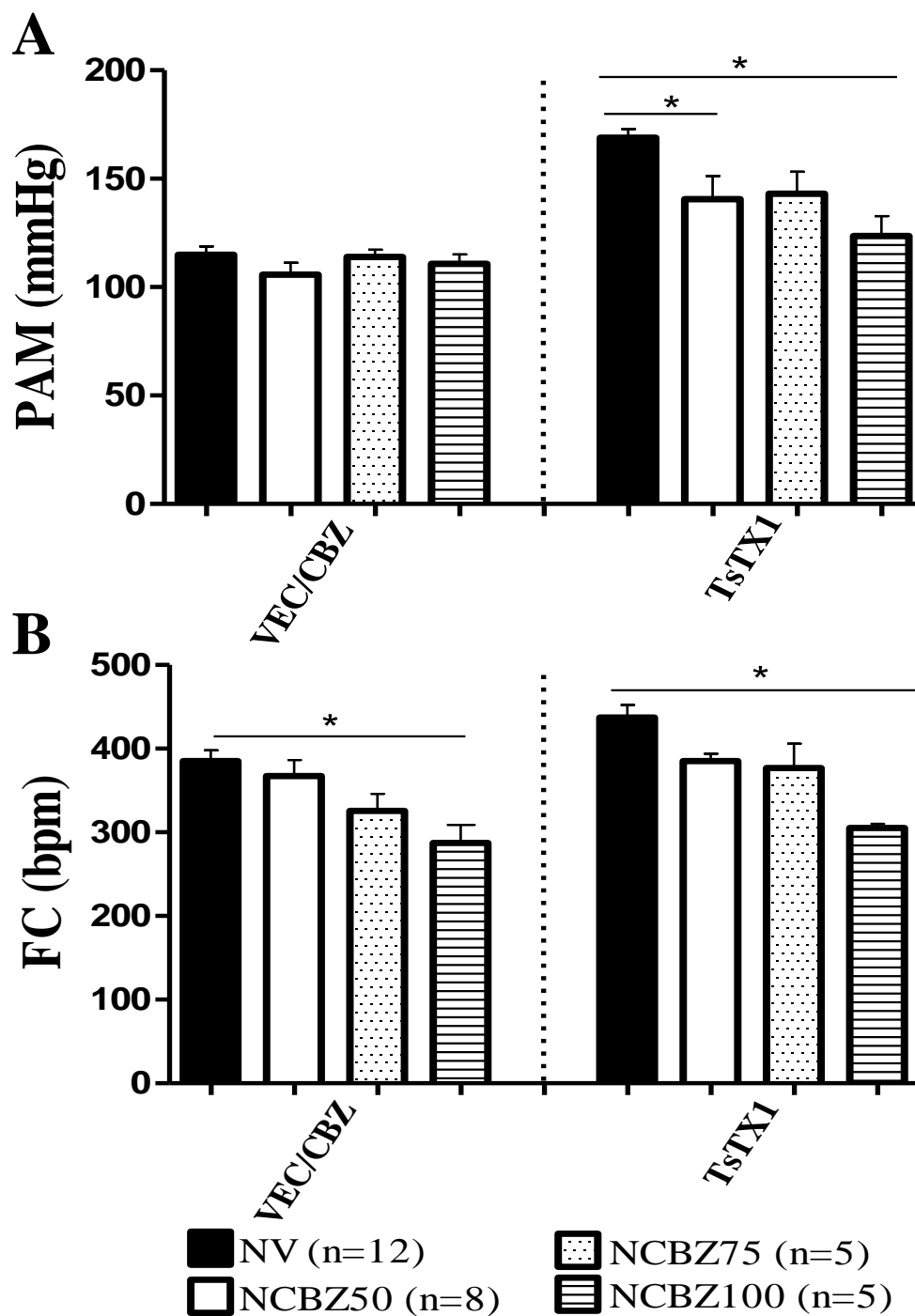


Figura 16: (A) Níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) de ratos Normonutridos inoculados com TsTX após o pré-tratamento com veículo (NV) ou diferentes doses de Carbamazepina (NCBZ50, NCBZ75 e NCBZ100). As barras representam média \pm EPM.; *Diferença estatística em relação ao grupo NV; $p < 0,05$; Anova one-way, pós-test de Tukey.

Como pode ser observado na **Figura 17** e na **Tabela 14**, todas as doses de CBZ (50, 75 e 100mg/kg) promoveram aumento significativo na sobrevivência após a injeção de

TsTX, quando comparado ao grupo Normonutrido Veículo, (Med: Q1/Q3; NV= 9:9/13,5 min; NCBZ50= 24,5:17,3/28,8 min, $p=0,0001$; NCBZ75= 28:23,5/60 min, $p<0,0001$ e NCBZ100= 60: 51,5/60 min; $p=0,0004$). A dose de 100mg/kg foi capaz de promover 80% de sobrevivência, enquanto as doses de 50 e 75 mg/kg, foram responsáveis por 12,5% e 40% de sobrevivência, respectivamente.

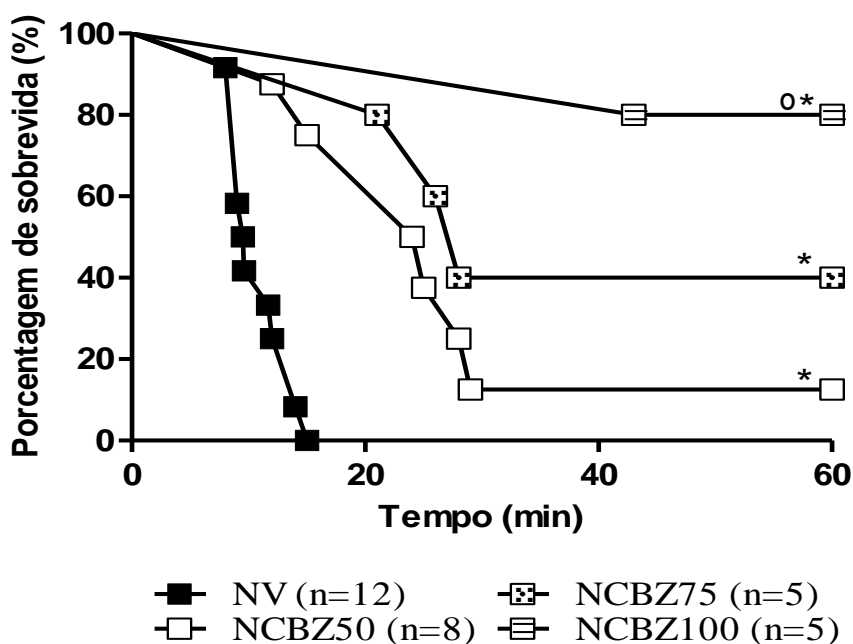


Figura 17: Porcentagem de sobrevivência (%) em relação ao tempo (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos pré-tratados com veículo (NV) ou com diferentes doses de Carbamazepina (NCBZ50, NCBZ75 e NCBZ100). *Diferença estatística em relação ao grupo Veículo ($p<0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas) e; Diferença estatística em relação ao grupo NCBZ50 ($p<0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).

4.4- Efeitos da Carbamazepina sobre as respostas cardiovasculares e sobrevivência decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em diferentes estados nutricionais

Observamos uma menor resposta pressora nos primeiros minutos após a microinjeção i.c.v. de TsTX no grupo Normonutrido pré-tratado com 50 mg/kg de CBZ (TsTX1= NV: 169 ± 4 mmHg vs. NCBZ: 141 ± 11 mmHg; interação entre período e tratamento em TsTX1: $F(1,72)=4,6$; $p<0,05$). Entretanto, a CBZ não alterou as respostas observadas em TsTX2 e TsTX3 (meio e fim do registro pós-TsTX).

Contudo, esta dose não reduziu significativamente os níveis de FC nos primeiros minutos após a ação da toxina (**TsTX1= NV: 437±15 bpm vs. NCBZ: 385±9 bpm; p<0,05**). Estes resultados estão ilustrados na **Figura 18A e B** e nas **Tabelas 15 e 16**, respectivamente.

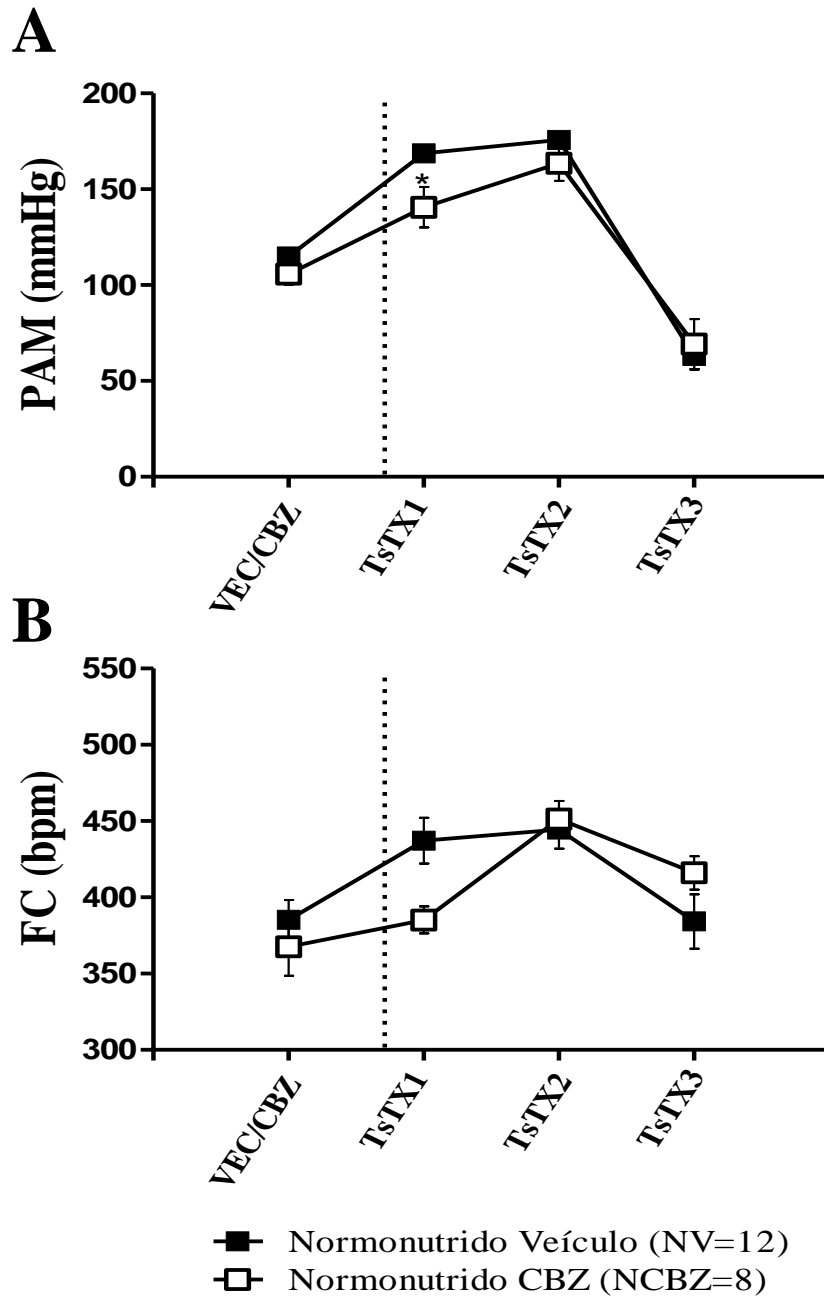


Figura 18: (A) Níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos pré-tratados com veículo (NV) ou com Carbamazepina na dose de 50 mg/kg (NCBZ). Os símbolos representam média ± EPM.; *Diferença estatística entre os grupos (p<0,05; Anova two-way, pós teste de Bonferroni).

Nos animais desnutridos, o pré-tratamento com 50 mg/kg de CBZ não foi eficiente em reduzir o aumento de PAM decorrente da ação da toxina escorpionic. Tampouco provocou alterações nos níveis de FC, tal como exposto na **Figura 19 A e B** e nas **Tabelas 17 e 18**.

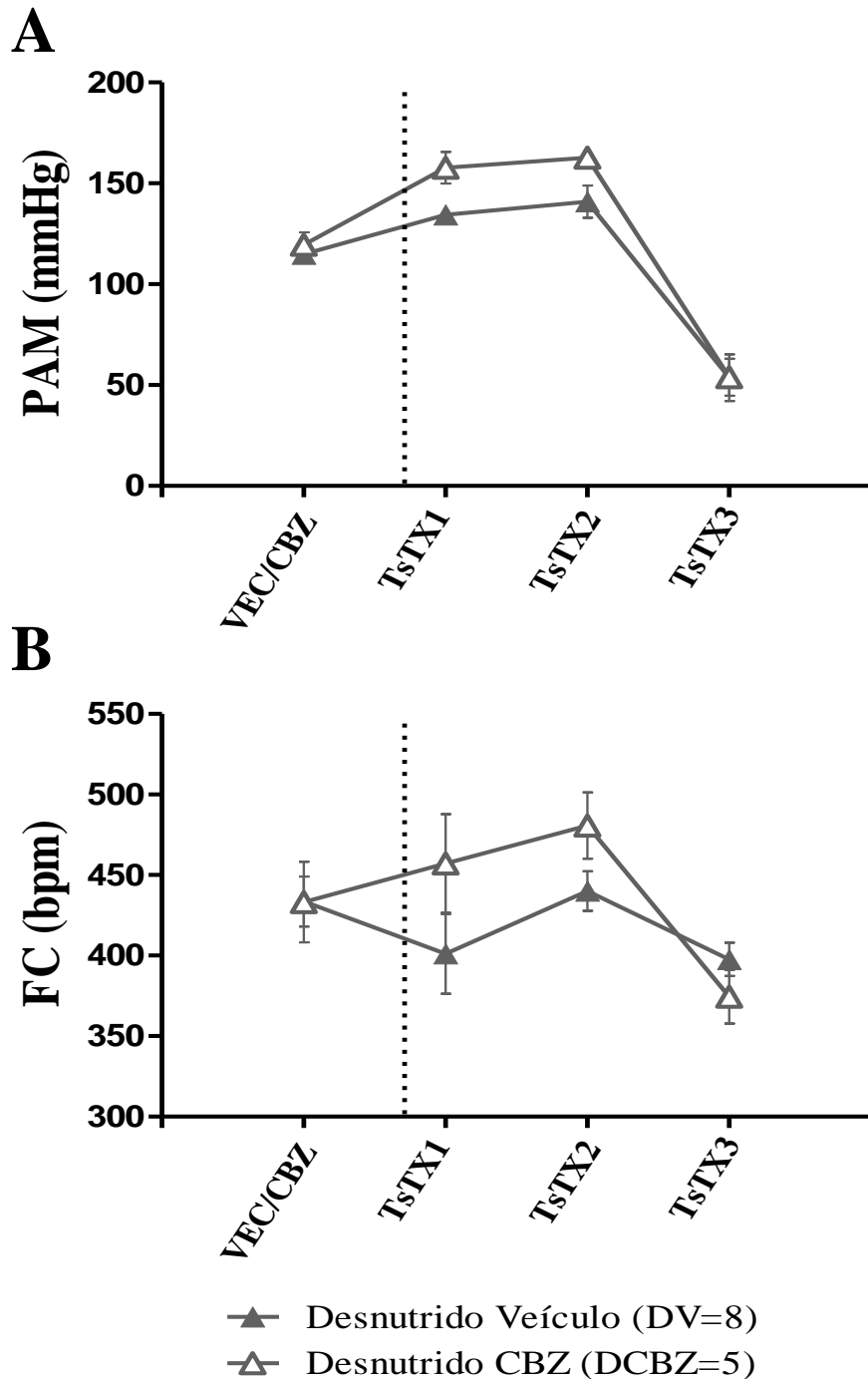


Figura 19: (A) Níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos desnutridos pré-tratados com veículo (DV) ou Carbamazepina 50 mg/kg (DCBZ). Os símbolos representam média \pm EPM.; *Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way, Pós teste de Bonferroni).

Embora a desnutrição tenha conferido um aumento significativo na porcentagem de sobrevivida dos animais submetidos à microinjeção i.c.v. de Tityustoxina, conforme citado anteriormente, o pré-tratamento com 50 mg/kg de CBZ só foi eficiente em aumentar significativamente este parâmetro no grupo Normonutrido (Med:Q1/Q3; NV = 9:9/13,5 min vs. NCBZ= 24,5:17,3/28,8 min, $p=0,0001$; DV= 15,5:10,5/18 min vs. DCBZ= 18:10/25 min, $p=0,1904$). Observamos que no grupo NCBZ não houve óbito de um animal (Figura 20 e Tabela 19).

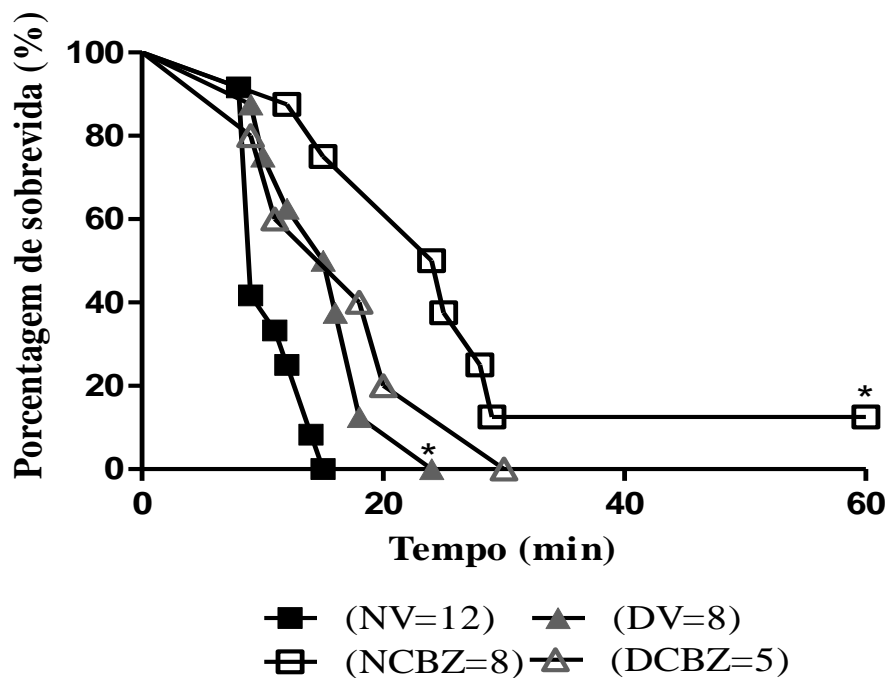


Figura 20: Porcentagem de sobrevivida (%) em relação ao tempo (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos e desnutridos pré-tratados com veículo (NV e DV) ou com 50mg/kg de Carbamazepina (NCBZ e DCBZ). *Diferença estatística em relação ao grupo Normonutrido Veículo ($p<0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).

4.5 – Efeitos do bloqueio autonômico sobre as respostas cardiovasculares e sobrevivida decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em diferentes estados nutricionais

- Bloqueio dos receptores α -1 adrenérgicos com Cloridrato de Prazosina

Em resposta ao Prazosin, houve uma redução significativa dos níveis basais de PAM nos grupos Normonutrido e Desnutrido Prazosin, embora tenha ocorrido uma maior queda no grupo submetido à desnutrição protéica (NP= Basal:110 \pm 2 mmHg vs. PZS: 97 \pm 1 mmHg, Δ =13 mmHg; DP= Basal:120 \pm 2 mmHg vs. PZS: 101 \pm 2 mmHg, Δ =19 mmHg;

$p < 0,05$) (**Figura 21A** e **Tabela 20**). Contudo, após o bloqueio dos receptores α -1 adrenérgicos com PZS, não houve alteração significativa no perfil da resposta pressora evocada pela TsTX em ambos os grupos, sendo esta resposta semelhante à observada nos grupos Veículos (**Tabela 21**).

Também foi observado que o PZS induziu um aumento significativo nos níveis basais de FC apenas no grupo Normonutrido Prazosin (**NP= Basal: 385±13 bpm vs. PZS: 432±13 bpm; interação entre período e dieta em PZS: F(4,48)=3,163, $p < 0,05$**); **Figura 21A** e **Tabela 22**). Entretanto, não alterou significativamente o perfil da resposta cronotrópica cardíaca desencadeada pela TsTX em nenhum grupo, sendo tal resposta similar à observada nos grupos Veículos (**Tabela 23**).

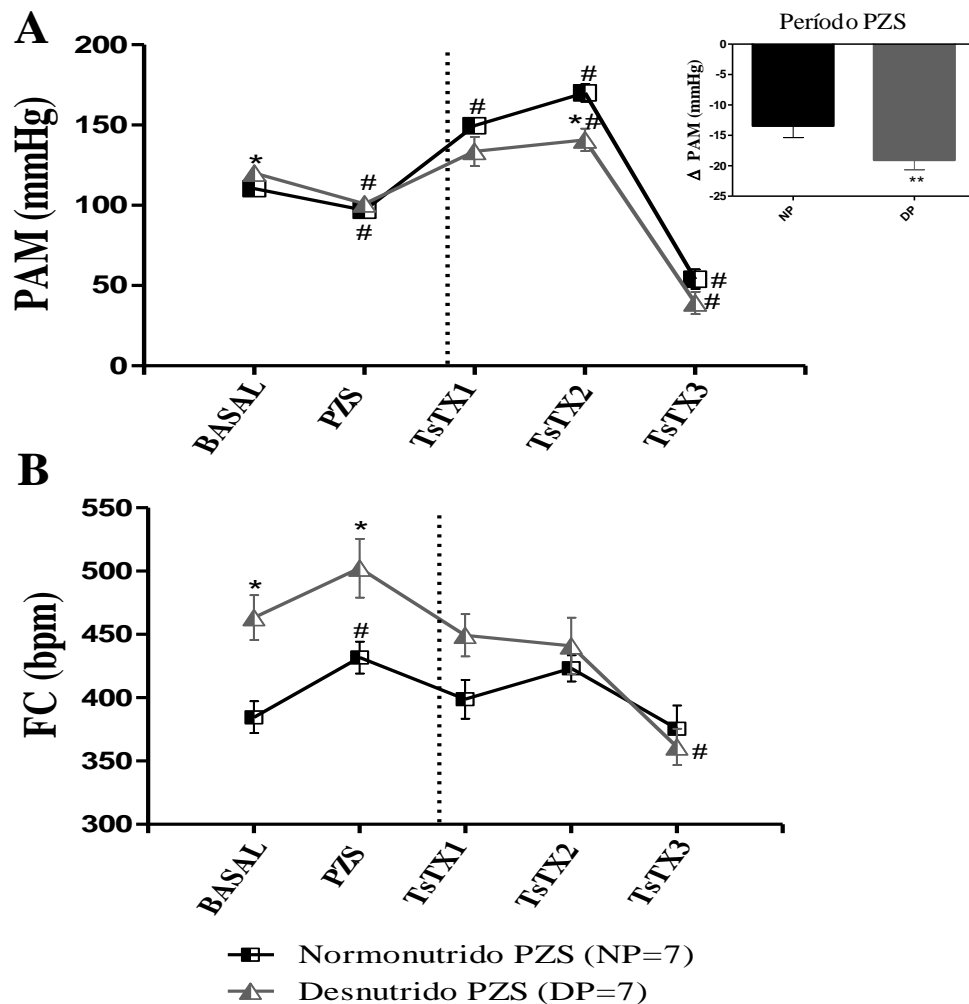


Figura 21: (A) Níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos pré-tratados com Prazosin. Os símbolos representam média \pm EPM.; **Diferença estatística entre os grupos no período PZS ($p < 0,05$; Teste t- não pareado); * Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$, Anova two-way; Pós teste de Bonferroni); #, Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$, Anova One-way, pós-teste de Dunnett).

O bloqueio do SNS com PZS não alterou significativamente a porcentagem de sobrevivência dos grupos submetidos à injeção de TsTX (Med:Q1/Q3; NV= 9:9/13,5min vs. NP= 12:9/14 min, $p=0,4294$; DV= 15,5:10,5/18 min vs. DP= 13:11/25 min; $p=0,4138$; **Figura 22 e Tabela 24**).

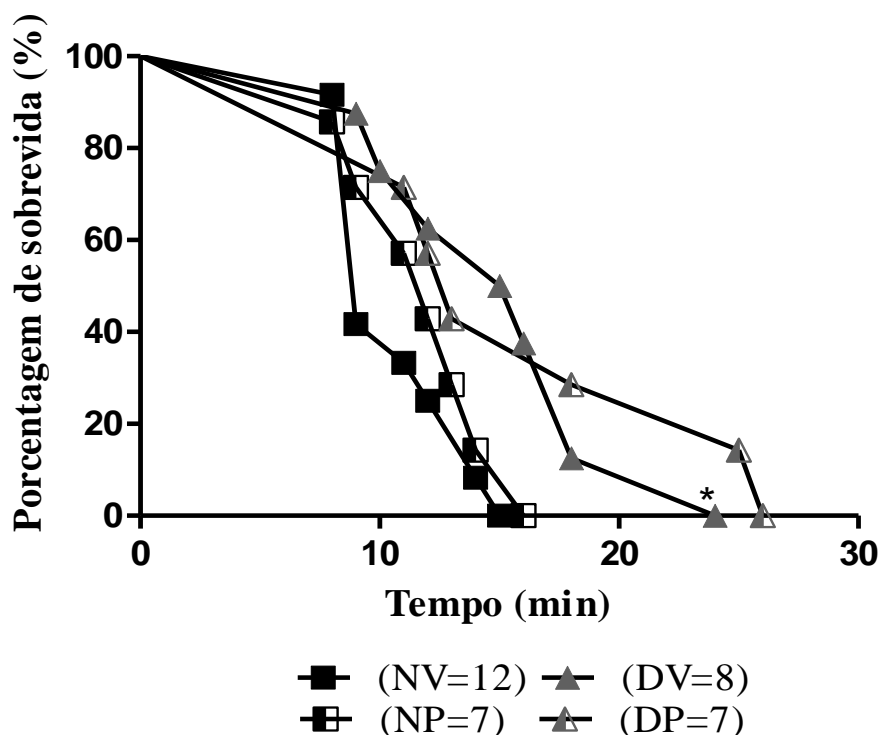


Figura 22: Porcentagem de sobrevivência (%) em relação ao tempo (min) após injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV e DV) ou Prazosin (NP e DP). *; Diferença estatística em relação ao grupo Normonutrido Veículo ($p<0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).

- **Bloqueio dos receptores muscarínicos com Brometo de Metil-atropina**

Em resposta à Metil-atropina, não houve alteração nos níveis basais de PAM em nenhum dos grupos. Entretanto, o bloqueio do SNP alterou a resposta pressora evocada pela TsTX apenas no grupo Desnutrido Metil, provocando um aumento desta resposta em TsTX2, a qual foi significativamente diferente da observada no Grupo Desnutrido Veículo; $p<0,05$ (**Figura 23C e Tabela 26**). Em relação à FC, observamos um aumento significativo nos níveis basais deste parâmetro apenas no grupo Normonutrido Metil (NM= **Basal:** 383 ± 15 bpm vs. **Atropina:** 435 ± 16 bpm; $p<0,05$). Porém, o bloqueio do SNP modificou a resposta cronotrópica cardíaca evocada pela TsTX apenas no grupo Desnutrido Metil, ocasionando um súbito aumento da FC (**DM= Basal:** 429 ± 17 bpm vs.

TsTX1: 509 ± 25 bpm; $p < 0,05$ (**Figura 23B e Tabela 27**), resposta significativamente diferente da observada no Grupo Desnutrido Veículo; $p < 0,05$ (**Figura 23C e Tabela 28**).

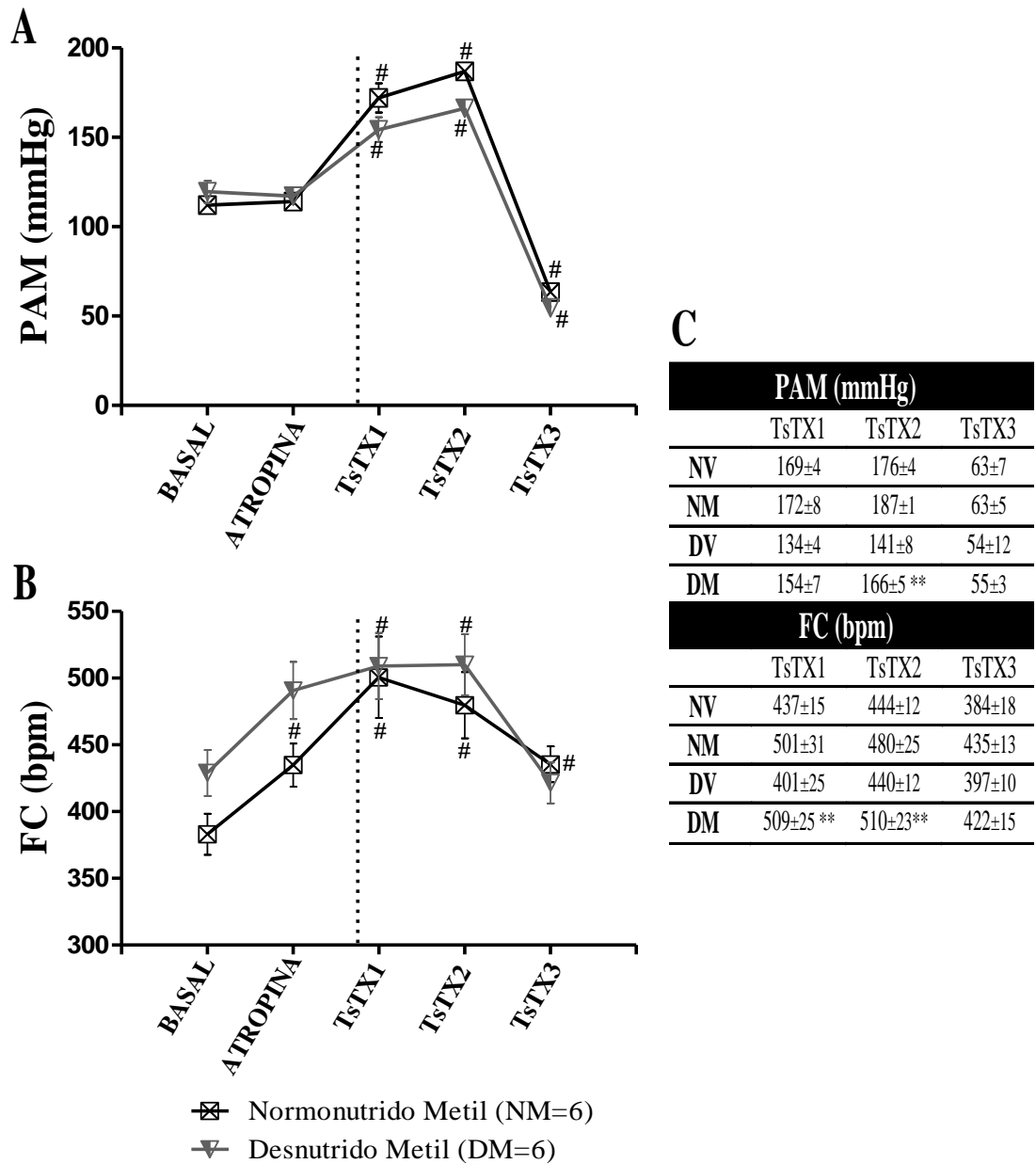


Figura 23: (A) Níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg), (B) Frequência Cardíaca (FC; bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos pré-tratados com Metil-atropina e (C) Níveis de PAM e FC após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos pré-tratados com Veículo (NV, DV) e com Metil-atropina (NM e DM). Os símbolos representam média \pm EPM. *Diferença estatística entre os grupos NM e DM ($p < 0,05$, Anova two-way; Pós teste de Bonferroni); **Diferença estatística entre os grupos DV e DM ($p < 0,05$, Anova two-way; Pós teste de Bonferroni); #, Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$, Anova One-way, pós-teste de Dunnetts).

De maneira análoga ao bloqueio $\alpha 1$ -adrenérgico, o bloqueio muscarínico com Metil-atropina não alterou significativamente a porcentagem de sobrevivência de ambos os

grupos submetidos à ação da TsTX (Med:Q1/Q3; NV= 9:9/13,5 min vs. NM= 8,5:8/16,9 min, $p=0,5568$; DV= 15,5:10,5/18 min vs. DM= 16,5:12/19 min, $p=0,9830$; **Figura 24 e Tabela 29**).

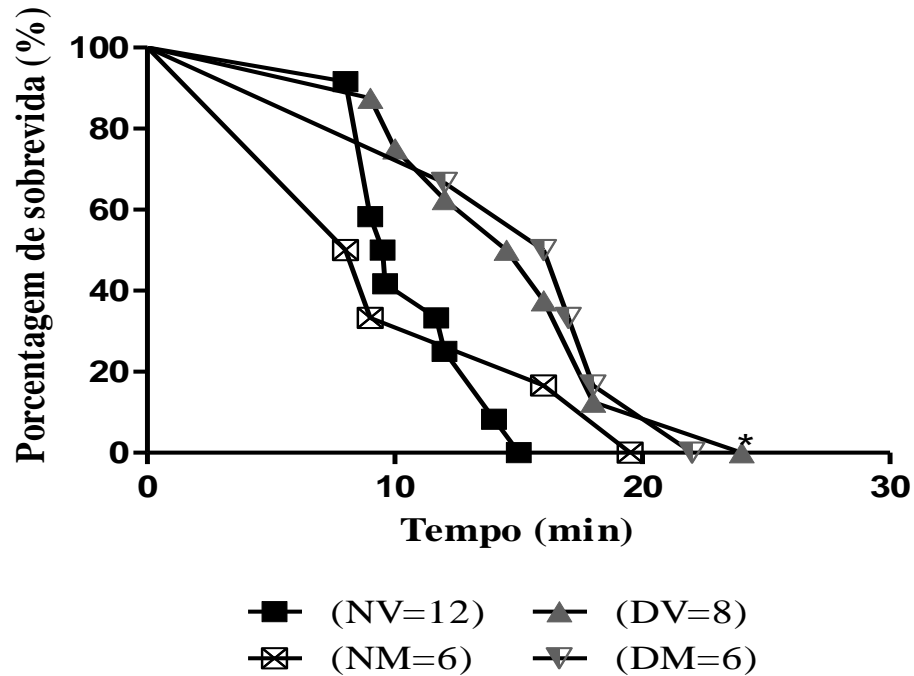


Figura 24: Porcentagem de sobrevivida (%) em relação ao tempo (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV e DV) ou Metil-atropina (NM e DM). *; Diferença estatística em relação ao grupo Normonutrido Veículo ($p<0,05$, estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).

4.6- Sítio de microinjeção da TsTX no Ventrículo Lateral Esquerdo

Os sítios de injeção de TsTX em um animal normonutrido (letra **A**) e desnutrido (letra **B**) podem ser visualizados na **Figura 25**.

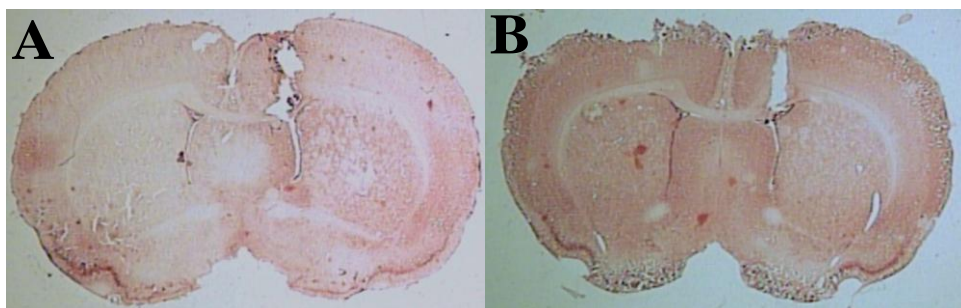


Figura 25: Fotomicrografia de uma seção coronal do cérebro de um rato Normonutrido (**A**) e Desnutrido (**B**), com seus respectivos sítios de microinjeção no VLE.

5– DISCUSSÃO

A redução do peso corporal, dos níveis de albumina plasmática e de proteínas totais são indicadores básicos de desnutrição (Lucas, 1998). Resultados prévios de nosso laboratório demonstraram a redução desses parâmetros, validando a eficiência da dieta hipoprotéica utilizada (composta por 6% de caseína) em induzir um quadro de desnutrição experimental (Tropia *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004; Penitente *et al.*, 2007).

Neste trabalho, como esperado, observamos uma redução de peso corporal de aproximadamente 69% nos animais submetidos ao protocolo de desnutrição protéica durante 35 dias pós-desmame. Entretanto, não observamos alteração no peso cerebral destes animais. Este resultado não é surpreendente, uma vez que o encéfalo, ao sofrer um insulto nutricional, é resguardado, em detrimento de estruturas como as vísceras (Hales e Barker, 1992). Adicionalmente, alterações orgânicas decorrentes da desnutrição dependem do tempo de exposição e gravidade da carência nutricional, além da fase de desenvolvimento em que o indivíduo se encontra (Morgane *et al.*, 1978). Em ratos, o período de aleitamento corresponde ao período de crescimento rápido do cérebro (fase de intensa hiperplasia e hipertrofia), o qual é considerado crítico por sua vulnerabilidade a vários tipos de agressão (Santos-Monteiro *et al.*, 2002). Assim, a imposição da desnutrição no pós-desmame - período um pouco menos crítico para o desenvolvimento cerebral - pode ter contribuído para sua preservação macroscópica. Contudo, não devemos descartar a ocorrência de alterações microscópicas, visto que a deficiência nutricional pode produzir efeitos deletérios na maturação bioquímica e morfológica do SNC, como o prejuízo no processo de mielinização que ocorre tanto no período pré, quanto no período pós-natal (Tortora e Evans, 1986).

A desnutrição, em fases iniciais da vida, também pode causar distúrbios cardiovasculares. Observamos um aumento dos níveis basais de pressão arterial média e frequência cardíaca nos animais desnutridos, similares a resultados reportados por outros autores (Oliveira *et al.*, 2004; Gomide, 2007). Estes valores podem ser explicados por um aumento da atividade simpática vasomotora (Tropia *et al.*, 2001), ou pela elevação da atividade eferente simpática e redução da atividade eferente parassimpática cardíaca nestes animais (Martins, 2007), conforme observado em outros estudos do nosso laboratório.

Sendo assim, devemos considerar possíveis alterações ocorridas no Sistema Nervoso Central. Rodrigues *et al.* sugeriram que a desnutrição promove alterações nos

mecanismos centrais de controle autonômico, após observar um aumento da sensibilidade e da responsividade dos neurônios do RVLM à microinjeção de L-glutamato (Rodrigues, 2008). Outros dados da literatura propõem que a desnutrição, nas fases iniciais do desenvolvimento, pode levar ao desequilíbrio autonômico através de alterações morfológicas em áreas do Sistema Nervoso Central, como o hipotálamo (Plagemann *et al.*, 2000). Estas alterações hipotalâmicas sugeridas por Plagemann *et al.* associadas às alterações nos mecanismos de controle cardiovascular, como demonstrado por nosso grupo, podem justificar os diferentes efeitos decorrentes da ação central da TsTX sobre o SC e sobrevida de ratos Fischer normonutridos e desnutridos.

Ao realizarmos a microinjeção i.c.v. de 1,74 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de TsTX, observamos um aumento da PAM em ambos os grupos (Normonutrido e Desnutrido), embora este aumento tenha sido menor e ocorrido com maior latência nos animais desnutridos. Em relação à FC, observamos mudanças nos níveis deste parâmetro apenas no grupo Normonutrido. Constatamos, também, uma maior sobrevida nos animais do grupo Desnutrido, quando comparado ao grupo Normotrido. Estes dados corroboram os de Mesquita *et al.* (2003), visto que esta pequena dose de toxina, quando injetada i.c.v., promoveu graves alterações periféricas e óbito em 100% dos animais, mimetizando a sintomatologia observada no envenenamento escorpiónico grave (Mesquita *et al.*, 2003). Podemos excluir a circulação retrógrada da TsTX (passagem para a circulação venosa através de uma possível absorção ao nível das granulações aracnóideas) e sua ação direta sobre o coração, já que esta mesma dose, quando injetada i.v. ou quando usada em modelo de coração isolado, não produziu alterações cardiovasculares significativas (Mesquita *et al.*, 2002). Sendo assim, a intensidade e o aparecimento precoce das alterações hemodinâmicas e cardíacas observadas após a microinjeção de TsTX sugere uma ação central desta toxina sobre núcleos relacionados ao controle cardiovascular em ambos os grupos, mesmo esta ação sendo menos expressiva na presença de um quadro de desnutrição protéica. Esta diferença na intensidade dos sintomas pode ser explicada por uma diminuição do número ou por alterações morfofuncionais dos CSDVs - proteína transmembrana que corresponde ao sítio de ligação da TsTX – como sugerido no estudo de Silva *et al.* (2008), o qual reportou uma maior porcentagem de captação da toxina $\text{TiTX-}\gamma$ radioativa em cérebros de ratos normonutridos quando comparados a desnutridos (Silva, 2008). Em conjunto, estes resultados apontam para uma correlação entre o grau de ligação das neurotoxinas a neurônios do SNC e o tempo de morte.

Para avaliarmos a influência da inibição do SNC na gênese das alterações cardiovasculares decorrentes da ação central da TsTX, utilizamos a Carbamazepina –droga bloqueadora dos CSDVs. A CBZ interage alostericamente com o sítio II dos CSDVs, estabiliza estes canais no estado inativado, reduz o influxo de sódio e diminui a excitabilidade neuronal (Worley e Baraban, 1987).

Dados da literatura demonstraram a eficiência da CBZ em atenuar as manifestações sistêmicas decorrentes do envenenamento escorpiônico experimental ou da ação direta das toxinas do veneno sobre o SNC (Guidine *et al.*, 2008a; Guidine *et al.*, 2008b; c). Contudo, todos estes estudos foram realizados em ratos Wistar. Sendo assim, antes de realizar o protocolo de bloqueio dos CSDVs com CBZ, avaliamos o efeito de diferentes doses de CBZ em ratos Fischer, para testar a reprodutibilidade dos dados supracitados em ratos de outra linhagem.

Conforme previamente justificado na metodologia deste protocolo (item 3.10.2), optamos por realizá-lo apenas para o Grupo Normonutrido. Observamos que a dose de 100 mg/kg de CBZ foi a mais eficiente em reduzir os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) e aumentar a sobrevida dos animais inoculados com a TsTX. Este resultado condiz com seu mecanismo bloqueador uso-dependente, haja vista que a CBZ liga-se preferencialmente a CSDVs no seu estado inativado, diminuindo, assim, o número de CSDVs disponíveis para a ligação de TsTX (Kuo *et al.*, 1997). Contudo, esta dose alterou o cronotropismo cardíaco basal dos animais (produziu bradicardia no período VEC/CBZ). De fato, a CBZ é um agente neurotrópico capaz de produzir efeitos cronotrópicos e dromotrópicos negativos no sistema de condução cardíaco, principalmente em doses supraterapêuticas (Namboodiri *et al.*, 2006). Adicionalmente, constatamos que 50 mg/kg de CBZ foi a menor dose utilizada capaz de atenuar a maior parte desses parâmetros (PAM e óbito). Assim, essa foi a dose escolhida para utilização nos próximos protocolos, uma vez que precisávamos evitar um possível efeito tóxico da droga no grupo Desnutrido.

Uma vez definida a dose de CBZ (50mg/kg), objetivamos averiguar os efeitos dessa droga na gênese da sintomatologia decorrente da ação da TsTX nos diferentes estados nutricionais (normonutrição e desnutrição). Observamos a capacidade da CBZ em melhorar as manifestações cardiovasculares e a sobrevida após a injeção i.c.v. de TsTX apenas no grupo Normonutrido, sendo ineficiente nos ratos submetidos à restrição protéica. Este resultado reforça a hipótese da desnutrição ocasionar alterações morfológicas ou numéricas na expressão de CSDVs, conforme sugerido anteriormente, uma vez que estes

canais também são o alvo da ação da CBZ. Outros estudos também sustentam esta hipótese e evidenciam uma liberação reduzida de glutamato (Barbosa, 2007) e de acetilcolina (Silva, 2008) no SNC de ratos desnutridos estimulados com a TsTX- γ , uma β -toxina.

Diante da relevante participação do SNC na sintomatologia decorrente da injeção i.c.v. de TsTX, decidimos investigar a contribuição de cada subdivisão autonômica no comprometimento do SC e óbito resultantes da ação central da TsTX.

Em resposta ao Prazosin, antagonista dos receptores α -1 adrenérgicos, observamos redução dos níveis basais da PAM nos grupos Normonutrido e Desnutrido, provavelmente conseqüente à diminuição da resistência periférica e do retorno venoso ao coração (Goodman e Gilman, 2005). Contudo, essa redução pressórica foi mais acentuada nos ratos submetidos à desnutrição protéica, sugerindo uma maior ativação simpática vasomotora nestes animais, conforme reportado em outros trabalhos (Tropia *et al.*, 2001; Loss *et al.*, 2007). Em relação aos níveis basais de FC, observamos resposta taquicárdica após o bloqueio α -1 adrenérgico apenas no grupo Normonutrido. Embora a redução da pré-carga, associada ao bloqueio seletivo dos receptores α -1 exercido pelo Prazosin, possa impedir a taquicardia reflexa (Goodman e Gilman, 2005), esta pode ser explicada pela estimulação residual dos receptores β 1 cardíacos, os quais não foram bloqueados. Sendo assim, o fato de o Prazosin não ter alterado o perfil das respostas pressora e cronotrópica cardíaca, tampouco a sobrevida após a ação da TsTX, sugere que as graves manifestações cardiocirculatórias observadas no escorpionismo, as quais culminam em óbito, podem ser mediadas pela ação das catecolaminas sobre os receptores β 1-adrenérgicos. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar especificamente a participação dos receptores β 1-adrenérgicos na sintomatologia abordada.

Após avaliarmos a contribuição da atividade simpática vasomotora sobre os efeitos cardiocirculatórios induzidos pela injeção i.c.v. de TsTX, também investigamos a participação do SNP. Como esperado, o bloqueio dos receptores muscarínicos com Metil-atropina não alterou os níveis basais da PAM em nenhum grupo, visto que a maioria dos leitos vasculares não apresenta inervação colinérgica (Goodman e Gilman, 2005). Por outro lado, observamos o aumento da FC basal apenas no grupo Normonutrido, de maneira semelhante aos resultados publicados por Martins *et al.* (2007), indicando menor atividade parassimpática eferente para o coração em ratos submetidos à restrição protéica (Martins, 2007). Além disso, após o bloqueio do SNP, observamos alterações relevantes no perfil da resposta pressora e cronotrópica cardíaca (maior aumento da PAM e elevação da FC)

decorrentes da ação da TsTX sobre o SNC, apenas no grupo Desnutrido. Esse dado contrasta com o aumento de atividade simpática que verificamos nos animais desnutridos em condições basais, visto que sugere uma maior participação do SNP sobre as alterações cardiocirculatórias mediadas pela TsTX. Neste contexto, o SNP possivelmente atua freando a ativação simpática desencadeada pela toxina, pois esses animais já apresentam uma hiperatividade simpática basal. Contudo, como vimos anteriormente, quando não atropinizados, os animais desnutridos apresentaram uma resposta pressora (branda e tardia) secundária à TsTX. Tal resposta pode ser parcialmente explicada por uma menor excitabilidade neuronal em consequência de uma provável redução numérica dos CSDVs. Sabendo que a TsTX estimula a liberação de glutamato em preparações teciduais (Massensini *et al.*, 1998) e que a pronunciada liberação desse neurotransmissor está associada à toxicidade e morte neuronal (Millan *et al.*, 1993), a neurotoxicidade do glutamato sobre áreas bulbares e/ou hipotalâmicas poderia, em parte, justificar as alterações cardiovasculares observadas. Sendo assim, a menor liberação de glutamato evocada pela toxina escorpiônica em animais desnutridos (Barbosa, 2007) pressupõe uma menor intensidade das manifestações cardiocirculatórias encontradas neste grupo. Essa alteração na neurotransmissão glutamatérgica pode ser reforçada por outros estudos (Agarwal *et al.*, 1981; Barbosa, 2007; Rodrigues, 2008). Considerando que a desnutrição protéica altera a síntese de neurotransmissores, o número e a afinidade de receptores de vários sistemas de neurotransmissão, como o serotoninérgico, o dopaminérgico, o gabaérgico e o colinérgico (Almeida *et al.*, 1996), de alguma maneira, este insulto nutricional pode interferir na ativação de substratos neurais recrutados pela TsTX. É possível que a desnutrição protéica cause alterações em núcleos hipotalâmicos relacionados ao controle cardiovascular, haja vista que o hipotálamo é uma importante região do SNC que atua, principalmente, na regulação central da ingestão alimentar, metabolismo e atividade autonômica (Douglas, 2006; Pillot *et al.*, 2011).

A redução reversível no número de receptores α e β adrenérgicos decorrente da desnutrição promovida no período de lactação, conforme relatado por Bell e Slotkin (1988), sugere que o número desses receptores é controlado, ao menos em parte, pelo estado nutricional. Esse déficit numérico secundário à desnutrição, provavelmente, pode contribuir para uma menor responsividade à estimulação adrenérgica (Bell e Slotkin, 1988). Diante dessa observação, é pertinente a idéia de que essa responsividade reduzida estimule um mecanismo adaptativo de ajuste autonômico da PA em animais desnutridos.

Não obstante, o fato de não termos observado alteração na sobrevivência dos animais normonutridos e desnutridos inoculados com a TsTX em nenhum dos grupos submetidos aos bloqueios autonômicos, reforça a idéia de que o óbito e as manifestações graves decorrentes da microinjeção i.c.v. desta toxina estão estreitamente relacionadas a hiperexcitabilidade neuronal gerada por sua ação direta sobre o SNC, não associando-se diretamente a possíveis alterações nas eferências autonômicas e/ou nos órgãos efetores.

Mais estudos devem ser realizados para elucidar quais e como os núcleos relacionados ao controle cardiovascular são recrutados nos diferentes estados nutricionais frente à ação central da TsTX. A longo prazo, esta diferença poderá ser exatamente o ponto estratégico para um tratamento coadjuvante específico, que retarde os graves sintomas cerebrais e cardiovasculares observados. Possivelmente, esta medida prolongaria a sobrevivência do paciente e viabilizaria um melhor prognóstico, até que o mesmo tenha acesso aos Centros de Referência de Tratamento de Acidentes Escorpiônicos.

Esperamos ter contribuído para o entendimento fisiopatológico deste fenômeno tão complexo, que é a Síndrome do envenenamento escorpiônico, a qual acomete fortemente países em desenvolvimento, principalmente na faixa etária infantil.

6- CONCLUSÕES

- ✓ A desnutrição protéica pós-desmame, imposta por 35 dias, promoveu redução no peso corporal e aumento nos níveis basais da PAM e FC.
- ✓ A microinjeção i.c.v. de TsTX, na dose de 1,74 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, induziu aumento da PAM nos dois grupos, embora este aumento tenha sido menor e ocorrido com maior latência no grupo Desnutrido. Induziu aumento da FC apenas no grupo Normonutrido. Provocou óbito em 100% dos animais, embora o Grupo Desnutrido tenha apresentado maior sobrevida em relação ao Grupo Normonutrido.
- ✓ A injeção i.p. de CBZ, nas doses de 50 e 100 mg/kg, foi eficaz em atenuar o aumento de pelo menos um dos parâmetros analisados (FC e PAM) induzidos pela TsTX em ratos normonutridos, aumentando a sobrevida dos animais.
- ✓ A injeção i.p. de 50 mg/kg de CBZ reduziu o aumento da PAM evocado pela TsTX e aumentou a sobrevida dos animais do grupo Normonutrido, sendo ineficiente nos ratos submetidos à restrição protéica.
- ✓ A administração i.v. de Prazosin (1mg/kg/mL) reduziu os níveis basais de PAM nos dois grupos; contudo, essa redução foi maior nos ratos desnutridos. Adicionalmente, aumentou os níveis basais de FC apenas no grupo Normonutrido e não alterou a sobrevida de nenhum grupo.
- ✓ A administração i.v. de Metil-atropina (1mg/kg/mL) não modificou os níveis basais da PAM em nenhum dos grupos, mas aumentou a FC apenas no grupo Normonutrido. Alterou os perfis da resposta pressora e cronotrópica cardíaca desencadeadas pela ação central da TsTX, exclusivamente no grupo Desnutrido. Além disso, não modificou a sobrevida em nenhum grupo.

Finalmente, concluímos que a desnutrição protéica pós-desmame, induzida por 35 dias, alterou a sintomatologia decorrente da ação direta da TsTX sobre o SNC, atenuando

as manifestações cardiovasculares e retardando o óbito decorrentes desta ação. Nossos achados sugerem que os animais desnutridos possuem menos sítios de ligação (CSDV) para a toxina. Sendo assim, a gravidade dos sintomas evocados pela injeção i.c.v. de TsTX pode estar estreitamente relacionada à intensidade com que esta toxina age sobre o SNC.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABROUG, F.;ELATROUS, S. *et al.* Serotherapy in scorpion envenomation: a randomised controlled trial. *Lancet*, v. 354, n. 9182, p. 906-9, Sep 1999.

AGARWAL, K. N.;PRASAD, C. *et al.* Protein deprivation and the brain: effect on enzymes and free amino acids related to glutamate metabolism in rats. *Ann Nutr Metab*, v. 25, n. 4, p. 228-33, 1981.

ALMEIDA, S. S.;TONKISS, J. *et al.* Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 20, n. 3, p. 389-402, Autumn 1996.

BAHLOUL, M.;BOUAZIZ, M. *et al.* Value of the plasma protein and hemoglobin concentration in the diagnosis of pulmonary edema in scorpion sting patients. *Intensive Care Med*, v. 28, n. 11, p. 1600-5, Nov 2002.

BARBOSA, W. M. *Efeito da ingestão de café sobre a liberação de glutamato sinaptossomal, estimulada por toxina escorpiônica, em ratos.* (2007). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

BARHANIN, J.;GIGLIO, J. R. *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. *J Biol Chem*, v. 257, n. 21, p. 12553-8, Nov 10 1982.

BECERRIL, B.;MARANGONI, S. *et al.* Toxins and genes isolated from scorpions of the genus Tityus. *Toxicon*, v. 35, n. 6, p. 821-35, Jun 1997.

BELL, J. M. e SLOTKIN, T. A. Postnatal nutritional status influences development of cardiac adrenergic receptor binding sites. *Brain Res.Bull*, v. 21, p. 893-96, 1988.

BELMAR, J.;CARRENO, P. *et al.* Malnutrition early in life impairs alpha-2 adrenoreceptor regulation of noradrenaline release in the rat cerebral cortex. *Nutrition Research* v. 16, p. 1727-34, 1996.

BENABE, J. E. e MARTINEZ-MALDONADO, M. Dietary modification of the renin angiotensin system. *Semin Nephrol*, v. 13, n. 6, p. 567-72, Nov 1993.

BENABE, J. E.;WANG, S. *et al.* Modulation of ANG II receptor and its mRNA in normal rat by low-protein feeding. *Am J Physiol*, v. 265, n. 5 Pt 2, p. F660-9, Nov 1993.

CASALI, T. A.;GOMEZ, R. S. *et al.* Differential effects of calcium channel antagonists on tityustoxin and ouabain-induced release of [3H]acetylcholine from brain cortical slices. *Neuropharmacology*, v. 34, n. 6, p. 599-603, Jun 1995.

CIRRIELO, J.;ROCHSTENBACH, S. L. *et al.* Nucleus of the Solitary Tract. In: *Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferent fibers in the rat.*: BARRACO IRA, 1994.

CLOT-FAYBESSE, O.;GUIEU, R. *et al.* Toxicity during early development of the mouse nervous system of a scorpion neurotoxin active on sodium channels. *Life Sci*, v. 66, n. 3, p. 185-92, 2000.

CUPO, P. e HERING, S. E. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v. 40, n. 6, p. 823-30, Jun 2002.

CUPO, P.;JURCA, M. *et al.* Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 36, n. 1, p. 67-76, Jan-Feb 1994.

DEHESA-DAVILA, M. e POSSANI, L. D. Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon*, v. 32, n. 9, p. 1015-8, Sep 1994.

DENAC, H.;MEVISSSEN, M. *et al.* Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. . *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, v. 362, p. 453-79., 2000.

DINIZ, C. R. e GONÇALVES, J. M. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*, v. 41, p. 470-7, Jul 15 1960.

DO CARMO PINHO, F. M.;NIGRO, D. *et al.* Intrauterine undernutrition--renal and vascular origin of hypertension. *Cardiovasc.Res.*, v. 60, p. 228-34, 2003.

DORCE, V. A. e SANDOVAL, M. R. Effects of *Tityus serrulatus* crude venom on the GABAergic and dopaminergic systems of the rat brain. *Toxicon*, v. 32, n. 12, p. 1641-7, Dec 1994.

DOUGLAS, C. R. *Fisiologia aplicada à nutrição*. 2ª Edição. ed.: Guanabara, 2006.

EGWIM, P. O.;CHO, B. H. *et al.* Effects of postnatal protein undernutrition on myelination in rat brain. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, v. 83, n. 1, p. 67-70, 1986.

FAN, H. W.;CARDOSO, J. L. C. *et al.* Epidemiology of scorpion envenomations in Brazil. *Toxicon*, v. 34, p. 160-61, 1994.

FATANI, A. J.;HARVEY, A. L. *et al.* The effects of lignocaine on actions of the venom from the yellow scorpion "*Leiurus quinquestriatus*" in vivo and in vitro. *Toxicon*, v. 38, n. 12, p. 1787-801, Dec 2000.

FERNANDES, V. M.;MASSENSINI, A. R. *et al.* Effects of alpha-scorpion toxin, tityustoxin on the release of [3H] dopamine of rat brain prefrontal cortical slices. *Neurochem Int*, v. 44, n. 2, p. 91-7, Jan 2004.

FONTES, M. A. P.;MENEZES, R. C. A. *et al.* The dorsomedial Hypothalamus and the organization of the cardiovascular response to emotional stress: a functional perspective. .

Rev. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. In: X Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular v. 39, n. 1, p. 13-20, jan./mar. 2006.

FORTES, L. H. S. *Efeito da Ovariectomia sobre o balanço autonômico Cardíaco de Ratas submetidas à desnutrição protéica* (2010). Dissertação de Mestrado - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

GOMEZ, M. V. e DINIZ, C. R. Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 33, p. 899-902, 1966.

GOMIDE, J. M. C. *Participação dos receptores AT1 de Angiotensina II no controle da Pressão Arterial de ratos submetidos a desnutrição proteica*. (2007). Dissertação de Mestrado - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.

GOODMAN e GILMAN (Eds.) **As bases farmacológicas da terapêutica**: Mc Graw Hill, 10ª Edição ed. 2005.

GRAUMLICH, J. F.;MCLAUGHLIN, R. G. *et al.* Carbamazepine pharmacokinetics-pharmacodynamics in genetically epilepsy-prone rats. **Eur J Pharmacol**, v. 369, n. 3, p. 305-11, Mar 26 1999.

GUERON, M.;ILIA, R. *et al.* The cardiovascular system after scorpion envenomation. A review. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 30, n. 2, p. 245-58, 1992.

GUERON, M. e SOFER, S. Cardiac dysfunction and pulmonary edema following scorpion envenomation. **Chest**, v. 102, n. 4, p. 1307-9, Oct 1992.

GUIDINE, P. A.;ASSUMPCAO, G. *et al.* Dose-dependent effect of carbamazepine on weanling rats submitted to subcutaneous injection of tityustoxin. **Neurosci Lett**, v. 433, n. 3, p. 170-3, Mar 15 2008a.

GUIDINE, P. A.;MESQUITA, M. B. *et al.* Electroencephalographic evidence of brainstem recruitment during scorpion envenomation. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 1, p. 90-6, Jan 2009.

GUIDINE, P. A.;MORAES-SANTOS, T. *et al.* Carbamazepine is effective in the treatment of 21-day-old Wistar rats injected with *Tityus serrulatus* crude venom. **Brain Res**, v. 1239, p. 256-60, Nov 6 2008b.

GUIDINE, P. A.;MORAES-SANTOS, T. *et al.* Carbamazepine protects the CNS of Wistar rats against the central effects of scorpion envenomation. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 1, p. 136-42, Jan 2008c.

GUIDINE, P. A. M. *Acidentes escorpiônicos graves: uma proposta terapêutica com agentes neurotrópicos*. (2005). Dissertação de Mestrado - Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

- GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*, v. 7, n. 5, p. 335-46, May 2006.
- HALES, C. N. e BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, v. 35, n. 7, p. 595-601, Jul 1992.
- HAMED, M. I. Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12-years experience with serotherapy. *International Journal of Antimicrobial Agents* v. 21, p. 170-74, 2003.
- HERING, S. E.;AZEVEDO- MARQUES, M. M. *et al.* Escorpionismo. Plantas venenosas e animais peçonhentos. *S. Schvartsman* v., p. 216-27 1992.
- ISMAIL, M.;KERTESZ, G. *et al.* Distribution of 125I labelled scorpion (*Leiurus quinquestriatus* H and E) venom in rat. *Toxicon*, v. 12, n. 2, p. 209-11, Mar 1974.
- KALAPOTHAKIS, E. e CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon*, v. 35, n. 10, p. 1523-9, Oct 1997.
- KUO, C.;CHEN, R. *et al.* Carbamazepine inhibition of neuronal calcium currents: quantitative distinction from phenytoin and possible therapeutic implications. *Mol Pharmacol* v. 51, p. 1077-83, 1997.
- LANGLEY-EVANS, S. C. e SCULLEY, D. V. The association between birthweight and longevity in the rat is complex and modulated by maternal protein intake during fetal life. *FEBS Lett*, v. 580, n. 17, p. 4150-3, Jul 24 2006.
- LEHNINGER, A. L.;NELSON, D. L. *et al.* *Prinípios de Bioquímica*. Sarvier, 2005.
- LEON-QUINTO, T.;MAGNAN, C. *et al.* Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology*, v. 139, n. 8, p. 3382-9, Aug 1998.
- LOSS, I. O.;FERNANDES, L. G. *et al.* Baroreflex dysfunction in rats submitted to protein restriction. *Life Sci* v. 81, p. 944-50, 2007.
- LOWRY, O. H.;ROSEBROUGH, N. J. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-75, 1951.
- LUCAS, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr*, v. 128, n. 2 Suppl, p. 401S-06S, Feb 1998.
- LUCAS, S. R. R.;COSTA SILVA, V. L. *et al.* Functional and morphometric evaluation of offspring kidney after intrauterine undernutrition. *Pediatr Nephrol*, v. 11, n. 6, p. 719-23, Dec 1997.
- LUKOYANOV, N. V. e ANDRADE, J. P. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behav Brain Res*, v. 112, n. 1-2, p. 85-97, Jul 2000.

- MACHADO, B. H.;MAUAD, H. *et al.* Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. *Braz J Med Biol Res*, v. 30, n. 4, p. 533-43, Apr 1997.
- MARTINS, C. D. D. *Avaliação do balanço autonômico cardíaco de ratos submetidos a uma dieta hipoprotéica.* (2007). Dissertação de Mestrado - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 2007.
- MASSENSINI, A. R. *Estudo comparativo dos efeitos da Tityustoxina e da Toxina-gama sobre o sistema nervoso central de ratos.* (1996). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.
- MASSENSINI, A. R.;MORAES-SANTOS, T. *et al.* Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i. *Neuropharmacology*, v. 37, n. 3, p. 289-97, 1998.
- MESQUITA, M. B.;MORAES-SANTOS, T. *et al.* Phenobarbital blocks the lung edema induced by centrally injected tityustoxin in adult Wistar rats. *Neurosci Lett*, v. 332, n. 2, p. 119-22, Oct 31 2002.
- MESQUITA, M. B.;MORAES-SANTOS, T. *et al.* Centrally injected tityustoxin produces the systemic manifestations observed in severe scorpion poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 187, n. 1, p. 58-66, Feb 15 2003.
- MESQUITA, M. S. B. *Estudo das ações centrais e periféricas da fração tóxica T2III do veneno do escorpião Tityus serrulatus em ratos Wistar adultos.* (2002). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.
- MILLAN, M. H.;CHAPMAN, A. G. *et al.* Extracellular amino acid levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures. *Epilepsy Res.*, v. 14, p. 139-48, 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de atendimento da criança com desnutrição grave em nível hospitalar. 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. v. 7ª Edição: , 2009a. p. 813.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Controle de Escorpiões. v. 1ª Edição,2009b. p. 72.
- MORGANE, P.;MILLER, M. *et al.* The effects of protein malnutrition and the developing central nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 2, p. 137-230, 1978.
- NAMBOODIRI, K. K.;BOHORA, S. *et al.* Carbamazepine-induced sinus nodal dysfunction. v. 9. Annals of Indian Academy of Neurology.2006. p. 36-38.

NUNAN, E. A.;MORAES, M. F. *et al.* Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Life Sci*, v. 73, n. 3, p. 319-25, Jun 6 2003.

OLIVEIRA, E. L.;CARDOSO, L. M. *et al.* A low protein diet causes an increase in the basal levels and variability of mean arterial pressure and heart rate in Fisher rats. *Nutr Neurosci*, v. 7, n. 4, p. 201-5, Aug 2004.

PALCOVITS, M. e ZABORSZKY, L. *Neuroanatomy of central cardiovascular control. In: Nucleus tractus solitarii: Afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arch.: Prog. Brain Res.*, 1974.

PAXINOS, G. e WATSON, C. *The rat brain stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press, 1986.

PEDROSA, M. L. e MORAES-SANTOS, T. Neuronal protein biosynthesis by neonatally malnourished and nutritionally recovered rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 20, n. 3-4, p. 331-8, 1987.

PENITENTE, A. R.;FERNANDES, L. G. *et al.* Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. *Life Sci*, v. 81, n. 7, p. 609-14, Jul 26 2007.

PILLOT, B.;DURAFFOURD, C. *et al.* Role of hypothalamic melanocortin system in adaptation of food intake to food protein increase in mice. *PLoS One*, v. 6, n. 4, p. e19107, 2011.

PLAGEMANN, A.;HARDER, T. *et al.* Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr*, v. 130, n. 10, p. 2582-9, Oct 2000.

PRICE, C. J.;HOYDA, T. D. *et al.* The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist*, v. 14, n. 2, p. 182-94, Apr 2008.

REDDY, P. V.;DAS, A. *et al.* Quantitative and compositional changes in myelin of undernourished and protein malnourished rat brains. *Brain Res*, v. 161, n. 2, p. 227-35, Feb 2 1979.

REVELO, M. P.;BAMBIRRA, E. A. *et al.* Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon*, v. 34, n. 10, p. 1119-25, Oct 1996.

RODRIGUES, F. A. *Reposta pressora à microinjeção de L-glutamato no bulbo rostrorolateral de ratos submetidos à desnutrição protéica*. (2008). Dissertação de Mestrado - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 2008.

SAMPAIO, S. V.;LAURE, C. J. *et al.* Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v. 21, n. 2, p. 265-77, 1983.

- SANTOS-MONTEIRO, J.;GUEDES, R. C. A. *et al.* Psychosocial stimulation and brain plasticity in malnourished individuals. *Rev. Bras. Saúde marten. infant.*, v. 2(1), p. 15-22, 2002.
- SILVA, S. A. A. *Efeito da Tityustoxina Gama marcada com Tecnécio 99m sobre o sistema colinérgico central em ratos.* (2008). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- TEIXEIRA, A. L.;FONTOURA, B. F. *et al.* Evidence for a direct action of Tityus serrulatus scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon*, v. 39, n. 5, p. 703-9, May 2001.
- TIBIRIÇÁ, E. *Controle Central da Pressão Arterial In:Fisiopatologia em Medicina Cardiovascular* Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
- TONKISS, J.;TRZCINSKA, M. *et al.* Prenatal malnutrition-induced changes in blood pressure: dissociation of stress and nonstress responses using radiotelemetry. *Hypertension*, v. 32, n. 1, p. 108-14, Jul 1998.
- TORTORA, G. J. e EVANS, R. L. *Principles of Human Physiology.* 2ª Edição. ed.: Ed Harper & Row, 1986. (The Functioning Nerve Cell.).
- TROPIA, F. C.;CARDOSO, L. M. *et al.* Effects of low-protein diet on the baroreflex and Bezold-Jarisch reflex in conscious rats. *Nutr Neurosci*, v. 4, n. 2, p. 99-107, 2001.
- VIJVERBERG, H. P.;PAURON, D. *et al.* The effect of Tityus serrulatus scorpion toxin gamma on Na channels in neuroblastoma cells. *Pflugers Arch*, v. 401, n. 3, p. 297-303, Jul 1984.
- WORLEY, P. F. e BARABAN, J. M. Site of anticonvulsant action on sodium channels: autoradiographic and electrophysiological studies in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, n. 9, p. 3051-5, May 1987.
- YAROM, R. e BRAUN, K. Cardiovascular effects of scorpion venom, morphological changes in the myocardium. *Toxicon*, v. 8, n. 1, p. 41-6, May 1970.

8- APÊNDICES

Tabela 6: Efeito da desnutrição sobre o peso corporal dos ratos (g).

Normonutrido		Desnutrido	
Animal	Peso (g)	Animal	Peso (g)
01	263,0	01	50,00
02	228,0	02	66,00
03	231,5	03	64,50
04	230,0	04	66,00
05	203,0	05	69,50
06	221,5	06	61,00
07	217,0	07	55,00
08	210,0	08	79,00
09	280,0	09	67,00
10	250,0	10	77,00
11	245,0	11	75,00
13	260,0	12	73,00
14	260,0	13	74,50
15	224,5	14	80,00
16	240,0	15	82,00
17	270,0	16	98,00
18	260,0	17	98,50
19	282,0	18	100,00
20	248,0	19	73,00
21	264,0	20	95,00
22	269,0	21	83,00
23	267,0	22	100,00
24	253,5	23	83,50
25	250,0	24	99,00
26	233,0	25	82,00
27	250,0	26	78,50
28	268,0	27	97,00
29	284,0	28	90,00
30	269,0		
31	243,0		
32	243,0		
33	250,0		
34	255,0		
35	230,0		
36	289,0		
37	298,0		
38	230,0		
39	285,0		
40	275,0		
41	300,0		
42	247,0		
43	260,0		
44	252,0		
45	265,0		
Média ± EPM	254±3	Média ± EPM	79± 3 *

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$, Test t - não pareado).

Tabela 7: Efeito da desnutrição sobre o peso cerebral dos ratos (g).

Normonutrido		Desnutrido	
Animal	Peso (g)	Animal	Peso (g)
01	1,21	01	1,17
02	1,28	02	1,21
03	1,15	03	1,11
04	1,25	04	1,11
05	1,30	05	1,19
Média ± EPM	1,24±0,03	Média ± EPM	1,16±0,02

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Test t - não pareado).

Tabela 8: Níveis basais de PAM (mmHg) e FC (bpm) dos grupos Normonutrido e Desnutrido.

Normonutrido			Desnutrido	
Animal	PAM basal (mmHg)	FC basal (bpm)	PAM basal (mmHg)	FC basal (bpm)
01	108,85	371,11	117,02	418,24
02	119,82	383,12	125,71	487,54
03	117,79	423,06	128,89	455,80
04	103,40	356,99	119,53	490,28
05	106,28	341,99	112,05	487,98
06	109,25	381,78	119,37	518,08
07	107,06	433,74	117,23	385,00
08	111,81	353,94	101,69	474,83
09	118,28	390,17	139,35	412,81
10	114,58	351,80	106,54	408,66
11	110,92	444,60	129,07	429,82
12	103,33	405,79	129,93	368,82
13	113,09	351,60	110,58	479,05
Média ± EPM	111±2	384±9	120±3*	448±13*

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Test t - não pareado).

Tabela 9: Níveis de PAM (mmHg) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos e desnutridos pré-tratados com veículo (NV e DV).

Normonutrido Veículo (PAM, em mmHg)					
Animal	VEC	PBS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	135,30	136,94	170,44	192,18	30,15
02	104,38	109,71	167,95	157,35	26,04
03	108,95	111,69	175,81	193,28	93,56
04	126,59	129,02	188,47	188,92	46,55
05	135,33	130,95	182,66	169,48	85,37
06	112,93	108,52	173,85	176,15	62,84
07	128,55	116,09	178,13	179,32	70,39
08	97,14	94,69	163,24	163,60	95,93
09	110,41	106,22	172,93	181,86	33,53
10	105,74	102,92	159,57	156,64	57,64
11	113,92	114,06	157,48	164,98	85,29
12	100,02	98,51	135,59	184,87	69,64
Média ± EPM	115±4	113±4	169±4 #	176±4 #	63±7#
Desnutrido Veículo (PAM, em mmHg)					
Animal	VEC	PBS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	109,91	118,44	131,91	127,27	44,30
02	125,04	121,14	134,40	105,03	59,28
03	105,09	104,56	130,77	133,17	55,67
04	122,71	118,71	143,43	152,21	44,05
05	108,33	106,40	125,24	125,75	111,84
06	132,64	127,96	154,31	170,40	19,71
07	100,39	103,88	137,54	144,98	10,60
08	115,03	121,34	117,69	168,31	84,12
Média ± EPM	115± 4	115±3	134±4*	141±8 *#	54±12#

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e

#; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).

Tabela 10: Níveis de FC (bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos e desnutridos pré-tratados com veículo (NV e DV).

Normonutrido Veículo (FC, em bpm)					
Animal	VEC	PBS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	293,17	307,67	370,61	410,92	277,80
02	358,40	376,40	415,73	380,18	360,10
03	408,37	495,29	400,69	481,06	352,12
04	408,44	453,25	497,49	490,71	345,07
05	383,78	388,64	455,81	447,73	433,61
06	454,57	446,48	475,90	428,82	360,13
07	409,61	358,51	499,96	488,53	386,05
08	338,10	326,58	441,05	454,82	407,14
09	393,35	387,35	481,07	496,00	315,48
10	422,99	401,30	462,82	424,98	413,79
11	342,39	323,73	333,78	368,38	478,15
12	410,62	412,47	411,09	461,15	480,54
Média ± EPM	385±13	390±16	437±15 #	444±12 #	384±18

Desnutrido Veículo (FC, em bpm)					
Animal	VEC	PBS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	411,60	421,14	388,83	409,45	378,03
02	422,28	435,24	291,83	461,42	446,43
03	380,13	384,75	305,80	400,98	379,98
04	455,06	479,19	471,32	482,99	365,38
05	408,89	415,15	398,12	411,37	384,77
06	409,27	433,63	441,01	440,30	426,36
07	459,81	426,43	473,66	490,60	378,60
08	521,47	538,77	438,13	423,42	421,76
Média ± EPM	434±16	442±17	401±25	440±12	397±10

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e #; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).

Tabela 11: Tempo de sobrevivência (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com veículo.

Normonutrido Veículo		Desnutrido Veículo	
Animal	Sobrevida(min)	Animal	Sobrevida (min)
01	12	01	09
02	11	02	24
03	09	03	18
04	09	04	10
05	09	05	15
06	14	06	18
07	09	07	12
08	08	08	16
09	09		
10	09		
11	14		
12	15		
Med:Q1/Q3	9:9/13,5		15,5:10,5/18*

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).

Tabela 12: Níveis de PAM (mmHg) de ratos Normonutridos inoculados com TsTX após o pré-tratamento com veículo (NV) ou com diferentes doses de Carbamazepina (NCBZ50, NCBZ75 e NCBZ100).

Normonutrido Veículo (PAM, em mmHg)			
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1
01	135,30	136,94	170,44
02	104,38	109,71	167,95
03	108,95	111,69	175,81
04	126,59	129,02	188,47
05	135,33	130,95	182,66
06	112,93	108,52	173,85
07	128,55	116,09	178,13
08	97,14	94,69	163,24
09	110,41	106,22	172,93
10	105,74	102,92	159,57
11	113,92	114,06	157,48
12	100,02	98,51	135,59
Média ± EPM	115±4	113±4	169±4 #
Normonutrido CBZ 50 (PAM, em mmHg)			
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1
01	111,29	115,04	162,79
02	116,45	116,87	137,28
03	72,52	79,54	71,05
04	107,06	109,89	146,20
05	94,84	96,20	135,80
06	119,63	102,08	162,93
07	117,82	118,65	155,60
08	106,23	101,22	153,42
Média ± EPM	106±6	105±5	141±11*
Normonutrido CBZ 75 (PAM, em mmHg)			
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1
01	104,68	104,33	172,00
02	114,53	125,27	152,50
03	113,33	114,59	148,91
04	112,30	113,67	113,03
05	125,14	124,52	129,21
Média ± EPM	114±3	117±4	143±10
Normonutrido CBZ 100 (PAM, em mmHg)			
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1
01	107,58	107,54	118,17
02	95,49	95,25	118,69
03	115,72	111,65	106,15
04	116,19	116,21	115,02
05	119,07	119,85	159,61
Média ± EPM	111±4	110±4	124±9*

*; Diferença estatística em relação ao grupo (NV), ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-test de Tukey) e #; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).

Tabela 13: Níveis de FC (bpm) de ratos Normonutridos inoculados com TsTX após o pré-tratamento com veículo (NV) ou com diferentes doses de Carbamazepina (NCBZ50, NCBZ75 e NCBZ100).

Normonutrido Veículo (FC, em bpm)			
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1
01	293,17	307,67	370,61
02	358,40	376,40	415,73
03	408,37	495,29	400,69
04	408,44	453,25	497,49
05	383,78	388,64	455,81
06	454,57	446,48	475,90
07	409,61	358,51	499,96
08	338,10	326,58	441,05
09	393,35	387,35	481,07
10	422,99	401,30	462,82
11	342,39	323,73	333,78
12	410,62	412,47	411,09
Média ± EPM	385±13	390±16	437±15 #
Normonutrido CBZ 50 (FC, em bpm)			
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1
01	260,21	262,83	362,02
02	407,23	414,31	361,90
03	377,52	369,69	378,53
04	397,81	366,29	372,90
05	385,20	386,27	409,60
06	312,38	308,93	417,67
07	384,23	384,99	363,21
08	415,08	410,25	415,93
Média ± EPM	368±19	363±18	385±9
Normonutrido CBZ 75 (FC, em bpm)			
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1
01	288,8	282,78	380,79
02	292,00	322,61	316,00
03	376,56	381,80	444,52
04	295,26	303,61	304,48
05	374,99	368,70	438,06
Média ± EPM	326±21	332±19	377±29
Normonutrido CBZ 100 (FC, em bpm)			
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1
01	259,00	260,47	299,08
02	249,27	250,64	298,49
03	368,69	364,81	321,14
04	296,26	296,28	294,18
05	262,65	283,63	313,08
Média ± EPM	287±22*	291±20*	305±5*

*; Diferença estatística em relação ao grupo (NV), (p<0,05; Anova one-way , pós-test de Tukey) e #; Diferença estatística intra-grupo (p<0,05; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).

Tabela 14: Tempo de sobrevivência (min) após injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos após o pré-tratamento com veículo (NV) ou com diferentes doses de CBZ (NCBZ50, 75 e 100).

NV		NCBZ50		NCBZ75		NCBZ100	
Animal	Sobrevivência (min)	Animal	Sobrevivência (min)	Animal	Sobrevivência (min)	Animal	Sobrevivência (min)
01	12	01	24	01	26	01	60
02	11	02	29	02	28	02	60
03	09	03	60	03	21	03	60
04	09	04	25	04	60	04	60
05	09	05	15	05	60	05	43
06	14	06	12				
07	09	07	28				
08	08	08	24				
09	09						
10	09						
11	14						
12	15						
Med:Q1/Q3	9:9/13,5	24,5:17,3/28,8*		28:23,5/60*		60:51,5/60*°	

*; Diferença estatística em relação ao grupo (NV); °; Diferença estatística em relação ao grupo (NCBZ50); (p<0,05; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).

Tabela 15: Níveis de PAM (mmHg) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos pré-tratados com veículo (NV) ou com Carbamazepina na dose de 50mg/Kg (NCBZ).

Normonutrido Veículo (PAM em mmHg)					
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	135,30	136,94	170,44	192,18	30,15
02	104,38	109,71	167,95	157,35	26,04
03	108,95	111,69	175,81	193,28	93,56
04	126,59	129,02	188,47	188,92	46,55
05	135,33	130,95	182,66	169,48	85,37
06	112,93	108,52	173,85	176,15	62,84
07	128,55	116,09	178,13	179,32	70,39
08	97,14	94,69	163,24	163,60	95,93
09	110,41	106,22	172,93	181,86	33,53
10	105,74	102,92	159,57	156,64	57,64
11	113,92	114,06	157,48	164,98	85,29
12	100,02	98,51	135,59	184,87	69,64
Média ± EPM	115±4	113±4	169±4 #	176±4 #	63±7#
Normonutrido CBZ (PAM, em mmHg)					
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	111,29	115,04	162,79	169,45	32,32
02	116,45	116,87	137,28	198,40	60,84
03	72,52	79,54	71,05	109,26	120,85
04	107,06	109,89	146,20	177,90	29,33
05	94,84	96,20	135,80	173,52	102,90
06	119,63	102,08	162,93	157,77	47,73
07	117,82	118,65	155,60	168,98	110,57
08	106,23	101,22	153,42	153,05	49,32
Média ± EPM	106±6	105±5	141±11*	164±9	69±13

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e

#; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).

Tabela 16: Níveis de FC (bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos normonutridos pré-tratados com veículo (NV) ou com Carbamazepina na dose de 50mg/Kg (NCBZ).

Normonutrido Veículo (FC, em bpm)					
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	293,17	307,67	370,61	410,92	277,80
02	358,40	376,40	415,73	380,18	360,10
03	408,37	495,29	400,69	481,06	352,12
04	408,44	453,25	497,49	490,71	345,07
05	383,78	388,64	455,81	447,73	433,61
06	454,57	446,48	475,90	428,82	360,13
07	409,61	358,51	499,96	488,53	386,05
08	338,10	326,58	441,05	454,82	407,14
09	393,35	387,35	481,07	496,00	315,48
10	422,99	401,30	462,82	424,98	413,79
11	342,39	323,73	333,78	368,38	478,15
12	410,62	412,47	411,09	461,15	480,54
Média ± EPM	385±13	390±16	437±15 #	444±12 #	384±18
Normonutrido CBZ (FC, em bpm)					
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	260,21	262,83	362,02	436,63	419,67
02	407,23	414,31	361,90	449,62	458,92
03	377,52	369,69	378,53	384,09	379,27
04	397,81	366,29	372,90	468,81	397,33
05	385,20	386,27	409,60	486,97	449,28
06	312,38	308,93	417,67	486,06	372,97
07	384,23	384,99	363,21	462,16	421,72
08	415,08	410,25	415,93	436,14	429,90
Média ± EPM	368±19	363±18	385±9	451±12	416±11

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e #; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).

Tabela 17: Níveis de PAM (mmHg) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos desnutridos pré-tratados com veículo (DV) ou com Carbamazepina na dose de 50mg/kg (DCBZ).

Desnutrido Veículo (PAM, em mmHg)					
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	109,91	118,44	131,91	127,27	44,30
02	125,04	121,14	134,40	105,03	59,28
03	105,09	104,56	130,77	133,17	55,67
04	122,71	118,71	143,43	152,21	44,05
05	108,33	106,40	125,24	125,75	111,84
06	132,64	127,96	154,31	170,40	19,71
07	100,39	103,88	137,54	144,98	10,60
08	115,03	121,34	117,69	168,31	84,12
Média ± EPM	115± 4	115±3	134±4	141±8 #	54±12#
Desnutrido CBZ (PAM, em mmHg)					
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	136,95	135,38	163,22	156,52	32,76
02	108,90	108,66	161,05	150,47	66,91
03	129,18	129,49	165,58	167,99	30,55
04	119,19	119,96	171,27	173,45	71,89
05	103,97	103,45	127,13	165,06	67,39
Média ± EPM	120 ±6	119 ±6	158 ±8	163 ±4	54 ±9

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e #; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).

Tabela 18: Níveis de FC (bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos desnutridos pré-tratados com veículo (DV) ou com Carbamazepina na dose de 50mg/kg (DCBZ).

Desnutrido Veículo (FC, em bpm)					
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	411,60	421,14	388,83	409,45	378,03
02	422,28	435,24	291,83	461,42	446,43
03	380,13	384,75	305,80	400,98	379,98
04	455,06	479,19	471,32	482,99	365,38
05	408,89	415,15	398,12	411,37	384,77
06	409,27	433,63	441,01	440,30	426,36
07	459,81	426,43	473,66	490,60	378,60
08	521,47	538,77	438,13	423,42	421,76
Média ± EPM	434±16	442±17	401±25	440±12	397±10
Desnutrido CBZ (FC, em bpm)					
Animal	VEC/CBZ	PBS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	361,69	336,89	340,46	424,25	353,80
02	494,92	458,66	517,70	482,41	394,16
03	388,30	419,48	475,14	523,70	346,13
04	455,91	490,10	492,51	445,47	347,56
05	465,12	499,88	460,14	527,61	430,77
Média ± EPM	433±25	441±30	457±31	481±21	3754±17

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way, pós-teste de Bonferroni) e #; Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova one-way, pós-teste de Dunnetts).

Tabela 19: Tempo de sobrevida (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV, DV) ou com Carbamazepina na dose de 50mg/kg (NCBZ, DCBZ).

NV		NCBZ		DV		DCBZ	
Animal	Sobrevida (min)	Animal	Sobrevida (min)	Animal	Sobrevida (min)	Animal	Sobrevida (min)
01	12	01	24	01	09	01	30
02	11	02	29	02	24	02	20
03	09	03	60	03	18	03	11
04	09	04	25	04	10	04	9
05	09	05	15	05	15	05	18
06	14	06	12	06	18		
07	09	07	28	07	12		
08	08	08	24	08	16		
09	09						
10	09						
11	14						
12	15						
Med: Q1/Q3 9:9/13,5		24,5:17,3/28,8*		15,5:10,5/18*		18:10/25	

*; Diferença estatística em relação ao grupo (NV), ($p < 0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).

Tabela 20: Níveis de PAM (mmHg) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Prazosin (NP,DP).

Normonutrido Prazosin (PAM, em mmHg)						
Animal	Basal	PBS	PZS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	108,85	111,67	100,64	152,55	170,96	69,13
02	119,82	121,40	97,10	147,22	184,01	69,66
03	117,79	118,54	101,04	139,06	179,63	68,38
04	103,40	108,85	93,79	163,49	161,75	41,15
05	106,28	109,23	91,20	163,83	165,25	57,80
06	109,25	117,54	99,53	145,87	183,64	32,21
07	107,06	103,45	95,22	134,48	144,65	39,46
Média ± EPM	110 ± 2	113 ± 2	97 ± 1#	150 ± 4#	170 ± 5#	54 ± 6#
Desnutrido Prazosin (PAM, em mmHg)						
Animal	Basal	PBS	PZS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	117,02	117,35	94,15	127,56	135,47	26,08
02	125,71	129,46	104,28	164,03	117,42	64,70
03	128,89	128,36	104,43	109,07	172,46	43,30
04	119,53	109,41	99,07	122,61	133,05	60,00
05	112,05	104,98	97,58	141,40	137,36	15,42
06	119,37	120,76	105,08	164,18	158,60	39,86
07	117,23	115,40	101,78	105,90	130,34	24,94
Média ± EPM	120 ± 2*	118 ± 3	101 ± 2**#	134 ± 9	141 ± 7*#	39 ± 7#

**; Diferença estatística entre os grupos no período PZS ($p < 0,05$; Teste t- não pareado);

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni);

#, Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova One-way, pós-teste de Dunnett).

Tabela 21: Níveis de PAM(mmHg) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV, DV) e com Prazosin (NP,DP).

Normonutrído Veículo (PAM, em mmHg)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	170,44	192,18	30,15
02	167,95	157,35	26,04
03	175,81	193,28	93,56
04	188,47	188,92	46,55
05	182,66	169,48	85,37
06	173,85	176,15	62,84
07	178,13	179,32	70,39
08	163,24	163,60	95,93
09	172,93	181,86	33,53
10	159,57	156,64	57,64
11	157,48	164,98	85,29
12	135,59	184,87	69,64
Média ± EPM	169±4	176±4	63±7
Desnutrido Veículo (PAM, em mmHg)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	131,91	127,27	44,30
02	134,40	105,03	59,28
03	130,77	133,17	55,67
04	143,43	152,21	44,05
05	125,24	125,75	111,84
06	154,31	170,40	19,71
07	137,54	144,98	10,60
08	117,69	168,31	84,12
Média ± EPM	134±4	141±8	54±12
Normonutrído Prazosin (PAM, em mmHg)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	152,55	170,96	69,13
02	147,22	184,01	69,66
03	139,06	179,63	68,38
04	163,49	161,75	41,15
05	163,83	165,25	57,80
06	145,87	183,64	32,21
07	134,48	144,65	39,46
Média ± EPM	150±4	170±5	54±6
Desnutrido Prazosin (PAM, em mmHg)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	127,56	135,47	26,08
02	164,03	117,42	64,70
03	109,07	172,46	43,30
04	122,61	133,05	60,00
05	141,40	137,36	15,42
06	164,18	158,60	39,86
07	105,90	130,34	24,94
Média ± EPM	134±9	141±7	39±7

*; Diferença estatística entre os grupos (p<0,05; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni).

Tabela 22: Níveis de FC(bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Prazosin (NP,DP).

Normonutrido Prazosin (FC, em bpm)						
Animal	Basal	PBS	PZS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	371,11	401,55	410,21	384,24	395,41	434,07
02	383,12	351,72	452,55	425,40	442,91	370,11
03	423,06	367,97	485,87	329,25	390,23	390,48
04	356,99	362,35	426,54	453,62	432,77	318,16
05	341,99	387,43	379,98	415,57	435,80	310,40
06	381,78	442,14	427,80	373,31	462,40	378,33
07	433,74	392,74	439,13	410,09	402,94	427,56
Média ± EPM	385±13	387±11	432±13#	399±15	423±10	376±18
Desnutrido Prazosin (FC, em bpm)						
Animal	Basal	PBS	PZS	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	418,24	415,73	537,60	424,56	417,94	323,41
02	487,54	497,85	548,55	444,89	389,88	349,00
03	455,80	512,15	464,59	413,32	402,35	397,37
04	490,28	501,81	523,48	496,00	485,23	306,68
05	487,98	500,34	511,37	483,06	547,43	357,34
06	518,08	576,56	549,96	497,29	453,09	387,68
07	385,00	377,91	380,33	385,29	390,78	406,78
Média ± EPM	463±18*	483±35	502±23*	449±17	441±22	361±14#

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni);

#, Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova One-way, pós-teste de Dunnett).

Tabela 23: Níveis de FC(bpm) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV, DV) e com Prazosin (NP,DP).

Normonutrido Veículo (FC, em bpm)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	370,61	410,92	277,80
02	415,73	380,18	360,10
03	400,69	481,06	352,12
04	497,49	490,71	345,07
05	455,81	447,73	433,61
06	475,90	428,82	360,13
07	499,96	488,53	386,05
08	441,05	454,82	407,14
09	481,07	496,00	315,48
10	462,82	424,98	413,79
11	333,78	368,38	478,15
12	411,09	461,15	480,54
Média ± EPM	437±15	444±12	384±18
Desnutrido Veículo (FC, em bpm)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	388,83	409,45	378,03
02	291,83	461,42	446,43
03	305,80	400,98	379,98
04	471,32	482,99	365,38
05	398,12	411,37	384,77
06	441,01	440,30	426,36
07	473,66	490,60	378,60
08	438,13	423,42	421,76
Média ± EPM	401±25	440±12	397±10
Normonutrido Prazosin (FC, em bpm)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	384,24	395,41	434,07
02	425,40	442,91	370,11
03	329,25	390,23	390,48
04	453,62	432,77	318,16
05	415,57	435,80	310,40
06	373,31	462,40	378,33
07	410,09	402,94	427,56
Média ± EPM	399±15	423±10	376±18
Desnutrido Prazosin (FC, em bpm)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	424,56	417,94	323,41
02	444,89	389,88	349,00
03	413,32	402,35	397,37
04	496,00	485,23	306,68
05	483,06	547,43	357,34
06	497,29	453,09	387,68
07	385,29	390,78	406,78
Média ± EPM	449±17	441±22	361±14

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni).

Tabela 24: Tempo de sobrevida (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV,DV) ou Prazosin (NP, DP).

NV		NP		DV		DP	
Animal	Sobrevida (min)	Animal	Sobrevida (min)	Animal	Sobrevida (min)	Animal	Sobrevida (min)
01	12	01	09	01	09	01	18
02	11	02	16	02	24	02	11
03	09	03	14	03	18	03	26
04	09	04	11	04	10	04	12
05	09	05	8	05	15	05	13
06	14	06	13	06	18	06	11
07	09	07	12	07	12	07	25
08	08			08	16		
09	09						
10	09						
11	14						
12	15						
Med:Q1/Q3 9:9/13,5		12: 9/14		15,5:10,5/18*		13:11/25	

*; Diferença estatística em relação ao grupo (NV), ($p < 0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).

Tabela 25: Níveis de PAM (mmHg) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Metil-atropina (NM,DM).

Normonutrido Metil (PAM, em mmHg)						
Animal	Basal	PBS	Atropina	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	111,81	109,36	114,55	172,36	190,52	61,92
02	118,28	118,56	129,41	132,95	187,03	42,22
03	114,58	108,17	107,99	178,49	187,55	70,15
04	110,92	109,74	113,99	180,87	181,12	71,92
05	103,33	108,40	105,14	178,90	184,58	61,92
06	113,09	120,87	112,90	189,06	190,59	72,71
Média ± EPM	112±2	113±2	114±3	172±8#	187±1#	63±5#
Desnutrido Metil (PAM, em mmHg)						
Animal	Basal	PBS	Atropina	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	101,69	100,88	101,98	158,92	180,01	54,90
02	139,35	134,74	128,96	138,90	181,32	60,19
03	106,54	108,56	105,49	133,87	155,99	46,38
04	129,07	126,26	121,29	149,75	157,26	62,68
05	129,93	134,40	129,00	179,16	161,13	48,00
06	110,58	108,93	115,79	165,46	162,12	55,51
Média ± EPM	120±6	119±6	117±5	154±7#	166±5#	55±3#

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$, Anova two-way; Pós teste de Bonferroni);

#, Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$, Anova One-way; pós-teste de Dunnett).

Tabela 26: Níveis de PAM(mmHg) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV, DV) e com Metil-atropina (NM,DM).

Normonutrído Veículo (PAM, em mmHg)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	170,44	192,18	30,15
02	167,95	157,35	26,04
03	175,81	193,28	93,56
04	188,47	188,92	46,55
05	182,66	169,48	85,37
06	173,85	176,15	62,84
07	178,13	179,32	70,39
08	163,24	163,60	95,93
09	172,93	181,86	33,53
10	159,57	156,64	57,64
11	157,48	164,98	85,29
12	135,59	184,87	69,64
Média ± EPM	169±4	176±4	63±7
Desnutrido Veículo (PAM, em mmHg)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	131,91	127,27	44,30
02	134,40	105,03	59,28
03	130,77	133,17	55,67
04	143,43	152,21	44,05
05	125,24	125,75	111,84
06	154,31	170,40	19,71
07	137,54	144,98	10,60
08	117,69	168,31	84,12
Média ± EPM	134±4	141±8	54±12
Normonutrído Metil (PAM, em mmHg)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	172,36	190,52	61,92
02	132,95	187,03	42,22
03	178,49	187,55	70,15
04	180,87	181,12	71,92
05	178,90	184,58	61,92
06	189,06	190,59	72,71
Média ± EPM	172±8	187±1	63±5
Desnutrido Metil (PAM, em mmHg)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	158,92	180,01	54,90
02	138,90	181,32	60,19
03	133,87	155,99	46,38
04	149,75	157,26	62,68
05	179,16	161,13	48,00
06	165,46	162,12	55,51
Média ± EPM	154±7	166±5*	55±3

*; Diferença estatística entre os grupos Desnutrido Veículo e Desnutrido Metil ($p < 0,05$, Anova two-way; Pós teste de Bonferroni).

Tabela 27: Níveis de FC(bpm) antes e após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Metil-atropina (NM,DM).

Normonutrido Metil (FC, em bpm)						
Animal	Basal	PBS	Atropina	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	353,94	417,71	427,47	513,56	508,64	434,43
02	390,17	401,31	375,55	349,96	411,65	488,61
03	351,80	360,84	429,75	544,00	504,19	448,41
04	444,60	488,51	498,63	536,91	536,84	410,21
05	405,79	417,04	434,42	538,83	394,40	437,42
06	351,60	376,39	443,12	520,37	522,28	393,17
Média ± EPM	383±15	410±18	435±16#	501±31 #	480±25#	435±13#

Desnutrido Metil (FC, em bpm)						
Animal	Basal	PBS	Atropina	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	474,83	490,06	515,05	500,33	512,40	387,20
02	412,81	419,87	413,40	433,09	447,12	431,74
03	408,66	421,15	440,67	449,23	444,92	391,07
04	429,82	439,62	532,28	554,21	550,97	490,29
05	368,82	592,63	497,21	526,54	520,28	410,93
06	479,05	515,97	545,67	591,21	585,19	417,48
Média ± EPM	429±17	480±28	491±22	509±25#	510±23#	422±15

*; Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Anova two-way; Pós teste de Bonferroni);

#, Diferença estatística intra-grupo ($p < 0,05$; Anova One-way, pós-teste de Dunnett).

Tabela 28: Níveis de FC (bpm) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV, DV) e com Metil-atropina (NM,DM).

Normonutrído Veículo (FC, em bpm)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	370,61	410,92	277,80
02	415,73	380,18	360,10
03	400,69	481,06	352,12
04	497,49	490,71	345,07
05	455,81	447,73	433,61
06	475,90	428,82	360,13
07	499,96	488,53	386,05
08	441,05	454,82	407,14
09	481,07	496,00	315,48
10	462,82	424,98	413,79
11	333,78	368,38	478,15
12	411,09	461,15	480,54
Média ± EPM	437±15	444±12	384±18
Desnutrido Veículo (FC, em bpm)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	388,83	409,45	378,03
02	291,83	461,42	446,43
03	305,80	400,98	379,98
04	471,32	482,99	365,38
05	398,12	411,37	384,77
06	441,01	440,30	426,36
07	473,66	490,60	378,60
08	438,13	423,42	421,76
Média ± EPM	401±25	440±12	397±10
Normonutrído Metil (FC, em bpm)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	513,56	508,64	434,43
02	349,96	411,65	488,61
03	544,00	504,19	448,41
04	536,91	536,84	410,21
05	538,83	394,40	437,42
06	520,37	522,28	393,17
Média ± EPM	501±31	480±25	435±13
Desnutrido Metil (FC, em bpm)			
Animal	TsTX1	TsTX2	TsTX3
01	500,33	512,40	387,20
02	433,09	447,12	431,74
03	449,23	444,92	391,07
04	554,21	550,97	490,29
05	526,54	520,28	410,93
06	591,21	585,19	417,48
Média ± EPM	509±25*	510±23*	422±15

*; Diferença estatística entre os grupos Desnutrido Veículo e Desnutrido Metil (p<0,05, Anova two-way; Pós teste de Bonferroni).

Tabela 29: Tempo de sobrevivência (min) após a injeção i.c.v. de TsTX em ratos Normonutridos e Desnutridos pré-tratados com Veículo (NV,DV) ou Metilatropina (NM, DM).

NV		NM		DV		DM	
Animal	Sobrevida (min)	Animal	Sobrevida (min)	Animal	Sobrevida (min)	Animal	Sobrevida (min)
01	12	01	16	01	09	01	12
02	11	02	19,5	02	24	02	18
03	09	03	09	03	18	03	22
04	09	04	08	04	10	04	16
05	09	05	08	05	15	05	17
06	14	06	08	06	18	06	12
07	09			07	12		
08	08			08	16		
09	09						
10	09						
11	14						
12	15						
Med:Q1/Q3 9:9/13,5		8,5:8/16,9		15,5: 10,5/18*		16,5:12/19	

*; Diferença estatística em relação ao grupo (NV), ($p < 0,05$; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas).

9- PRODUÇÃO CIENTÍFICA

9.1- Resumos publicados em Congressos Nacionais

SILVA, F. C. S. ; RIBEIRO, M.F. ; Guidine, P. A. ; CHIANCA-JR, D.A . Respostas Cardiovasculares à microinjeção de toxina escorpiônica (TsTX) após o bloqueio do Sistema Nervoso Autônomo em ratos submetidos à desnutrição protéica. In: XV Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2011, São Paulo. Anais do Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2011.

RIBEIRO, M.F. ; SILVA, F. C. S. ; Guidine, P. A. ; CHIANCA-JR, D.A . Efeito dose-dependente da Carbamazepina sobre as manifestações cardiovasculares promovidas pela Tityustoxina em ratos Fischer. In: XV Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2011, São Paulo. Apresentação Oral. Anais do Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2011.

SILVA, F. C. S. ; Guidine, P. A. ; Chianca- Jr, D.A.. . Comprometimento do Sistema Cardiovascular após a microinjeção da toxina escorpiônica (TsTX) em ratos. In: XIV Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2010, Araraquara. Anais do Simposio Brasileiro de Fisiologia cardiovascular, 2010.

RIBEIRO, M.F. ; SILVA, F. C. S. ; CHIANCA-JR, D.A . Participação do Sistema Nervoso Simpático sobre as alterações cardiovasculares desencadeadas pela toxina escorpiônica (TsTX).. In: Simpósio de Iniciação Científica - UFOP, 2010, Ouro Preto. Anais do Simpósio de Iniciação Científica- SIC, 2010.

SILVA, F. C. S. ; RIBEIRO, M.F. ; SILVA, M.E. ; Guidine, P. A. ; CHIANCA-JR, D.A . Changes in heart rate and mean arterial pressure elicited by central action of Tityustoxin (TSTX) in protein undernourished rats. In: XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2010, Águas de Lindóia. XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2010.

SILVA, F. C. S. ; CARDOSO, L, M, ; MORAES, M. F. D ; SILVA, M.E. ; FERNANDES L.G. ; CHIANCA-JR, D.A . Ação da microinjeção da toxina escorpiônica (TsTX) sobre a modulação autonômica cardiovascular e uma possível atuação protetora da carbamazepina em ratos desnutridos. In: XIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2009, Ouro Preto. Anais do XIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2009.

SILVA, F. C. S. ; SOUZA, A. M. A. de ; MORAES, M. F. D ; SILVA, M.E. ; FERNANDES L.G. ; CHIANCA-JR, D.A . Ação da Microinjeção da Toxina escorpiônica (TsTX) sobre a modulação autonômica cardiovascular e a possível atuação da carbamazepina em ratos. In: XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2008, Águas de Lindóia. Anais da XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2008.

SILVA, F. C. S. ; MORAES, M. F. D. ; SILVA, M.E. ; FERNANDES L.G. ; CHIANCA-JR, D.A . Alterações autonômicas cardiovasculares decorrentes da microinjeção da toxina escorpiônica (TsTX) e uma possível ação protetora da carbamazepina em ratos. In: XII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2008, Vitória. Anais do XII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2008.

SILVA, F. C. S. ; CARDOSO, L, M, ; MORES, M. F. D ; SILVA, M.E. ; FERNANDES L.G. ; CHIANCA-JR, D.A . Microinjeções da toxina escorpiônica (TsTX) sobre a modulação autonômica cardiovascular e uma possível proteção da carbamazepina em ratos desnutridos. In: Apresentação Oral. XVI Seminário de Iniciação Científica da UFOP, 2008, Ouro Preto. Anais do Seminário de Iniciação Científica da UFOP, 2008.

RODRIGUES, F. A ; MARTINS, C. D. D. ; SILVA, F. C. S. ; MOURA Jr, M. R. ; MORAES, M. F. D. ; SILVA, M.E. ; FERNANDES L.G. ; CHIANCA-JR, D.A . Resposta pressora à microinjeção de L-glutamato no RVLM de ratos submetidos à desnutrição protéica. In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2007, Águas de Lindóia. Anais da XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2007.

GOMIDE, J. M. C. ; SEIXAS, C. M. R. ; SILVA, F. C. S. ; SILVA, M.E. ; PEDROSA, M. L. ; MORAES, M. F. D. ; FERNANDES L.G. ; CHIANCA-JR, D.A . Participação do Sistema Renina Angiotensina na gênese da elevação da pressão arterial de ratos submetidos a uma desnutrição proteica. In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2007, Águas de Lindóia. Anais do XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2007.

9.2- Resumos publicados em Congressos Internacionais

CHIANCA-JR, D.A ; SILVA, F. C. S. ; RIBEIRO, M.F. ; SILVA, M.E. ; CARDOSO, L, M, ; FERNANDES L.G. ; Guidine, P. A. . Central effect of tityustoxin on mean arterial pressure, heart rate and survival of undernourished rats. In: 40 th Neuroscience Annual Meeting, 2010, San Diego. Neuroscience Annual Meeting Publications, 2010.

GOMIDE, J. M. C. ; FERNANDES, L.G. ; SILVA, F. C. S. ; SILVA, M.E. ; CARDOSO, L, M, ; MASSENSINI, A.R. ; MORAES, M. F. D. ; CHIANCA-JR, D.A . Blood pressure in low protein diet rats is highly dependent on renin-angiotensin system. In: Physiology2009, 2009, Dublin. The Physiological Society, 2009., 2009. p. 10-10.