

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Participação do Hipotálamo Dorsomedial nas  
Respostas Cardiovasculares Promovidas pela  
Injeção Intracerebroventricular da Tityustoxina  
Escorpiônica em Ratos**

**Fernanda Cacilda dos Santos Silva**

**Ouro Preto  
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

# **Participação do Hipotálamo Dorsomedial nas Respostas Cardiovasculares Promovidas pela Injeção Intracerebroventricular da Tityustoxina Escorpiônica em Ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

**Fernanda Cacilda dos Santos Silva**

Orientador: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca-Jr  
Laboratório de Fisiologia Cardiovascular/UFOP

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Alves Maia Guidine  
Núcleo de Neurociências/UFMG

Ouro Preto  
Outubro de 2014

5586p

Silva, Fernanda Cacilda dos Santos.

Participação do hipotálamo dorsomedial nas respostas cardiovasculares promovidas pela injeção intracerebroventricular da tityustoxina escorpiônica em ratos [manuscrito] / Fernanda Cacilda dos Santos Silva. - 2014.

82f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Deoclécio Alves Chianca Júnior.

Coorientador: Patrícia Alves Maia Guidine.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Escorpião - Toxinas. 2. Sistema nervoso central. 3. Hipotálamo. 4. Sistema cardiovascular. I. Chianca Júnior, Deoclécio Alves. II. Guidine, Patrícia Alves Maia. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.12-008.3:61

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



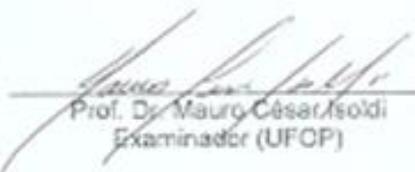
**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:**

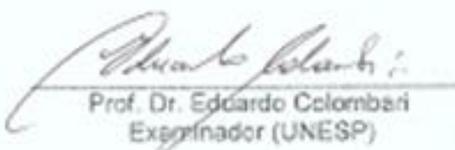
**"Participação do hipotálamo dorsomedial nas respostas cardiovasculares promovidas pela injeção intracerebroventricular da Tityustoxina escorpionica em ratos"**

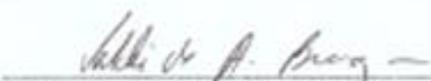
Aos vinte e quatro dias do mês de outubro de 2014, às 13:30h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna **Fernanda Cacilda dos Santos Silva**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição 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.

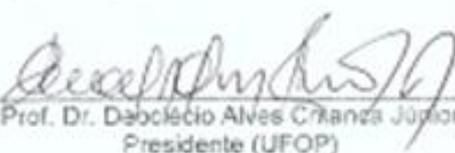
Membros da Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. Frank Silva Bezerra  
Examinador (UFOP)

  
Prof. Dr. Mauro César Földi  
Examinador (UFOP)

  
Prof. Dr. Eddardo Colombari  
Examinador (UNESP)

  
Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga  
Examinador (UFPB)

  
Prof. Dr. Dacilécio Alves Cruz Junior  
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 24/10/2014



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
NUPEB - ICEB II - sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto  
Campus Universitário Nipo do Craveiro | CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Tel: 55 (31) 3578 1043 | E-mail: nupeb@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/2404

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular**/ Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com o auxílio financeiro da *CAPES, CNPQ e UFOP*.

*“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”*

*“Não é no silêncio que os homens se fazem, mas na palavra, no trabalho, na ação-reflexão.”*

*“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”*

*(Paulo Freire)*

*“O impossível não é um fato: é uma opinião!”*

*(Mário Sérgio Cortella)*

# *Dedicatória*

*À minha mãe Cristina e ao meu irmão Rodrigo,  
meus maiores exemplos de vida, sabedoria e amor,  
os grandes incentivadores de todos os meus sonhos.*

# *Agradecimentos*

*A Deus por me conceder a possibilidade da existência, além de me abençoar e encorajar em todos os momentos, dos mais difíceis aos mais ditosos...*

*À minha amada mãe Cristina Constança dos Santos, pelo amor, amizade, caridade e indulgência, sempre incondicionais.*

*Aos meus queridos irmãos Rodrigo Silva e Tatiele Santos, pelo constante desvelo, incentivo e amor.*

*Aos meus sobrinhos Gregory Santos e Vívian Valentina Santos, por serem uma inesgotável fonte de inspiração para que eu me torne um ser humano melhor a cada dia.*

*Às primas Janaína Santos, Bruna Ladeira e Carine Santos por sempre se fazerem presentes e serem tão especiais!*

*Ao Jeronimo Ferreira Júnior, pelo cuidado, amor, amizade, dedicação e compreensão.*

*À Família Doce Mistura, meu refúgio em Ouro Preto, pelos memoráveis momentos felizes e repletos de carinho. Especialmente, à amiga-irmã, Raquel Lana, com quem também compartilhei os anseios e júbilos do exercício científico.*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior (Déo), por me iniciar na carreira científica com tamanha paciência e competência. Por, incontestavelmente, acreditar em meu potencial, mas, sobretudo, pela amizade e estímulo, no que tange a vida profissional e pessoal. Muito obrigada por toda oportunidade oferecida durante estes 8 anos de convivência.*

*À Profa. Dra. Patrícia Alves Maia Guidine (Pat), por me co-orientar, desde o mestrado, com tanta doçura, dedicação, honradez e entusiasmo.*

*Ao Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, pelos nobres ensinamentos e generoso auxílio ao longo desta jornada.*

*Aos queridos técnicos Milton Alexandre de Paula, Marly de Lourdes Ferreira Lessa e Luiz Nicolau dos Reis, que me forneceram o indispensável para a realização do meu trabalho. Pela dedicação, carinho, simplicidade e alegria com que conduziram seu ofício de cuidar dos animais.*

*Aos “velhos” e “novos” companheiros do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFOP, que nesses 8 anos, tanto me ensinaram. Em especial às amigas: Arlete Penitente, Fabiana Rodrigues, Joelma Gomide e Vanessa Bezerra, que alegre e gentilmente me receberam e instruíram.*

*Aos funcionários do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, em especial: Érika Cristina Oliveira Siqueira, Lílian dos Reis Fernandes Praça e Lorena Fagundes Coelho, pelo carinho, atenção e dedicação constantes no cuidado e fornecimento dos animais.*

*Aos Professores da banca examinadora da Tese e da qualificação: Prof. Dr. Eduardo Colombari, Prof. Dr. Valdir Braga, Prof. Dr. Mauro Isoldi, Prof. Dr. Frank Bezerra, Prof. Dr. Márcio Moraes, Prof. Dr. Marco Fontes e Profa. Dra. Lisandra Brandino, por investirem seu valioso tempo na análise deste trabalho e oferecerem sua fundamental contribuição intelectual para a conclusão do mesmo.*

*Ao Prof. MSc. Allan Cristian Gonçalves, meu primeiro Mestre em Fisiologia, pela generosa amizade e por ter semeado o encanto desta linda Ciência.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier e à Dra. Danielle Ianzer, pela assistência constante na ação de fazer ciência com racionalidade, otimismo e alegria. Por terem me proporcionado o inimaginável: a sorte de “tocar os sapatos de ouro de John Harvard”, e, sobretudo, pela valiosa amizade.*

*Ao Prof. Dr. Marco Antônio Fontes e a MSc. Fernanda Marins pela colaboração e por terem me recebido tão bem no Laboratório de Hipertensão da UFMG.*

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

*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.*

*Às Profa. Dras. Renata Guerra e Míriam de Souza, pela generosidade e prontidão em me auxiliar.*

*Aos funcionários do NUPEB, pela paciência e dedicação. Em especial ao Gabriel Souza, por tornar o NUPEB um ambiente descontraído, sem comprometer a seriedade e competência do seu ofício.*

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

*Ao José Luiz Marques Rocha, pela amizade e por se fazer presente, mesmo estando longe. Por me auxiliar e torcer por mim, desde a graduação.*

*Ao Iury Moreira, pela amizade, incentivo e colo nos momentos mais difíceis.*

*À Joyce Ferreira da Costa Guerra pela feliz parceria desde a seleção do mestrado, e, principalmente, pela amizade e solidariedade nos momentos de estudo, esforço e insegurança.*

*À Natália Machado, pela amizade, lealdade, carinho, além da “co-autoria” na realização de muitos sonhos! From Republican Dream in "Neverland" to Harvard Medical School Dream in "Samuel Adams Land."*

*Aos Profs. da Escola de Nutrição, pelos ensinamentos ao longo da graduação e durante o tempo em que tive o prazer de, além de ser discípula, compartilhar o prazeroso ofício da docência. Em especial: ao Prof. Aureliano Cunha e às Profas. Margarete Nimer, Simone Cunha, Ana Carolina Volpe, Helena Dória, Margarete Santos e Ana Lúcia Reges.*

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

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

*Aos dolorosos dias, em que nada deu certo, cuja única saída foi prosseguir e aprender por meio da superação...*

*A todos e a tudo que contribuiu para minha formação moral e acadêmico-científica...*

## RESUMO

A síndrome do envenenamento escorpionico é considerada um importante problema de saúde pública, em países tropicais, devido a sua elevada incidência e potencial gravidade dos sintomas, principalmente em crianças. Alguns estudos apontam a grande sensibilidade do sistema nervoso central (SNC) à ação dos componentes tóxicos do veneno e comprovam que as manifestações cardiorespiratórias, consideradas as principais *causa mortis* do envenenamento, são decorrentes da ativação do sistema nervoso autônomo, sobretudo, da subdivisão simpática. Entretanto, a origem desta modulação permanece desconhecida. Considerando a importante participação do SNC na gênese das repostas hemodinâmicas e cardíacas evocadas pela ação central da Tityustoxina (TsTX, uma  $\alpha$ -toxina extraída do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*) e a semelhança destas repostas àquelas mediadas pelo hipotálamo dorsomedial (HDM) em reações de defesa, o objetivo central deste trabalho foi avaliar a participação do HDM nas repostas cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX em ratos. Para tal, em ratos acordados, avaliamos a influência de injeções i.c.v. de diferentes doses de TsTX (1,74 $\mu$ g; 0,174 $\mu$ g; 0,116 $\mu$ g e 0,087 $\mu$ g) sobre os parâmetros cardiovasculares e sobre a porcentagem de letalidade e o tempo de sobrevivência. Também realizamos a correlação temporal entre estes parâmetros. Em ratos anestesiados, avaliamos a influência da injeção i.c.v. de TsTX (0,116 $\mu$ g) sobre os parâmetros cardiovasculares e sobre a atividade simpática renal, e o envolvimento dos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos ionotrópicos do HDM sobre as alterações cardiovasculares produzidas pela injeção i.c.v. desta dose de TsTX. Dessa forma, nossos principais achados foram: i) a comprovação de uma elevada sensibilidade do SNC à toxicidade exercida pela TsTX; (ii) a relação dose-dependente entre o recrutamento de estruturas encefálicas e o comprometimento cardiovascular (elevação da PAM e FC); (iii) a constatação de uma alta correlação positiva entre a prematuridade das alterações no ritmo cardíaco e a latência para o agravo destas repostas; (iv) uma elevada correlação positiva entre a latência para o agravo das repostas pressora e taquicárdica e o tempo de sobrevivência; (v) o aumento da responsividade do nervo simpático renal e (vi) a fundamental participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos nas repostas hipertensiva e taquicárdica mediadas pela ação central da TsTX. Nossos dados corroboram a hipótese de que o SNC tem uma participação importante na

sintomatologia envolvida no envenenamento escorpiônico e sugerem que os circuitos neurais recrutados pela TsTX, cuja ativação resulta em uma variedade de alterações fisiológicas e comportamentais, dependem da ativação dos diferentes subtipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos presentes no HDM.

## ABSTRACT

The scorpion envenoming syndrome is an important public health problem, in tropical countries, due to its high incidence and potential severity of symptoms, mainly in children. Some studies address the high sensitivity of the central nervous system (CNS) to the action of the venom toxic components and show that the cardiorespiratory manifestations, which are considered the main *causa mortis* of scorpion envenoming, are consequences of the autonomic nervous system activation, especially of the sympathetic pathway. However, the origin of this modulation remains unclear. Considering the important CNS participation on the genesis of the cardiovascular responses evoked by the central action of Tityustoxin (TsTX, a  $\alpha$ -type toxin extracted from the *Tityus serrulatus* scorpion venom), and the similarity of these responses, to those mediated by dorsomedial hypothalamus (DMH) in the cardiovascular responses during defense reaction, the central aim of this work was to evaluate the role of DMH on the cardiovascular responses to TsTX i.c.v. injection in rats. To this end, in awake rats, we evaluated the influence of i.c.v. injections of different TsTX doses (1.74 $\mu$ g; 0.174 $\mu$ g; 0.116 $\mu$ g and 0.087 $\mu$ g) on cardiovascular parameters, on lethality percentage and survival time, and a time correlation between these parameters. In anesthetized rats, we evaluated the influence of TsTX i.c.v. injection (0.116 $\mu$ g) on cardiovascular parameters and renal sympathetic nerve activity, and the involvement of GABA and ionotropic glutamate receptors of HDM on cardiovascular alterations induced by i.c.v. injection of this TsTX dose. Thus, our main findings were: i) the evidence of CNS high sensitivity to TsTX toxicity; (ii) the dose-dependent relationship between brain structures recruitment and the cardiovascular compromise (MAP and HR enhance); (iii) a high positive correlation between prematurity of the changes in heart rate and the latency to the grievance of these responses; (iv) a high positive correlation between latency to the grievance of the pressor and tachycardic responses and survival time; (v) the responsiveness increased of renal sympathetic nerve activity and (vi) the essential participation at glutamate receptors in the hypertensive and tachycardic responses mediated by central action of TsTX. Our data support the hypothesis that CNS plays an important role in the symptomatology of scorpion envenomation and suggest that the central circuit recruited by TsTX, whose activation results in an array of physiological and behavioral changes, depend on the activation of the different subtypes of DMH ionotropic glutamate receptors.

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Escorpionismo.....	21
1.1.1. Epidemiologia.....	21
1.1.2. Quadro Clínico, Classificação e Tratamento.....	21
1.1.3. Principal agente causal: <i>Tityus serrulatus</i> .....	23
1.1.4. Veneno e Toxinas do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> : composição, purificação e mecanismo de ação .....	24
1.1.5. A ação central da TsTX e as manifestações cardiovasculares.....	25
1.2. O Sistema Nervoso Central e a regulação cardiovascular.....	28
1.3. O hipotálamo dorsomedial e o controle cardiovascular nas reações de defesa.....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Modelo Animal.....	32
4.2. Drogas/ soluções utilizadas.....	32
4.3. Procedimentos Cirúrgicos.....	33
4.3.1. Traqueostomia.....	33
4.3.2. Canulação da artéria e veia femorais.....	33
4.3.4. Craniostomia e localização do VLE e do HDM.....	34
4.3.5. Localização e isolamento do nervo renal.....	34
4.4. Histologia.....	35
4.5. Protocolos experimentais.....	36
4.5.1. Protocolo 1- A influência das injeções i.c.v. de diferentes doses doses de TsTX sobre os parâmetros cardiovasculares, a porcentagem de letalidade e o tempo de sobrevida, e a correlação temporal entre estes parâmetros, em ratos.....	36
4.5.2. Protocolo 2- A influência da injeção i.c.v. de TsTX (0,116µg) sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) e a atividade simpática renal em ratos anestesiados.....	38

4.5.3. Protocolo 3- A participação dos receptores GABAérgicos do HDM sobre as respostas cardiocirculatórias decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX (0,116µg), em ratos anestesiados.....	40
4.5.4. Protocolo 4- A influência dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM sobre as respostas cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX (0,116µg) em ratos anestesiados.....	41
5. RESULTADOS .....	43
5.1. Curva dose-efeito da TsTX em ratos acordados.....	43
5.1.1. A influência das injeções i.c.v. de diferentes doses de TsTX sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC).....	43
5.1.2. A influência das injeções i.c.v. de diferentes doses de TsTX sobre a porcentagem e o tempo de sobrevivência.....	47
5.1.3. A correlação entre as latências para o comprometimento hemodinâmico e cardíaco, e o tempo de sobrevivência.....	47
5.2. A influência da injeção i.c.v. de TsTX (0,116µg) sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) e a atividade simpática renal, em ratos anestesiados.....	50
5.3. A participação do HDM nas repostas cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX (0,116µg).....	53
5.3.1. Efeitos da ativação dos receptores GABA <sub>A</sub> do HDM sobre a hipertensão e taquicardia evocadas pela injeção de TsTX.....	53
5.3.2. Efeitos do bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM sobre a hipertensão e taquicardia evocadas pela injeção de TsTX.....	54
5.4. Confirmação dos sítios de microinjeção.....	59
6. DISCUSSÃO.....	60
7. CONCLUSÕES.....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
9. ANEXOS.....	80

## 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..... 24
- Figura 2:** Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação da injeção i.c.v. de diferentes doses de TsTX sobre os parâmetros cardiovasculares, porcentagem de letalidade e tempo de sobrevivência em animais acordados..... 37
- Figura 3:** Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação da injeção i.c.v. de TsTX (0,116µg/1µL) sobre o sistema cardiovascular e sobre a atividade simpática para o nervo renal em ratos anestesiados..... 39
- Figura 4:** Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação da participação dos receptores GABAérgicos do HDM sobre as respostas cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de 0,116µg de TsTX, em ratos anestesiados..... 40
- Figura 5:** Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação da participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM sobre as respostas cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de 0,116µg de TsTX, em ratos anestesiados..... 42
- Figura 6:** (A) Variações nos níveis de Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e (B) frequência cardíaca (FC; bpm) antes e após a injeção i.c.v. de diferentes doses (1,74; 0,174; 0,116 e 0,087µg) de TsTX em ratos acordados..... 45
- Figura 7:** Latência para a primeira variação ( $1^a \Delta$ ) e latência para a variação máxima ( $\Delta$  máx.), ambas medidas em minutos (min), e correlação entre esses dois parâmetros referentes à: (A) pressão arterial média (PAM; mmHg) e (B) frequência cardíaca (FC;bpm), após a injeção i.c.v. de diferentes doses (1,74; 0,174; 0,116 µg) de TsTX em ratos acordados..... 46

**Figura 8:** (A) Porcentagem de sobrevivência (%) em relação ao tempo (min) e (B) porcentagem de letalidade (%) após injeção i.c.v. de diferentes doses de TsTX em ratos acordados..... 48

**Figura 9:** Correlação entre as latências para a primeira alteração ( $1^a \Delta$ ) e para a variação máxima ( $\Delta$  máx.), e o tempo de sobrevivência, referentes à: (A) pressão arterial média (PAM) e (B) frequência cardíaca (FC) após a injeção i.c.v. de diferentes doses (1,74; 0,174; 0,116  $\mu$ g) de TsTX em ratos acordados.....49

**Figura 10:** (A) Níveis de Pressão arterial (PAM; mmHg), (B) de Frequência Cardíaca (FC; bpm) e (C) de Atividade Simpática do nervo renal (RSNA, % do basal) antes e após a injeção i.c.v. de 0,116 $\mu$ g de TsTX em ratos anestesiados com uretana.....52

**Figura 11:** Efeito da ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> do HDM sobre as respostas cardiovasculares evocadas pela injeção i.c.v. de TsTX em ratos anestesiados com uretana. (A) Pressão arterial média (PAM, mmHg) and (B) Frequência cardíaca (FC, bpm) após a injeção bilateral de PBS (100nL) ou muscimol (100pmol/100nL) no HDM e injeção de TsTX no ventrículo lateral esquerdo (VLE).....55

**Figura 12:** Efeito do bloqueio de todos os subtipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM sobre as respostas cardiovasculares evocadas pela injeção i.c.v. de TsTX em ratos anestesiados com uretana. (A) Pressão arterial média (PAM, mmHg) and (B) Frequência cardíaca (FC, bpm) após a injeção bilateral de PBS (100nL) ou da mistura de AP5 e CNQX (100pmol+100pmol/100nL) no HDM e injeção de TsTX no ventrículo lateral esquerdo (VLE).....56

**Figura 13:** Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares evocadas pela injeção i.c.v. de TsTX em ratos anestesiados com uretana. (A) Pressão arterial média (PAM, mmHg) and (B) Frequência cardíaca (FC, bpm) após a injeção bilateral de PBS (100nL) ou de AP5 (200pmol/100nL) no HDM e injeção de TsTX no ventrículo lateral esquerdo (VLE).....57

**Figura 14:** Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos AMPA/Kainato do HDM sobre as respostas cardiovasculares evocadas pela injeção i.c.v. de TsTX em ratos

anestesiados com uretana. (A) Pressão arterial média (PAM, mmHg) and (B) Frequência cardíaca (FC, bpm) após a injeção bilateral de PBS (100nL) ou de CNQX (200pmol/100nL) no HDM e injeção de TsTX no ventrículo lateral esquerdo (VLE).....58

**Figura 15:** Fotomicrografia de secções coronais do encéfalo de rato Wistar, com os respectivos sítios de microinjeção: (A) no VLE (rato acordado), (B) no VLE (rato anestesiado) e (C) no HDM direito e esquerdo. Método de coloração: vermelho neutro.....59

**Figura 16:** Representação da participação do hipotálamo dorsomedial (HDM) nas respostas cardiovasculares promovidas pela injeção i.c.v. de TsTX em ratos.....66

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Acidentes escorpionicos: Classificação, manifestações clínicas e tratamento.

Fonte: Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.

Ministério da Saúde, 2001.....23

**Tabela 2-** Média dos valores basais da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), considerando as séries experimentais em animais acordados.....43

**Tabela 3-** Média dos valores basais da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), considerando as séries experimentais em animais anestesiados.....53

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAE</b>	Aminoácidos excitatórios
<b>Amg</b>	Amígdala
<b>AP5</b>	Ácido D-2-amino-5-phosphonopentanoico
<b>BHE</b>	Barreira hematoencefálica
<b>CEUA-UFOP</b>	Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto
<b>CNQX</b>	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
<b>CSDV</b>	Canais para sódio dependentes de voltagem
<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>GABA</b>	Ácido gama amino butírico
<b>HMD</b>	Hipotálamo Dorsomedial
<b>i.c.v.</b>	Intracerebroventricular
<b>i.m.</b>	Intramuscular
<b>i.v.</b>	Intravenoso
<b>MG</b>	Minas Gerais
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NTS</b>	Núcleo do Trato Solitário
<b>PA</b>	Pressão arterial
<b>PAG</b>	Substância Cinzenta Periaquedutal
<b>PAM</b>	Pressão arterial média
<b>PAP</b>	Pressão arterial pulsátil
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato
<b>RPa</b>	Raphe Palidus
<b>RSNA</b>	Atividade simpática do nervo renal
<b>RVLM</b>	Bulbo Rostroventrolateral
<b>s.c.</b>	Subcutâneo
<b>SA</b>	Soroterapia antiescorpiônica
<b>SINAN</b>	Sistema de Informação e Agravos de Notificação
<b>SNA</b>	Sistema Nervoso Autônomo
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TiTX-<math>\gamma</math></b>	Toxina Gama

**TsTX**

Tityustoxina

**VLE**

Ventrículo Lateral Esquero

# **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). A maior prevalência ocorre em países tropicais, onde o clima quente e úmido favorece a proliferação dos escorpiões. No Brasil, a partir da implantação da notificação dos acidentes escorpiônicos, em 1988, ocorreu um aumento significativo dos números registrados, principalmente, nas regiões Nordeste e Sudeste (Ministério da Saúde, 2009a, 2013). Em 2012, ocorreram mais de 63.000 notificações, com um coeficiente de incidência de 32,9 casos/100.000 habitantes. Minas Gerais (MG) foi o estado que apresentou o maior número de notificações, com 14.336 ocorrências. Em 2013, foram registrados mais de 78.000 casos de envenenamento escorpiônico, sendo MG novamente o recordista, com 17.021 notificações (Ministério da Saúde, 2013). A maioria dos casos apresenta evolução benigna, situando-se a letalidade em 0,58% (Ministério da Saúde, 2001). Em 2012 e 2013, foram registrados pelo Sistema de Informação e Agravos de Notificação (SINAN), respectivamente, 92 e 69 óbitos. Dos 92 óbitos, 38% (35 casos) ocorreram em crianças menores de 10 anos. De forma semelhante, dos 69 óbitos, 37,7% (26 casos) ocorreram em vítimas da mesma faixa etária (Ministério da Saúde, 2013). Portanto, as manifestações graves e o óbito são preocupantes em se tratando de crianças, as quais são mais vulneráveis aos efeitos tóxicos do veneno escorpiônico (Campolina, 2006, Fan et al. , 1994, Fundação Nacional de Saúde, 2001, Ismail, 1995, Skolnik and Ewald, 2013).

### **1.1.2- Quadro Clínico, Classificação e Tratamento**

O quadro clínico pode ser dividido em local e sistêmico, de acordo com as manifestações observadas. 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. Tais manifestações, geralmente, apresentam duração de até 24 horas,

embora o quadro mais intenso ocorra nas primeiras horas após o acidente. As manifestações sistêmicas podem ser divididas em: a) gerais: hipotermia, hipertemia e sudorese profusa; b) digestivas: náuseas, vômitos, sialorreia, dor abdominal e diarreia, sendo estas duas últimas menos frequentes; c) neurológicas: tremores, hipertonía, agitação psicomotora, confusão mental e sonolência; e d) cardiorespiratórias: taquipneia, dispneia, hipertensão ou hipotensão arterial, arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca congestiva, edema pulmonar agudo e choque. Tais manifestações podem aparecer dentro de um intervalo de minutos até poucas horas (duas, três horas) após o envenenamento (Ministério da Saúde, 2001). O aparecimento dos sinais e sintomas citados estabelece a suspeição diagnóstica de envenenamento escorpiónico, mesmo na ausência de relato de picada e do encontro/aprisionamento do escorpião (Ministério da Saúde, 2001).

A classificação dos casos em leve, moderado ou grave é realizada de acordo com a gravidade dos sintomas, manifestações clínicas e tratamento instituído (**Tabela 1**). 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 and Possani, 1994). Assim, o diagnóstico e tratamento precisos são importantes para evolução favorável do caso.

As abordagens utilizadas no tratamento do envenenamento englobam a soroterapia antiescorpiónica (SA), cujo principal alvo terapêutico é neutralizar o veneno circulante, além do tratamento sintomático e suporte das funções vitais. Apesar da ampla utilização da SA, sua efetividade é questionada em função das diferentes propriedades farmacocinéticas apresentadas em relação ao veneno (Gueron et al. , 1992, Hamed, 2003). Enquanto as toxinas do veneno possuem baixo peso molecular, difundindo-se rapidamente para os tecidos, as imunoglobulinas do soro possuem elevado peso molecular, apresentando absorção e distribuição lentas (Abroug et al. , 1999, Hamed, 2003). Assim, a SA parece ser eficaz somente quando administrada imediatamente após a inoculação do veneno.

Acidentes escorpiónicos  
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 antiescorpiónico/SAAR = Soro antiaracnídeo.

\*\*\* 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 1:** Acidentes escorpiónicos: Classificação, manifestações 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*. O *Tityus serrulatus* (**Figura 1**), popularmente conhecido como escorpião amarelo, é considerado o escorpião de maior relevância epidemiológica, devido ao seu grande potencial em causar envenenamentos graves (Cupo et al. , 1994). Esta espécie, que possui ampla distribuição regional, principalmente no Sudeste, apresenta elevada capacidade de proliferação (reprodução partenogênica) e adaptação ao meio urbano (Ministério da Saúde, 2009b).

**A****B**

**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 and Gonçalves, 1960). A primeira purificação do veneno bruto foi realizada em 1966 por cromatografia em gel de filtração (Gomez and Diniz, 1966). 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 (Becerril et al. , 1997), alterando a excitabilidade celular e a propagação do impulso elétrico. Dentre elas, destacam-se duas principais neurotoxinas: Toxina Gama (TiTX- $\gamma$ ) e Tityustoxina (TsTX), cujos alvos são os canais para sódio dependentes de voltagem (CSDVs: componentes-chave na geração/propagação dos potenciais de ação) (Barhanin et al. , 1982). Tais neurotoxinas são, respectivamente, classificadas como  $\alpha$  ou  $\beta$ , de acordo com seu sítio específico de ligação (Catterall, 1997).

A TiTX- $\gamma$  é uma proteína básica, composta por 61 aminoácidos, cujo peso molecular é de aproximadamente 6675 Da (Sampaio, Laure, 1983). Classificada como  $\beta$ -toxina por se ligar ao sítio IV dos CSDVs, aumenta a probabilidade de abertura desses

canais em potenciais transmembrânicos mais negativos. Assim, eleva a probabilidade de ocorrência de potenciais de ação com despolarizações de membrana menores e viabiliza disparos espontâneos (Barhanin, Giglio, 1982, Vijverberg et al. , 1984).

A TsTX, uma proteína básica de 63 aminoácidos e peso molecular de cerca de 7200 Da (Sampaio, Laure, 1983), é uma  $\alpha$ - toxina por se ligar ao sítio III dos CSDVs. Essa ligação retarda o processo de inativação e prorroga o tempo de abertura desses canais (Barhanin, Giglio, 1982), promovendo o aumento do influxo de sódio e a hiperexcitabilidade celular, cuja consequência é a acentuada liberação de neurotransmissores, por ex.: glutamato, acetilcolina, GABA e dopamina, conforme observado em várias preparações teciduais (Casali et al. , 1995, Dorce and Sandoval, 1994, Fernandes et al. , 2004, Massensini et al. , 1998).

Neste estudo, optamos pela utilização da TsTX, visto que venenos com maiores concentrações de  $\alpha$ -toxina foram considerados mais letais (Kalapothakis and Chavez-Olortegui, 1997).

### **1.1.5- A ação central da TsTX e as manifestações cardiovasculares**

O evidente comprometimento cardiorrespiratório justifica o extenso número de estudos clínicos e experimentais acerca dos efeitos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e suas frações tóxicas sobre o sistema cardiovascular (Azevedo et al. , 1983, Celeste Henriques et al. , 1968, Guidine et al. , 2009, Ismail et al. , 1974, Ismail et al. , 1973, Ismail et al. , 1972, Ismail et al. , 1983, Mesquita et al. , 2003). Além das complicações cardiorrespiratórias (arritmias cardíacas, alterações hemodinâmicas, edema pulmonar e choque) consideradas as principais *causa mortis* do acidente escorpiônico (Bahloul et al. , 2002, Freire-Maia and Campos, 1989, Freire-Maia et al. , 1994, Freire-Maia et al. , 1974, Ismail, 1995), outras manifestações cardíacas (isquemias miocárdicas, elevação sérica de enzimas cardíacas e infarto do miocárdio) são frequentemente relatadas (Cupo and Hering, 2002, Mesquita, Moraes-Santos, 2003, Teixeira et al. , 2001).

Tanto em estudos clínicos quanto em experimentais, os sintomas mais relatados são alterações na pressão arterial sistêmica e no ritmo cardíaco, e edema pulmonar (Ismail, 1995). Em se tratando deste último tipo de estudo, nem mesmo o efeito anestésico, ou a via de inoculação do veneno, são capazes de modificar o perfil dos sintomas mais relatados nos animais (Ismail, 1995). Há um consenso de que os efeitos

cardiovasculares resultam da estimulação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), com predomínio da via simpática e liberação tecidual de catecolaminas (Freire-Maia, Pinto, 1974, Ismail, 1994, 1995, Ito et al. , 1981). Apesar disso, opiniões diferem acerca da origem desta modulação, variando entre: 1) estimulação simpática periférica; 2) estimulação pré-ganglionar simpática e espinhal; 3) secreção adrenal; 4) ação direta sobre coração; 5) estimulação hipotalâmica ou bulbar; e 6) uma combinação de todos ou alguns destes efeitos (Celeste Henriques, Gazzinelli, 1968, Del Pozo, 1968, Efrati, 1951, Freire-Maia, Pinto, 1974, Guidine, Mesquita, 2009, Ismail, 1995, Magalhaes, 1928, Mesquita et al. , 2002, Teixeira, Fontoura, 2001).

Há fortes evidências de que o Sistema Nervoso Central (SNC) exerce uma importante participação na gênese dos sintomas do envenenamento escorpiónico grave. No início do século XX, alguns trabalhos apontaram a ação direta das toxinas sobre núcleos bulbares de controle cardiorrespiratórios (Efrati, 1949, Magalhães, 1938). Contudo, pesquisas posteriores negligenciaram a ação central devido ao entendimento de que os peptídeos tóxicos do veneno não cruzariam a barreira hematoencefálica (BHE) (Ismail, Kertesz, 1974, Revelo et al. , 1996).

Não obstante, relatos experimentais sugeriram grande sensibilidade do SNC à ação da TsTX. Clot-Faybesse et al. realizaram injeção subcutânea (s.c.) de toxina marcada com tecnécio-99 e a detectaram no SNC de camundongos neonatos (Clot-Faybesse et al. , 2000). De fato, Nunan et al. observaram aumento na permeabilidade da BHE à TsTX (3 vezes maior) em ratos jovens quando comparado a adultos (Nunan et al. , 2003). Ademais, em ratos submetidos à injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de TsTX (1,74 µg), foram constatadas alterações comportamentais (saltos, giros e corridas – um indicativo do recrutamento de estruturas envolvidas na resposta de luta e fuga) e sintomas clássicos do envenenamento escorpiónico grave (taquipnéia, arritmias cardíacas graves, convulsões, edema pulmonar e óbito) (Mesquita, Moraes-Santos, 2003, Silva et al. , 2013). Porém, a mesma dose, quando administrada intravenosamente (i.v.), não foi capaz de promover tais sintomas (Mesquita, Moraes-Santos, 2003). Em outro estudo, neurônios do núcleo do trato solitário (NTS), bem como neurônios adjacentes ao sistema ventricular, foram marcados após injeção i.c.v. do composto TsTX-ALEXA (corante fluorescente AF568) em ratos, em visualização por microscopia de fluorescência (Mesquita, 2002).

Outro trabalho experimental, no qual os ratos foram submetidos à injeção de TsTX (mesma via de administração e dose), mostrou correlação temporal entre disparos

epileptiformes registrados na Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG: região envolvida nas respostas cardiovasculares e comportamentais à situações aversivas) e um aumento da modulação da atividade simpática cardíaca (Guidine, 2005). De modo semelhante, a injeção s.c. de TsTX (6mg/kg), em ratos jovens, induziu descargas de alta amplitude no NTS, as quais foram correlacionadas a alterações eletrocardiográficas (por ex.: bloqueios atrioventriculares de diferentes graus, batimentos ectópicos, taquicardia ou bradicardia sinusal e despolarização atrial e ventricular prematuras) (Guidine, Mesquita, 2009). De fato, um estudo recente mostrou que áreas do tronco cerebral envolvidas na regulação autonômica são as prováveis estruturas que iniciam a cascata dos sintomas graves observados no envenenamento escorpiónico (Guidine et al. , 2014).

A atenuação dos sintomas do envenenamento, obtida com fármacos neurotrópicos, reforça a participação do SNC na fisiopatologia do envenenamento escorpiónico grave. A administração intramuscular (i.m.) de fenobarbital, agonista GABAérgico, foi eficiente em bloquear o edema pulmonar induzido pela injeção i.c.v. de TsTX em ratos (Mesquita, Moraes-Santos, 2002). A administração de lignocaína, bloqueador dos CSDVs, atenuou os sintomas e diminuiu a letalidade após o envenenamento escorpiónico em coelhos (Fatani et al. , 2000). Em ratos tratados com carbamazepina, outro bloqueador dos 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). E, por fim, em ratos jovens, a CBZ atenuou as descargas epileptiformes de alta amplitude no NTS geradas pela injeção s.c. de TsTX, as quais correlacionaram-se às alterações eletrocardiográficas previamente citadas (Guidine, Mesquita, 2009).

Assim, as informações supracitadas agregadas a evidências clínicas, as quais ressaltam a vulnerabilidade de crianças aos sintomas graves e óbito, também avigoram o envolvimento do SNC na gênese das manifestações sistêmicas do escorpionismo. Nestas circunstâncias, a fragilidade da BHE - principalmente, nas proximidades do terceiro e quarto ventrículo, onde são naturalmente mais permeáveis - poderia comprometer o controle cardiorrespiratório exercido por núcleos encefálicos (Price et al. , 2008).

## **1.2- O Sistema Nervoso Central e a regulação cardiovascular**

Desde o século XIX, por meio dos trabalhos pioneiros de Claude Bernard, admite-se a fundamental importância do SNC na regulação do Sistema cardiovascular, cuja função primordial é manter, constantemente, a pressão arterial (PA) em níveis adequados, a fim de assegurar uma perfusão orgânica ideal em diferentes situações, garantindo o aporte apropriado de nutrientes e oxigênio (Bernard, 1867 , Thayer and Lane, 2009, Tonhajzerova et al. , 2012).

Por volta de 1920, Walter Cannon determinou que o SNA, por meio de suas vias eferentes (simpática e parassimpática), era essencial para o controle da homeostase (Cannon, 1939). Neste contexto, parte dos ajustes cardiovasculares são realizados por meio do SNA, cuja atividade é gerada e modulada em vários núcleos do SNC. O controle neural da circulação opera via neurônios parassimpáticos que inervam o coração, e simpáticos que inervam vasos sanguíneos, coração, rins e adrenais, influenciando o sistema cardiovascular tanto de maneira tônica, quanto reflexa (Guyenet, 2006).

A atividade simpática é regulada por diferentes circuitos neurais. Mesmo em repouso, as fibras vasomotoras simpáticas possuem um nível de atividade basal, que 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) (Goldstein, 1995, Tibiriçá, 2001). Este último pode justificar o mecanismo pelo qual a TsTX age sobre o SNC (Guidine, Mesquita, 2009, Mesquita, Moraes-Santos, 2003).

Sendo assim, estruturas encefálicas que se conectam aos órgãos circunventriculares e são cruciais para o controle cardiovascular, tais como o hipotálamo dorsomedial (HDM), podem estar susceptíveis a ação de substâncias presentes na circulação (Guyenet, 2006, Price, Hoyda, 2008).

### **1.3- O hipotálamo dorsomedial e o controle cardiovascular nas reações de defesa**

O HDM, um núcleo diencefálico, localizado bilateral e adjacientemente ao terceiro ventrículo, caudal ao núcleo paraventricular do hipotálamo e dorsal ao núcleo ventromedial (Paxinos and Watson, 1986), é considerado um componente-chave das vias centrais que mediam as respostas cardiovasculares durante as reações de defesa (DiMicco et al. , 1996, Graeff, 1990, Jardim and Guimaraes, 2001, Zhong et al. , 2008).

Embora o HDM esteja sob constante inibição da Área Pré-óptica medial, pode receber sinapses excitatórias de outras regiões que também participam das respostas cardiocirculatórias observadas em ocasiões emergenciais, tais como: Amígdala (Amg) e PAG (de Menezes et al. , 2006, de Menezes et al. , 2009, de Menezes et al. , 2008, Horiuchi et al. , 2009, Soltis et al. , 1998). O HDM também envia projeções para a PAG, Bulbo Rostroventrolateral (RVLM) e Raphe Palidus (RPa) (Fontes et al. , 2001, Fontes et al. , 2006, Horiuchi et al. , 2004). A RVLM e a RPa, respectivamente, desempenham uma importante função reguladora sobre o tônus simpático vasomotor e cardíaco em situações emergenciais (Fontes et al. , 2011, Fontes, Menezes, 2006). A RVLM contém neurônios pré-motores simpáticos relevantes para o controle tônico e reflexo da pressão arterial (Dampney et al. , 2000, Guyenet, 2006) e apresenta uma frequência de disparo 5 vezes maior após a desinibição/ativação do HDM pela injeção do antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>, bicuculina metiodida (Horiuchi, McAllen, 2004). Diferente da resposta pressora, a resposta taquicárdica e a modulação simpatoexcitatória para o coração observadas em situações de estresse agudo são dependentes da atividade na Rpa. Tal fato é confirmado pelo aumento da resposta cronotrópica e simpática cardíaca (semelhantes às observadas na ativação do HDM), após a desinibição dos neurônios da Rpa (Bailey and Dimicco, 2001), como também, pela atenuação de mais de 50% da taquicardia mediada pela ativação do HDM, após a inibição da Rpa em ratos anestesiados (Cao and Morrison 2003). Todas as observações supracitadas sugerem que o HDM pode ser um alvo crítico na gênese das respostas cardiovasculares desencadeadas pela ação central da TsTX.

## 2 – JUSTIFICATIVA

Embora o comprometimento neurológico e cardiovascular no acidente escorpiônico grave seja inquestionável, pouco se sabe acerca desta inter-relação. Neste contexto, torna-se importante correlacionar a elevada sensibilidade do SNC à ação das toxinas escorpiônicas com a progressão e a gravidade dos sintomas cardíacos e hemodinâmicos observados (geralmente, associados aos óbitos). Ademais, apesar da ampla utilização do soro antiescorpiônico (SA), este parece ser eficaz somente quando administrado precocemente após a inoculação do veneno, devido às diferentes propriedades farmacocinéticas entre as toxinas e as imunoglobulinas do soro. Essa limitação, associada à dificuldade de se encontrar o SA em unidades de saúde de menor porte, estabelece um obstáculo ainda maior, tornando fundamental a procura por outros tratamentos que auxiliem no combate dos sintomas secundários ao envenenamento. Não obstante a investigação clínica seja decisiva para o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas, seria impraticável realizá-la sem o prévio e extensivo desenvolvimento de pesquisas experimentais, a começar pelo essencial: o melhor entendimento dos mecanismos neuroanatômicos e neuroquímicos envolvidos na fisiopatologia do envenenamento escorpiônico. Sendo assim, é indispensável elucidar quais e como núcleos encefálicos envolvidos no controle cardiovascular são recrutados pela ação central da TsTX, haja vista que, à longo prazo, este possa ser o ponto estratégico para um tratamento coadjuvante que, além de retardar e/ou atenuar os sintomas cerebrais e cardiovasculares, melhore o prognóstico e aumente a sobrevida do paciente.

## **3- OBJETIVOS**

### **3.1- Objetivo Geral:**

Avaliar a participação do HDM nas respostas cardiovasculares promovidas pela injeção i.c.v. da TsTX em ratos.

### **3.2- Objetivos específicos**

1) Avaliar, em ratos acordados, a influência das injeções i.c.v. de diferentes doses de TsTX (1,74 $\mu$ g; 0,174 $\mu$ g; 0,116 $\mu$ g e 0,087 $\mu$ g) sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC), a porcentagem de letalidade e o tempo de sobrevivência, além de verificar se há correlação temporal entre estes parâmetros;

2) Avaliar, em ratos anestesiados, a influência da injeção i.c.v. de TsTX (0,116 $\mu$ g) sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) e sobre a atividade simpática renal;

3) Avaliar, em ratos anestesiados, a participação dos receptores GABAérgicos do HDM sobre as respostas cardiocirculatórias decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX (0,116 $\mu$ g), por meio da ativação destes receptores com muscimol (agonista GABA<sub>A</sub>);

4) Avaliar, em ratos anestesiados, a influência dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM sobre as respostas cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX (0,116 $\mu$ g), por meio da inibição destes receptores, primeiramente, com uma mistura de AP5 e CNQX (respectivamente, antagonistas de receptores NMDA e AMPA/Kainato), e posteriormente, de maneira independente, utilizando ambos os antagonistas.

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Modelo animal

Ratos Wistar adultos ( $310 \pm 10$ g) foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal/UFOP, e mantidos 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 ração.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), por meio dos protocolos de número 2011/46 e 2013/49. Todas as normas estabelecidas por esta comissão foram respeitadas, de forma a minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos. Além disso, o número de animais 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.

### 4.2- Drogas/ Soluções utilizadas

**PBS (Salina tamponada com fosfato; pH 7,2);**

**Anestésico (Solução de Ketamina + Xilazina)\*:** dose (ketamina: 80mg/kg ; Xilazina: 7mg/kg) e volume (0,1mL/100g de animal; i.m.);

**Anestésico Uretana:** dose (1,4g/kg) e volume (1ml/100g de animal; i.p.);

**Antiinflamatório [Ketoflex 1% p/v (Cetoprofeno)]\*:** dose única (4mg/Kg) e volume (0,1 mL/100g de animal; i.m.);

**Antibiótico (Pentabiótico Veterinário)\*:** dose única: 48.000UI de penicilina, 20mg de estreptomicina e 20mg de diidroestreptomicina/kg. Volume: 0,1 mL/100g de animal; i.m.;

**Toxina escorpiônica (TsTX):** obtida a partir do veneno bruto do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*, de acordo com metodologia descrita por (Sampaio, Laure, 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). Concentrações utilizadas: (1,74µg/µL; 0,174µg/µL; 0,116µg/µL e 0,087µg /µL).

**Muscimol:** agonista de receptores GABA<sub>A</sub>, (100pmol/100nL).

**AP5 (2-amino-5-phosphonopentanoato):** antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (200pmol/100nL).

**CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona):** antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA/Kainato (200pmol /100nL).

**Mistura (AP5+CNQX):** (100pmol + 100pmol/100nL).

\*, Substâncias utilizadas em animais submetidos a experimentos quando acordados.

## **4.3- Procedimentos cirúrgicos**

### **4.3.1- Traqueostomia**

Após anestesia com uretana (1,4g/kg; i.p.), na superfície ventral do pescoço, próximo ao manúbrio esternal, foi realizada uma pequena incisão na pele do animal. As estruturas musculares foram divulsionadas e rebatidas e, após a localização da traqueia, foi realizado um pequeno orifício entre dois anéis cartilagosos para a inserção de uma cânula (JELCO Plus - n° 14G 7068 – Johnson & Johnson MEDICAL) conectada a um tubo “Y”. Dessa forma, viabilizou-se a aspiração endotraqueal (se necessário) e manutenção das vias aéreas.

### **4.3.2- Canulação da artéria e veia femorais**

Esses procedimentos foram realizados, respectivamente, para medição de pressão arterial e frequência cardíaca, e infusão de anestésico uretana em animais anestesiados (caso tenha sido necessário suplementar). Após anestesia (solução de Ketamina + Xilazina ou uretana de acordo com o grupo avaliado, respectivamente, animais submetidos a experimentos quando acordados ou sob efeito anestésico – conforme **item 4.2**), os animais foram submetidos ao implante de uma cânula na artéria e na veia femoral, por meio de uma incisão na região inguinal do rato. Esta região foi dissecada até que a artéria e a veia femoral ficassem aparentes e, posteriormente, pudessem ser isoladas cuidadosamente. Em seguida, 2 fios de sutura foram posicionados por baixo dos vasos, e foram tensionados e cortados em sua parede superior. As cânulas foram inseridas nos vasos. A cânula arterial foi inserida na artéria

até que sua ponta alcançasse a artéria aorta abdominal (mais ou menos 4 cm). Posteriormente, as cânulas foram transpassadas pelo dorso até a região da escápula, onde foram fixadas (procedimento realizado apenas nos animais submetidos aos experimentos quando acordados). A incisão foi suturada e higienizada com álcool iodado.

### **4.3.3- Craniostomia e localização do ventrículo lateral esquerdo (VLE) e do HDM**

Sob o efeito anestésico, os ratos foram alocados em um estereotáxico. Após dissecação e limpeza da região do crânio, foram realizados trepanações para a realização da microinjeção nos sítios de interesse (no máximo três orifícios/ animal). As coordenadas para a localização do sítio de microinjeção foram obtidas de acordo com o Atlas de Paxinos & Watson (Paxinos, 1998).

Para a realização de protocolos com ratos anestesiados, foram utilizados os seguintes parâmetros:

- 1) VLE: a partir do bregma, (AP): -0,5 mm, (DV): -4,7 mm e LL: -1,5mm.
- 2) HDM: a partir do bregma, AP: -3,3mm, DV: -8,3mm e LL:  $\pm 0,6$ mm.

As micro/nanoinjeções foram realizadas por uma injetora (confeccionada com agulha gengival) conectada a uma seringa Hamilton de 5 $\mu$ l por meio de um tubo de polietileno (PE10).

Para realização dos protocolos com ratos acordados, cânulas-guia medindo 10mm foram dirigidas ao VLE por meio das mesmas coordenadas descritas acima, exceto para o parâmetro dorso-ventral (DV): -3,7 mm. Posteriormente, as cânulas-guia foram fixadas com parafusos cobertos por resina acrílica. As microinjeções foram realizadas por uma injetora de 11mm (confeccionada com agulha gengival), também conectada a uma seringa Hamilton de 5 $\mu$ l por meio de um tubo de Polietileno 10 (PE10).

### **4.3.4- Localização e isolamento do nervo renal**

Após a tricotomia do flanco lateral esquerdo dos ratos, uma área delimitada entre a última costela e a pata traseira foi demarcada com caneta dermatográfica e exposta pela retirada da pele. Em seguida, a musculatura paravertebral da região retroperitoneal foi divulsionada até a localização do rim. Um campo operatório foi fixado às

extremidades da incisão cirúrgica para visualização e acesso à aorta abdominal, nervo e artéria renais. Com o auxílio de uma lupa (Opto sm, 2002), o nervo renal foi cuidadosamente localizado e dissecado. O nervo renal foi posicionado sobre um par de eletrodos de prata acoplados a um micromanipulador. Os *bursts* de atividade simpática do nervo renal captados pelo eletrodo foram filtrados (100 a 1000Hz), amplificados e enviados simultaneamente a um amplificador de som e a um osciloscópio (Tektronix 546B) para visualização e identificação da frequência de descarga que caracterizam a atividade simpática. Além disso, a atividade simpática captada foi conduzida a uma placa analógico-digital e a um sistema de aquisição de dados (Power Lab 4/20 – ADInstruments). Por meio de um software (Chart 7.2 for Windows), o sinal captado foi registrado como sinal bruto, medido por unidades arbitrárias e simultaneamente convertido em sinal integrado para a variação da atividade simpática para o nervo renal (RSNA) ser avaliada. Dentro do campo cirúrgico foi adicionado, durante todo o experimento, óleo mineral (Nujol – Schering-Plough) a  $\pm 37,5^{\circ}$  C para evitar ressecamento, isolar a captação do sinal do nervo renal de ruídos externos e para condução da onda ultrassônica. Toda essa preparação permaneceu em observação por cerca de 30 minutos ou até a estabilização dos parâmetros cardiovasculares para que se iniciassem os procedimentos experimentais.

#### **4.4- Histologia**

Ao término de cada protocolo experimental (descritos no próximo item), injetamos o corante Azul de Evans (2%) no VLE (1 $\mu$ L) e no HDM direito e esquerdo (100nL), para confirmar a posição da agulha de injeção. Os animais acordados foram anestesiados com solução de Ketamina + Xilazina e os já anestesiados foram suplementados com Uretana (14%), quando necessário (como descrito no **item 4.3.2**). Feito isso, estes foram submetidos a uma toracotomia para a exposição do coração. Os animais foram perfundidos com solução salina (0,9%), seguida de solução de formalina (10%) por meio de punção cardíaca. Em seguida, os encéfalos foram retirados, fixados em solução de formaldeído tamponado 10% por 48 horas e estocados em sacarose 20% por 24 horas. Posteriormente, os encéfalos foram seccionados transversalmente em fatias de 50  $\mu$ m 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 sítios de injeção confirmados pela microscopia óptica foram incluídos nos resultados.

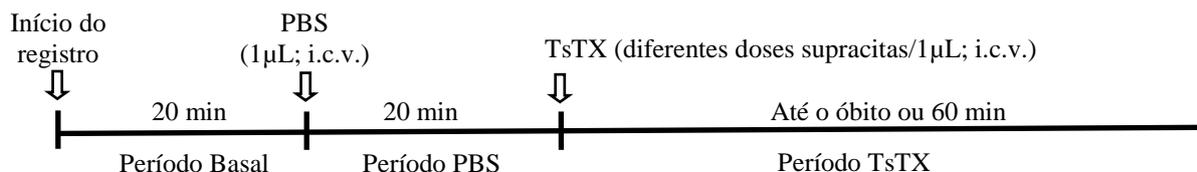
## **4.5- Protocolos experimentais**

Devido aos diferentes tipos de protocolos (em animais acordados e anestesiados) e ao número de grupos experimentais, esta subseção foi dividida de acordo com cada objetivo específico (**item 3.2**), no intuito de facilitar o entendimento do leitor.

### **4.5.1. Protocolo 1– A influência das injeções i.c.v. de diferentes doses de TsTX sobre os parâmetros cardiovasculares, a porcentagem de letalidade e o tempo de sobrevivência, e a correlação temporal entre estes parâmetros em ratos acordados;**

Inicialmente, realizamos uma curva dose-resposta da TsTX, com o intuito de obtermos uma dose, injetada i.c.v., capaz de induzir os sintomas cardiovasculares decorrentes do envenenamento, sem causar o óbito do animal prematuramente. Deste modo, a escolha do VLE como sítio de microinjeção foi baseada na facilidade da TsTX fluir pelo sistema ventricular e atingir o SNC, recrutando regiões (adjacentes aos 3º e 4º ventrículos) que pudessem interferir no controle cardiovascular. A escolha de 1,74 µg de TsTX, como maior dose, 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 escorpiónico grave, além de induzir o óbito do animal em aproximadamente 10 minutos (Mesquita, Moraes-Santos, 2003). Já as demais doses foram fundamentadas na necessidade de se obter a menor dose capaz de promover alterações cardiovasculares e uma sobrevivência de 60 min (janela temporal suficiente para análise do comprometimento cardiovascular).

Para tal, utilizamos 20 ratos Wistar submetidos às cirurgias de canulação da artéria femoral, realizadas 7 dias após o implante de cânula-guia no VLE, conforme mencionado nos **itens 4.3.2 e 4.3.3**. O protocolo experimental, descrito abaixo, foi realizado 48 horas após a canulação (**Figura 2**). Os ratos foram divididos em 4 grupos, de acordo com a dose de TsTX administrada: 1,74 µg (n= 4); 0,174 µg (n=6); 0,116 µg (n=5) e 0,087 µg (n=5).



**Figura 2:** Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação da injeção i.c.v. de diferentes doses de TsTX sobre os parâmetros cardiovasculares, porcentagem de letalidade e tempo de sobrevivência em animais acordados. As setas representam, da esquerda para a direita, o início do registro ou a administração de substâncias (PBS e TsTX). A via de inoculação e a dose utilizada estão indicadas entre parênteses. O registro do protocolo experimental foi dividido em 3 períodos, da esquerda para direita: Basal, PBS e TsTX, cujas janelas temporais estão representadas em minutos.

Antes do início do registro, injetamos salina heparinizada (1:40) na cânula arterial, a qual foi conectada a um transdutor de pressão MLT0699 (ADInstruments, Austrália). Este foi ligado a um amplificador de sinais ETH-400 (CB Sciences, Inc.) conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália). A transferência de dados (conversor/computador) foi feita por meio de uma placa SCISI, onde o software *Chart for Windows®* gerou os registros de pressão arterial pulsátil (PAP) a partir dos dados enviados pelo conversor analógico digital em uma frequência de amostragem de 1000 Hz. Feito isso, cada animal passou por um período de adaptação de 30 a 40 minutos, precedentes aos experimentos. Realizou-se a aquisição dos dados referentes à PAP, a partir da qual foram calculadas a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). As microinjeções de PBS ou TsTX (1 µL) foram realizadas por 30 segundos, com livre movimentação dos animais e sem a necessidade de interrupção do registro.

Para as análises e representação nas tabelas e gráficos, calculamos as médias de PAM e FC dos valores obtidos durante 4 minutos a cada 4 minutos, ao longo dos períodos PBS e TsTX. Já no período basal, essa média correspondeu apenas aos 4 minutos anteriores à injeção de PBS. Optamos por estes intervalos, visto que, após a microinjeção de TsTX até aproximadamente o 4º minuto subsequente, observávamos convulsões frequentes que geravam artefatos de movimento.

A variação máxima ( $\Delta$  máx.) de PAM e FC correspondeu a maior média de valores obtidos após a microinjeção de TsTX. A latência para a primeira variação ( $1^a \Delta$ ) destes parâmetros foi definida como o tempo (em minutos) necessário para ocorrer uma variação de, respectivamente, 20mmHg e 50 bpm, após a injeção de TsTX. A análise estatística desses dados foi realizada por meio do teste variância (ANOVA) *One way*,

seguida do pós-teste de Dunnett, cujo nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

Para a análise de porcentagem de sobrevida ao longo tempo, 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 apneia superior a 30 segundos. A análise estatística desses dados foi realizada por meio da estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste Log-rank para a comparação entre curvas de percentual de sobrevida por tempo, cujos resultados foram expressos em Mediana: 1º Quartil/ 3º Quartil (Med: Q1/Q3). Para a análise da porcentagem de letalidade, foi utilizado o teste exato de Fisher para comparação entre os grupos, cujos resultados foram expressos em porcentagem (%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

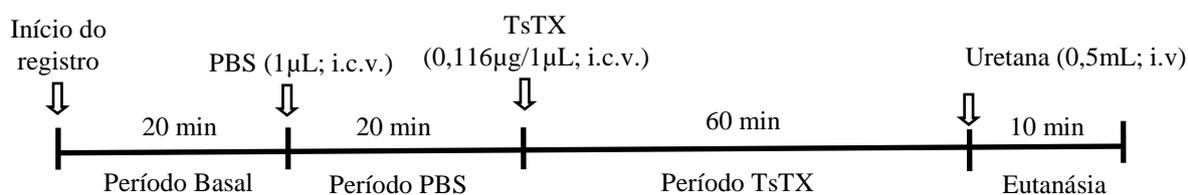
Já para as correlações temporais, a análise estatística foi realizada por meio do teste para coeficiente de correlação de Spearman, cujo nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . Os resultados foram apresentados pelo coeficiente de correlação: R.

Todos os dados foram analisados no programa Prisma 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

#### **4.5.2. Protocolo 2- A influência da injeção i.c.v. de TsTX (0,116 $\mu$ g) sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) e sobre a atividade simpática renal em ratos anestesiados;**

Considerando que os rins recebem inervações de neurônios pós-ganglionares simpáticos e mantém estreita correlação com a função circulatória, sendo responsáveis pela manutenção do volume e da composição do fluido extracelular (Guyenet, 2006, Guyton, 1991), o nível de atividade simpática do nervo renal (RSNA) pode ser utilizada como um indicador do tônus simpático. Ademais, como há um consenso de que os efeitos cardiovasculares resultam da estimulação do SNA, com predomínio da via simpática (Freire-Maia, Pinto, 1974, Ismail, 1994, 1995, Ito, Nakazato, 1981), consideramos importante avaliar a influência da injeção i.c.v. de TsTX (0,116 $\mu$ g) sobre a atividade simpática do nervo renal. Este protocolo também teve como objetivo a padronização dos efeitos cardiovasculares decorrentes da injeção central de TsTX em animais anestesiados.

Para tal, realizamos um experimento piloto com 5 ratos Wistar anestesiados com uretana e submetidos a todas as cirurgias descritas nos **itens 4.3.1, 4.3.2 , 4.3.3. e 4.3.4.** O protocolo experimental, sumarizado na **Figura 3**, foi realizado no Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, com o auxílio da MSc. Fernanda Marins.



**Figura 3:** Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação da injeção i.c.v. de TsTX (0,116µg/1µL) sobre o sistema cardiovascular e atividade simpática para o nervo renal em ratos anestesiados. As setas representam, da esquerda para a direita, o início do registro ou a administração de substâncias (PBS, TsTX e Uretana). 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, TsTX e Eutanásia, cujas janelas temporais estão representadas em minutos.

As análises de PAM e FC seguiram o mesmo padrão realizado no protocolo experimental anterior (**item 4.5.1**). Contudo, como este protocolo também foi realizado para padronizar os efeitos da TsTX em ratos anestesiados, o período TsTX foi dividido em três tempos (I - início, M - meio e F - fim), conforme o interesse em investigar alterações das respostas ao longo do tempo.

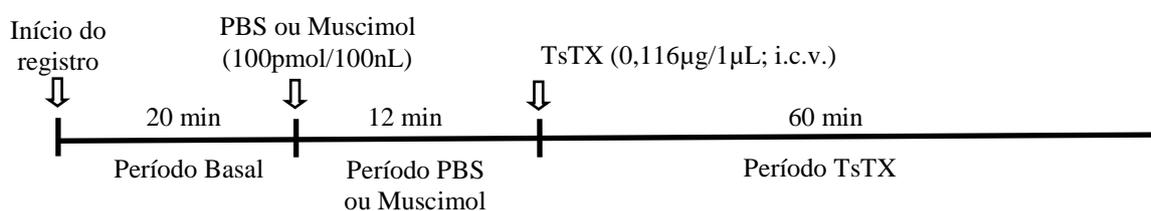
A análise da atividade simpática para o nervo renal foi realizada a partir da integral da RSNA. Devido à necessidade de utilizar períodos estáveis, utilizamos uma média de um minuto para cada período, conforme a descrição a seguir: **Período basal:** último minuto anterior à microinjeção de PBS; **Período PBS:** o 4º minuto posterior à microinjeção de PBS; **Períodos TsTX: TsTX(I):** o 4º minuto posterior à microinjeção de TsTX; **TsTX (M):** o 30º minuto posterior à microinjeção de TsTX; **TsTX (F):** último minuto anterior à injeção de Uretana; e **Eutanásia:** 1º minuto após a estabilização do sinal subsequente à injeção de Uretana. O ruído residual do sistema de registro de RSNA, obtido após o procedimento de eutanásia, foi subtraído de todos os valores de atividade simpática obtidos durante os períodos analisados. O resultado foi considerado o valor absoluto. A média obtida do período basal foi considerada 100%. As variações vistas após os procedimentos experimentais foram consideradas como a variação da porcentagem anteriormente citada. Assim, foi possível quantificar a amplitude das respostas provocadas pela ativação da TsTX. Para análise estatística desses dados foi

utilizado o teste variância (ANOVA) “*One way*” seguida do pós-teste de Newman-Keuls, cujo nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

#### **4.5.3. Protocolo 3- A participação dos receptores GABAérgicos do HDM sobre as respostas cardiocirculatórias decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX (0,116 $\mu$ g) em ratos anestesiados;**

Sabendo que o HDM é uma região crítica na integração da resposta cardiovascular, bem como de outras respostas (p.ex.: autonômicas ou não-autonômicas) em presença de estímulos aversivos e que a injeção de muscimol (agonista GABA<sub>A</sub>, considerado potente inibidor neuronal) neste núcleo diencefálico reduz a taquicardia e hipertensão em ratos quando submetidos a situações de estresse (Fontes, Xavier, 2011, Fontes, Menezes, 2006), resolvemos, primeiramente, investigar a participação do HDM sobre as respostas cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de 0,116 $\mu$ g de TsTX, por meio da ativação dos seus receptores GABA<sub>A</sub>.

Para tal, utilizamos 10 ratos Wistar anestesiados submetidos às cirurgias de traqueostomia, canulação da artéria femoral e craniotomia, conforme mencionado nos **itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3**. A inibição química do HDM foi realizada com muscimol (agonista GABA<sub>A</sub>; 100pmol), cuja dose foi baseada na literatura (de Menezes, Zaretsky, 2009). As nanoinjeções de PBS ou muscimol (100nL) foram realizadas bilateralmente, em sequência e em ordem aleatória. Os ratos foram divididos em 2 grupos (HDM PBS; n= 5 e HDM Muscimol; n=5) e passaram pelo seguinte protocolo experimental, conforme a **Figura 4**.



**Figura 4:** Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação da participação dos receptores GABAérgicos do HDM sobre as respostas cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de 0,116 $\mu$ g de TsTX em ratos anestesiados. As setas representam, da esquerda para a direita, o início do registro ou a administração de substâncias (PBS, muscimol e TsTX). A via de inoculação e a dose utilizada estão indicadas entre parênteses. O registro do protocolo experimental foi dividido em 3 períodos, da esquerda para direita: Basal, PBS ou Muscimol e TsTX, cujas janelas temporais estão representadas em minutos. As nanoinjeções realizadas no período PBS ou muscimol foram realizadas bilateralmente, em sequência e ordem randomizada.

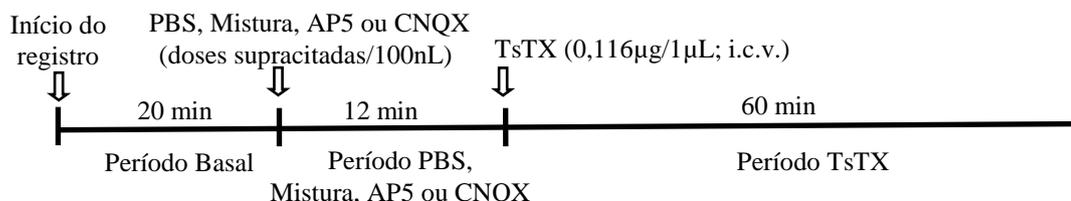
As análises estatísticas de PAM e FC foram realizadas de forma semelhante às análises descritas no **item 4.5.1**. Porém, neste protocolo, utilizamos o teste variância (ANOVA) “*Two way*” seguida do pós-teste de Bonferroni, cujo nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . Além disso, as médias de cada período foram calculadas por meio de valores obtidos durante 2 minutos a cada 2 minutos. Para análise estatística e representação nas tabelas e gráficos, a PAM e a FC basais foram obtidas pela média dos valores correspondentes aos dois minutos anteriores à primeira injeção (Período basal), e variações médias do basal foram calculadas da seguinte maneira: a) durante os seis últimos minutos correspondentes aos 12 minutos seguintes a injeção de PBS ou muscimol (Período PBS ou Muscimol) e b) por todo o período após injeção de TsTX (Período TsTX).

#### **4.5.4. Protocolo 4- A influência dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM sobre as respostas cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX (0,116µg) em ratos anestesiados;**

Após a investigação da contribuição dos receptores GABAérgicos do HDM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção i.c.v. de TsTX (protocolo anterior), e considerando que a injeção de agonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos no HDM provoca respostas cardiovasculares e comportamentais semelhantes àquelas obtidas após bloqueio GABA<sub>A</sub> (Soltis, Cook, 1998, Xavier et al. , 2013), evidenciando, portanto, uma importante participação destes receptores no funcionamento do HDM em situação aversivas, decidimos avaliar a contribuição dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos deste núcleo diencefálico, e assim, melhor compreender o envolvimento do HDM sobre as respostas cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de 0,116µg de TsTX em ratos anestesiados.

Para tal, utilizamos 16 ratos Wistar anestesiados submetidos às cirurgias de traqueostomia, canulação da artéria femoral e craniotomia, conforme mencionado nos **itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3**. A inibição química dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM, primeiramente, foi realizada por meio de uma mistura de AP5 e CNQX, respectivamente, antagonistas de receptores do tipo NMDA e AMPA/Kainato, (AP5+CNQX: 100pmol+100pmol/100nL) e posteriormente, de maneira independente, utilizando ambos os antagonistas (200pmol/100nL, cada um), cujas doses foram

baseadas na literatura (de Menezes, Zaretsky, 2009). As nanoinjeções foram realizadas bilateralmente, em sequência e em ordem randomizada. Os ratos foram divididos em 3 grupos, (HDM mistura, n=5; HDM AP5, n=6; e HDM CNQX, n=5) e passaram pelo seguinte protocolo experimental, conforme **Figura 5**. O grupo PBS, representado na figura abaixo, trata-se do mesmo grupo realizado no **Protocolo 3 (item 4.5.3)**.



**Figura 5:** Escala temporal do protocolo experimental para a avaliação da participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM sobre as respostas cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de 0,116µg de TsTX em ratos anestesiados. As setas representam, da esquerda para a direita, o início do registro ou a administração de substâncias (PBS, mistura, AP5, CNQX e TsTX). A via de inoculação e a dose utilizada estão indicadas entre parênteses. O registro do protocolo experimental foi dividido em 3 períodos, da esquerda para direita: Basal; PBS, Mistura, AP5 ou CNQX; e TsTX, cujas janelas temporais estão representadas em minutos. As nanoinjeções realizadas no período PBS, Mistura, AP5 ou CNQX foram realizadas bilateralmente, em sequência e em ordem randomizada.

As análises estatísticas de PAM e FC foram realizadas de forma semelhante ao descrito no **Protocolo 3 (item 4.5.3)**. Para análise estatística e representação nas tabelas e gráficos, a PAM e a FC basais foram obtidas pela média dos valores correspondentes aos dois minutos anteriores à primeira injeção (Período basal), e variações médias do basal foram calculadas da seguinte maneira: a) durante os seis últimos minutos correspondentes aos 12 minutos seguintes a injeção de PBS ou antagonistas glutamatérgicos (Período PBS, Mistura, AP5 ou CNQX) e b) por todo o período após injeção de TsTX (Período TsTX).

## 5- RESULTADOS

No intuito de facilitar o entendimento do leitor, esta seção foi dividida de acordo com cada objetivo específico (**item 3.2**) e protocolo experimental correspondente (**item 4.5**). Deste modo, todos os resultados expostos no **item 5.1** são referentes ao **objetivo específico e protocolo experimental 1**, os expostos no **item 5.2**, são referentes ao **objetivo específico e protocolo experimental 2**, e os expostos no **item 5.3** são referentes aos **objetivos específicos e protocolos experimentais 3 e 4**.

### 5.1- Curva dose-efeito da TsTX em ratos acordados

#### 5.1.1- A influência das injeções i.c.v. de diferentes doses de TsTX sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC)

Os valores basais de PAM e FC não foram significativamente diferentes entre os grupos estudados, conforme demonstrado na **tabela 2**.

**Tabela 2-** Média dos valores basais da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), considerando as séries experimentais em animais acordados.

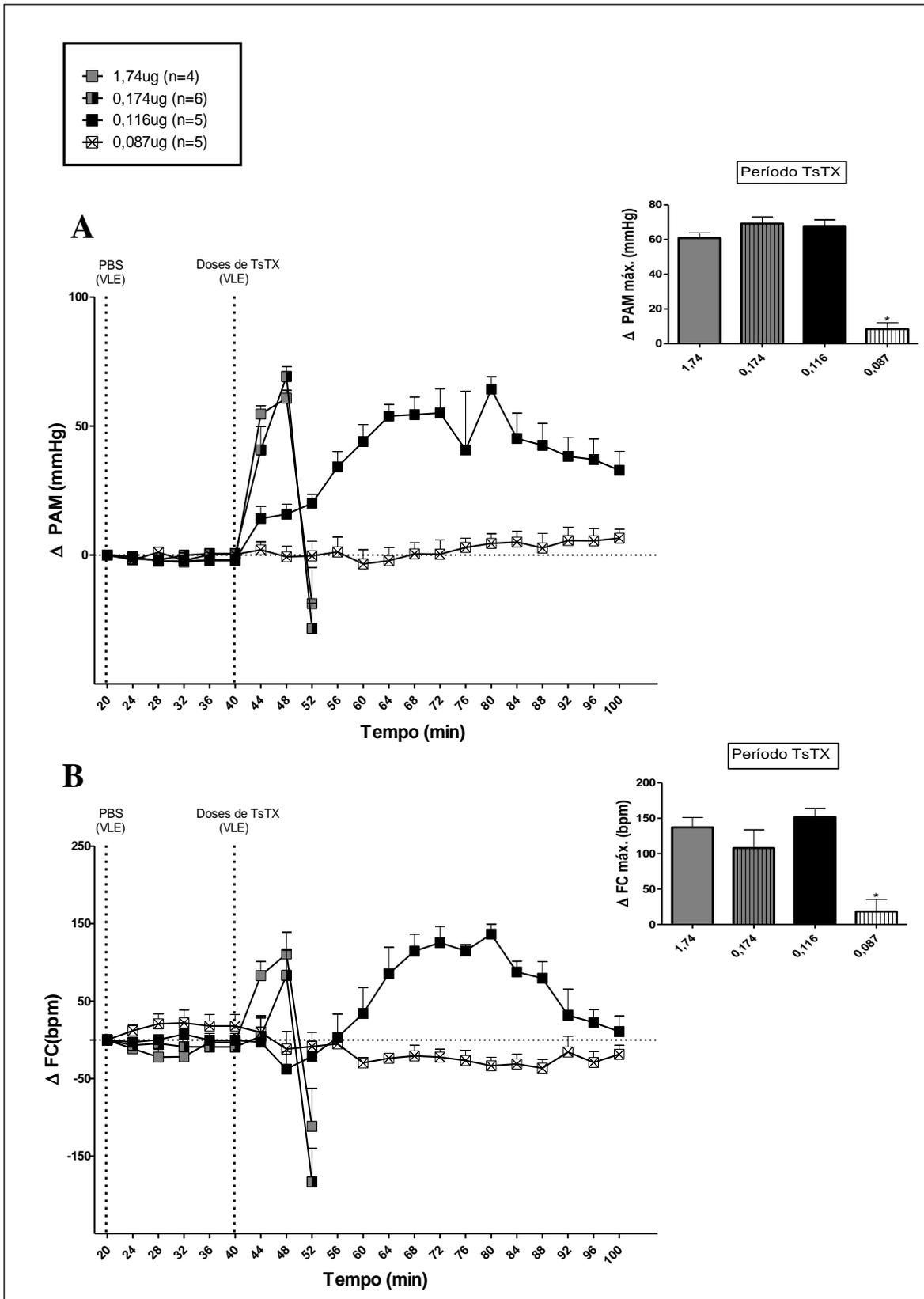
	TsTX (1,74µg) (n=4)	TsTX (0,174µg) (n=6)	TsTX (0,116µg) (n=5)	TsTX (0,087µg) (n=5)
PAM basal (mmHg)	126±2	117±4	126±5	119±2
FC basal (bpm)	360±18	367±20	373±9	347±8

As médias dos valores basais de PAM e FC não foram significativamente diferentes entre os grupos. A análise estatística foi realizada por ANOVA One-way, seguido do pós-teste de Dunnett's. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média; n = número de ratos.

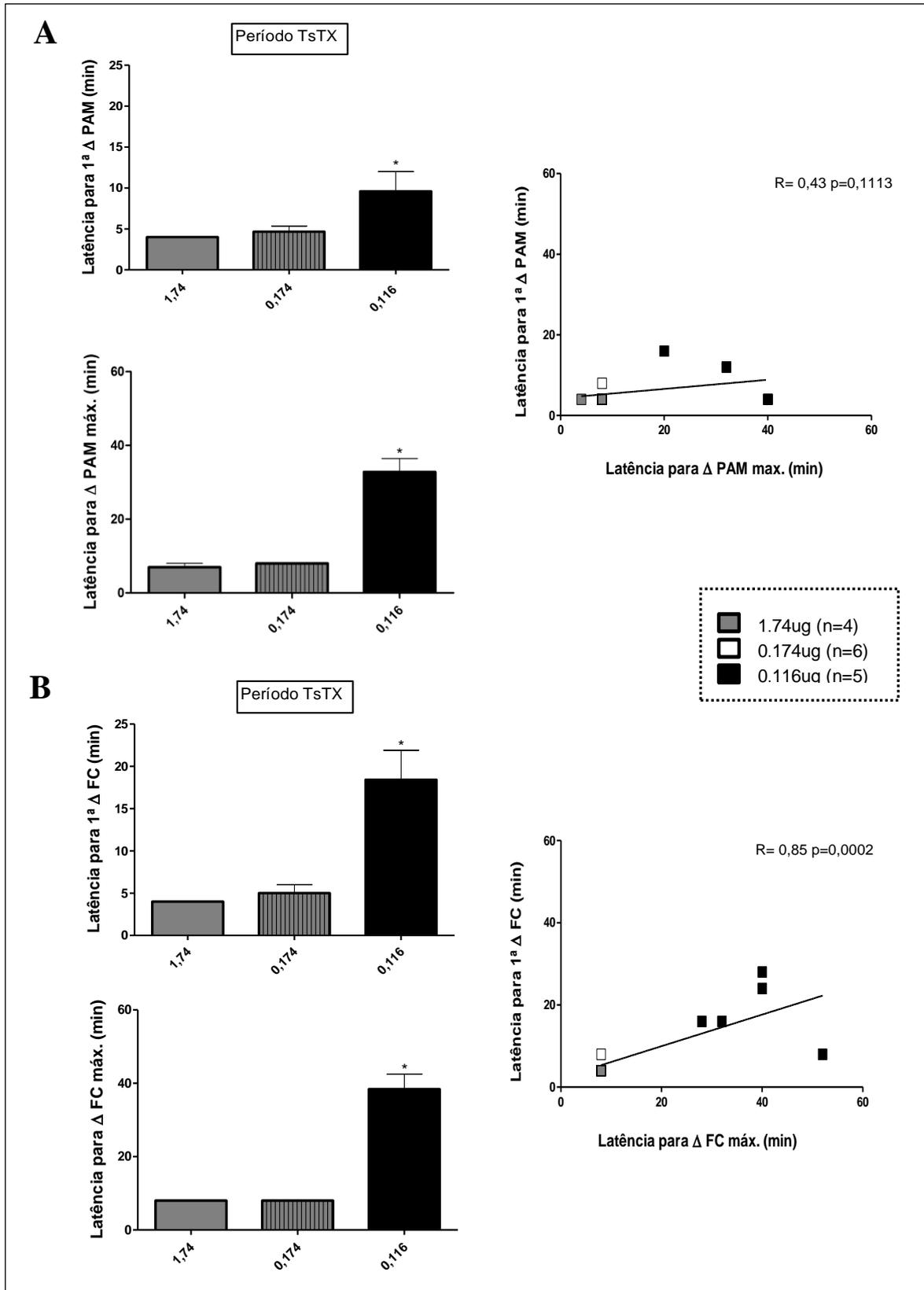
No intuito de avaliarmos a participação do SNC na gênese dos sintomas cardiovasculares observados no envenenamento escorpiónico, realizamos uma curva dose-efeito com doses muito pequenas de TsTX. A **figura 6** ilustra os perfis de resposta pressora (**6A**) e taquicárdica (**6B**) ao longo do tempo, provocadas pelas microinjeções i.c.v. de diferentes doses de TsTX. Como esperado, a microinjeção i.c.v. de PBS não

induziu alterações nos níveis de PAM e FC em nenhum dos grupos (período PBS). Já no período TsTX, observamos aumentos significativos na PAM e FC provocados apenas pelas injeções i.c.v. das três maiores doses de TsTX, cujas variações máximas foram semelhantes ( $\Delta$ PAM máx; **1,74 $\mu$ g**= 61 $\pm$ 3 mmHg; **0,174 $\mu$ g**= 69 $\pm$ 4 mmHg; **0,116  $\mu$ g**= 67 $\pm$ 4 mmHg e **0,087 $\mu$ g**= 8,5 $\pm$ 4 mmHg; p< 0,0001; **Figura 6A**); ( $\Delta$ FC máx; **1,74 $\mu$ g**= 137 $\pm$ 14 bpm; **0,174 $\mu$ g**= 108 $\pm$ 26 bpm; **0,116  $\mu$ g**= 151 $\pm$ 13 mmHg e **0,087 $\mu$ g**= 18 $\pm$ 17 bpm; p= 0,0008; **Figura 6B**). Contudo, o perfil das respostas pressora e taquicárdica provocadas por essas doses foram diferentes. As curvas de PAM e FC (respectivamente, **Figura 6A e 6B**) mostram que as doses de 1,74 e 0,174 $\mu$ g produziram respostas idênticas: hipertensão e taquicardia iniciais, seguidos de hipotensão e bradicardia terminais – respostas cardiovasculares típicas do envenenamento escorpiónico grave. Já a dose de 0,116 $\mu$ g causou hipertensão e taquicardia sustentadas, respectivamente, até o final do registro e por 50 min após a injeção de TsTX, enquanto a dose de 0,087 $\mu$ g não causou alterações significativas na PAM e FC.

Embora as variações máximas na PAM e FC provocadas pelas injeções i.c.v das três maiores doses tenham tido amplitude equivalentes, elas ocorreram em tempos distintos, como pode ser observado na **figura 7**. Tanto a primeira alteração (entendida como um aumento de 20 mmHg) quanto a alteração máxima observadas na PAM ocorreram com maior latência no grupo TsTX 0,116 $\mu$ g (**Latência para 1<sup>a</sup>  $\Delta$  PAM: 1,74 $\mu$ g= 4 $\pm$ 0 min; 0,174 $\mu$ g= 5 $\pm$ 1 min; 0,116  $\mu$ g= 10 $\pm$ 2 min; p= 0,04); (**Latência para  $\Delta$  PAM máx.: 1,74 $\mu$ g= 7 $\pm$ 1 min; 0,174 $\mu$ g= 8 $\pm$ 1 min; 0,116  $\mu$ g= 33 $\pm$ 4 min; p <0,0001), **Figura 7A**. Em se tratando da FC, a primeira alteração (entendida como um aumento de 50 bpm), e a alteração máxima também ocorrem com maior latência no grupo TsTX 0,116 $\mu$ g (**Latência para 1<sup>a</sup>  $\Delta$  FC: 1,74 $\mu$ g= 4 $\pm$ 0 min; 0,174 $\mu$ g= 5 $\pm$ 1 min; 0,116  $\mu$ g= 18 $\pm$ 3 min; p= 0,024); (**Latência para  $\Delta$  FC máx.: 1,74 $\mu$ g= 8 $\pm$ 0 min; 0,174 $\mu$ g= 8 $\pm$ 0 min; 0,116  $\mu$ g= 38 $\pm$ 4 min; p <0,0001), **Figura 7B**. Ao correlacionarmos as latências para a primeira variação e para variação máxima ocorridas na PAM, não observamos correlação entre elas (R= 0,43; p=0,1113), **Figura 7A**. Porém, observamos uma elevada correlação positiva entre as latências para a primeira variação e para variação máxima ocorridas na FC (R= 0,85; p=0,0002), **Figura 7B**. O grupo TsTX 0,087 $\mu$ g não foi inserido nessas análises por não ter apresentado variações significativas nos parâmetros cardiovasculares após a injeção de TsTX.********



**Figura 6:** (A) Variações nos níveis de pressão arterial média (PAM; mmHg) e (B) frequência cardíaca (FC; bpm) antes e após a injeção i.c.v. de diferentes doses (1,74; 0,174; 0,116 e 0,087µg) de TsTX em ratos acordados. Os símbolos e as barras representam média ± EPM, sendo as barras referentes à representação das variações máximas promovidas pelas diferentes doses de TsTX. As linhas tracejadas representam o momento das microinjeções de PBS e TsTX no ventrículo lateral esquerdo. \* Diferença estatística em relação ao grupo 1,74 µg ( $p < 0,05$ , Anova one-way, pós-teste de Dunnett's).



**Figura 7:** Latência para primeira variação (1<sup>a</sup> Δ), latência para variação máxima (Δ máx.), ambas medidas em minutos (min) e correlação entre elas na: (A) pressão arterial média (PAM; mmHg) e (B) frequência cardíaca (FC; bpm), após a injeção i.c.v. de diferentes doses (1,74; 0,174; 0,116 μg) de TsTX em ratos acordados. O grupo TsTX 0,087 μg não foi inserido nessas análises, visto que não apresentou variações nos parâmetros cardiovasculares após a injeção de TsTX. As primeiras variações na PAM e FC foram consideradas, respectivamente, um aumento de 20 mmHg e 50 bpm. As barras representam média ± EPM\*. Diferença estatística em relação ao grupo 1,74 μg (p < 0,05, Anova one-way, pós-teste de Dunnett's). R= Coeficiente de correlação de Spearman. Correlação significativa (p < 0,05).

### ***5.1.2- A influência das injeções i.c.v. de diferentes doses de TsTX sobre a porcentagem de letalidade e o tempo de sobrevivida***

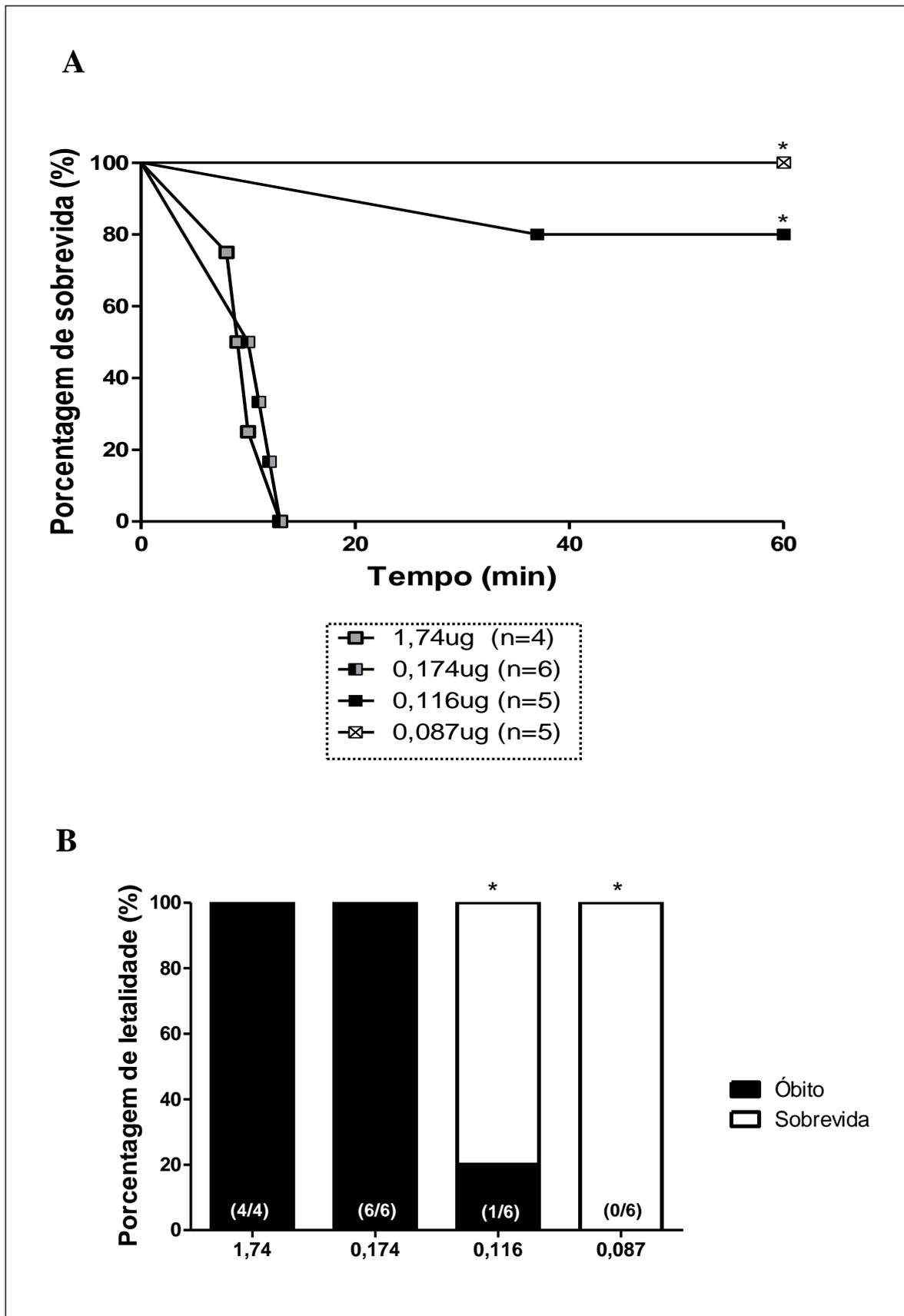
De forma surpreendente, apenas as duas maiores doses de TsTX (1,74 $\mu$ g e 0,174 $\mu$ g) injetadas i.c.v. ocasionaram o óbito de todos os animais em tempos semelhantes, enquanto a dose de 0,087 $\mu$ g não causou o óbito de nenhum animal. A dose de 0,116 $\mu$ g (15 vezes menos concentrada que a maior dose de TsTX), embora tenha produzido respostas pressoras e taquicárdicas ( $\Delta$  máx.) semelhantes às doses de 1,74 $\mu$ g e 0,174 $\mu$ g, apresentou maior tempo de sobrevivida quando comparada às doses maiores (**Figura 8A – Tempo de sobrevivida, Med: Q1/Q3; 1,74 $\mu$ g=9,5:8/12 min; 0,174 $\mu$ g=10,5:10/12 min; 0,116 $\mu$ g= 60:48,5/60 min e 0,087 $\mu$ g= 60:60/60 min;  $p<0,0001$ ). Naturalmente, a porcentagem de letalidade foi menor no grupo TsTX 0,116 $\mu$ g quando comparado aos grupos TsTX 1,74 $\mu$ g e 0,174 $\mu$ g. (**Figura 8B- Porcentagem de letalidade: 1,74 $\mu$ g= 100%; 0,174 $\mu$ g= 100%; 0,116 $\mu$ g= 20% e 0,087 $\mu$ g= 0%,  $p<0,0001$ ).****

### ***5.1.3- A correlação entre as latências para o comprometimento hemodinâmico e cardíaco e o tempo de sobrevivida***

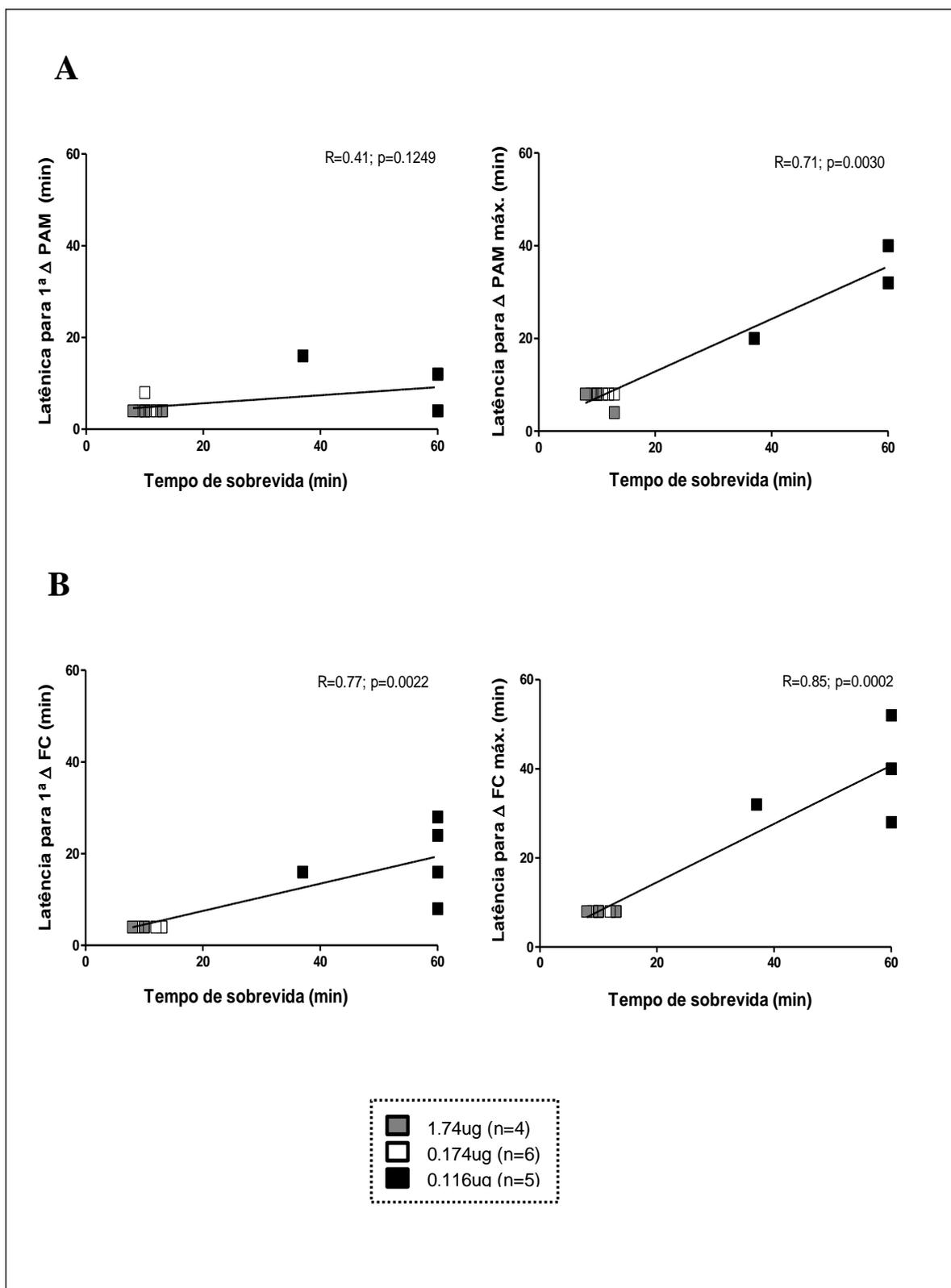
Haja vista que os animais que apresentaram menores latências para primeira alteração e alteração máxima dos parâmetros cardiovasculares também morreram em menor tempo, apresentando 100% de letalidade, optamos por estimar possíveis correlações entre as latências para as alterações dos parâmetros cardiovasculares e o tempo de sobrevivida. Sendo assim, o grupo TsTX 0,087 $\mu$ g novamente não foi inserido às análises por não ter apresentado variações nos parâmetros cardiovasculares após a injeção de TsTX.

Não houve correlação entre a latência para a primeira alteração na PAM e o tempo de sobrevivida dos animais ( $R=0,41$ ;  $p=0,1249$ ). No entanto, houve uma elevada correlação positiva entre a latência para alteração máxima na PAM e o tempo de sobrevivida ( $R=0,71$ ;  $p=0,0030$ ), **Figura 9A**.

Adicionalmente, foram observadas elevadas correlações positivas tanto em relação à latência para a primeira alteração na FC ( $R=0,77$ ;  $p=0,0022$ ), quanto em relação à latência para a variação máxima na FC e o tempo de sobrevivida ( $R=0,85$ ;  $p=0,0002$ ), **Figura 9B**.



**Figura 8:** (A) Porcentagem de sobrevivida (%) em relação ao tempo (min) após injeção i.c.v. de diferentes doses de TsTX em ratos acordados. \*Diferença estatística em relação ao grupo 1,74 μg ( $p < 0,05$ ; estimativa de Kaplan e Meyer, com o teste de Log-rank para a comparação entre as curvas). (B) Porcentagem de letalidade (%) nos grupos TsTX 1,74μg, 0,174μg, 0,116μg e 0,087μg. \*Diferença estatística em relação ao grupo 1,74 μg ( $p < 0,0001$ ; teste exato de Fisher).



**Figura 9:** Correlação entre as latências para a primeira variação ( $1^a \Delta$ ) e para a variação máxima ( $\Delta$  máx.), e o tempo de sobrevivida, referentes à: **(A)** pressão arterial média (PAM) e **(B)** frequência cardíaca (FC) após a injeção i.c.v. de diferentes doses (1,74; 0,174; 0,116  $\mu\text{g}$ ) de TsTX em ratos acordados. O grupo TsTX 0,087 $\mu\text{g}$  não foi inserido nessas análises, visto que não apresentou variações nos parâmetros cardiovasculares após a injeção de TsTX. As primeiras variações na PAM e FC foram consideradas, respectivamente, um aumento de 20mmHg e 50 bpm. R= Coeficiente de correlação de Spearman. Correlação significativa ( $p < 0,05$ ).

Em linhas gerais, os resultados supracitados indicam grande sensibilidade do SNC à toxicidade exercida pela TsTX, além de sugerirem uma relação entre: (i) o recrutamento dose-dependente de estruturas encefálicas e a prematuridade das respostas cardiovasculares e (ii) a gravidade destas repostas (determinada pela amplitude) e o óbito.

Como 0,116 $\mu$ g de TsTX foi a menor dose utilizada capaz de promover alterações cardiovasculares e uma sobrevivência de 60 minutos, optamos por utilizá-la em todos os outros protocolos. Adicionalmente, no intuito de excluir os artefatos de movimento gerados pelas alterações comportamentais decorrentes da ação central da TsTX em animais acordados e, portanto, melhor analisar o comprometimento cardiovascular, também optamos por realizar os demais experimentos em animais anestesiados com uretana.

## **5.2- A influência da injeção i.c.v. de TsTX (0,116 $\mu$ g) sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) e a atividade simpática renal em ratos anestesiados**

Conforme mencionado no protocolo 2, além de termos considerado importante avaliar a influência da injeção i.c.v. de TsTX (0,116 $\mu$ g) sobre a atividade simpática do nervo renal, realizamos este protocolo no intuito de padronizarmos os efeitos cardiovasculares desta dose de TsTX em animais anestesiados. Por isso, o período TsTX foi dividido em: (I) início, (M) meio e (F) fim.

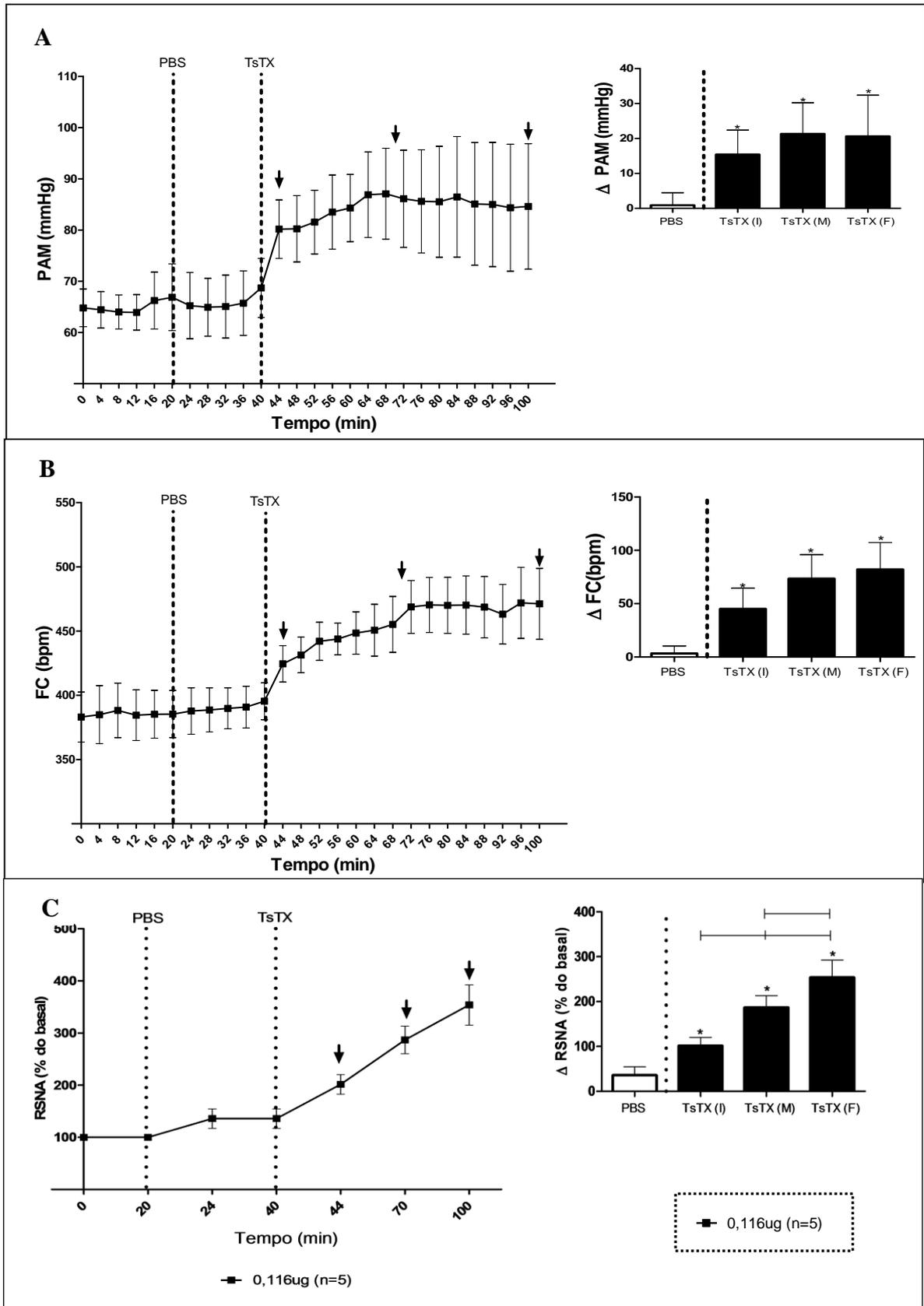
Deste modo, a **Figura 10A** representa o perfil de resposta pressora ao longo do tempo provocado pela microinjeção i.c.v. de 0,116 $\mu$ g de TsTX em ratos anestesiados. Como esperado, não houve alteração nos níveis de PAM durante o período PBS. Contudo, a microinjeção i.c.v. de TsTX promoveu resposta pressora já no período TsTX (I), e a manteve elevada nos demais períodos TsTX (M e F) ( $\Delta$ PAM; PBS = 0,9 $\pm$ 3,6mmHg; TsTX (I) = 15,4 $\pm$ 7 mmHg; TsTX (M) = 21,3 $\pm$ 9 mmHg e TsTX (F) = 20,6 $\pm$ 12mmHg; p = 0,0005), **Figura 10A**.

De maneira semelhante, a **Figura 10B** ilustra o perfil de resposta taquicárdica ao longo do tempo provocado pela microinjeção i.c.v. de 0,116 $\mu$ g de TsTX em ratos anestesiados. Naturalmente, não houve alteração nos níveis de FC durante o período PBS. Contudo, a microinjeção i.c.v. de TsTX promoveu significativa resposta taquicárdica, a qual também se manteve sustentada até o final do experimento,

conforme demonstrado em todos os períodos TsTX ( $\Delta$ FC; **PBS**=  $3,3 \pm 7$ bpm; **TsTX(I)** =  $45 \pm 19,5$ bpm; **TsTX (M)**=  $73,5 \pm 22,5$  bpm e **TsTX (F)** =  $82 \pm 25,3$  bpm;  $p=0,0039$ ), **Figura 10B**.

Adicionalmente, a **Figura 10C** esboça o perfil da atividade simpática para o nervo renal (RSNA), ao longo do tempo, provocado pela microinjeção i.c.v. de  $0,116\mu\text{g}$  de TsTX em ratos anestesiados. Não houve alteração nos níveis de RSNA durante o período PBS. Porém, a microinjeção i.c.v. de TsTX promoveu aumento crescente na amplitude da RSNA, conforme demonstrado em todos os períodos TsTX ( $\Delta$ RSNA, % do basal; **PBS**=  $35,9 \pm 18,5$ ; **TsTX(I)**= $101,4 \pm 18,5$ ; **TsTX (M)**= $186,7 \pm 26,4$  e **TsTX (F)**=  $254 \pm 38,5$ ;  $p < 0,0001$ ), **Figura 10C**.

Em suma, estes dados demonstram que a dose de  $0,116\mu\text{g}$  de TsTX foi eficiente em produzir significativas respostas pressora e taquicárdica, além de aumentar a RSNA, mesmo em animais anestesiados – situação em que ocorre atenuação da modulação simpática. Assim, esses dados sugerem que, mesmo que o anestésico altere a amplitude destas respostas, ele não suprime a ação central da TsTX e seus efeitos periféricos.



**Figura 10:** (A) Níveis de Pressão arterial (PAM; mmHg), (B) de Frequência Cardíaca (FC; bpm) e (C) de Atividade Simpática do nervo renal (RSNA, % do basal) antes e após a injeção i.c.v. de 0,116 $\mu$ g de TsTX em ratos anestesiados com uretana. Os símbolos e as barras representam média  $\pm$  EPM, sendo as últimas, variações de (A) PAM, (B) FC, (C) RSNA (% do basal) nos períodos PBS, TsTX (I), TsTX (M) e TsTX (F). As linhas tracejadas representam as microinjeções, e, as setas, as subdivisões do período TsTX. \*, Diferença estatística em relação ao período PBS ( $p < 0,05$ , Anova one-way, pós-teste de Newman-Keuls). -, Diferença estatística entre os períodos demarcados ( $p < 0,05$ , Anova one-way, pós-teste de Newman-Keuls).

### 5.3- A participação do HDM nas repostas cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX (0,116µg)

Para avaliarmos a participação do HDM sobre as repostas fisiológicas induzidas pela ação central da TsTX, nós investigamos a influência dos receptores: 1) GABAérgicos (GABA<sub>A</sub>) e 2) glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA e AMPA/kainato) deste núcleo sobre tais repostas.

A caracterização dos parâmetros fisiológicos basais não mostrou diferenças significativas entre a PAM e FC dos grupos avaliados (**Tabela 3**).

**Tabela 3-** Média dos valores basais da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), considerando as séries experimentais em animais anestesiados.

	HDM PBS (n=5)	HDM Muscimol (n=5)	HDM Mistura (n=5)	HDM AP5 (n=6)	HDM CNQX (n=5)
PAM basal (mmHg)	78±3	81±6	82±6	95±6	83±5
FC basal (bpm)	383±8	384±21	381±17	384±12	388±9

As médias dos valores basais de PAM e FC não foram significativamente diferentes entre os grupos. A análise estatística foi realizada por ANOVA One-way, seguido do pós-teste de Dunnett's. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média; n = número de ratos.

#### 5.3.1- Efeitos da ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> do HDM sobre a hipertensão e taquicardia evocadas pela injeção de TsTX

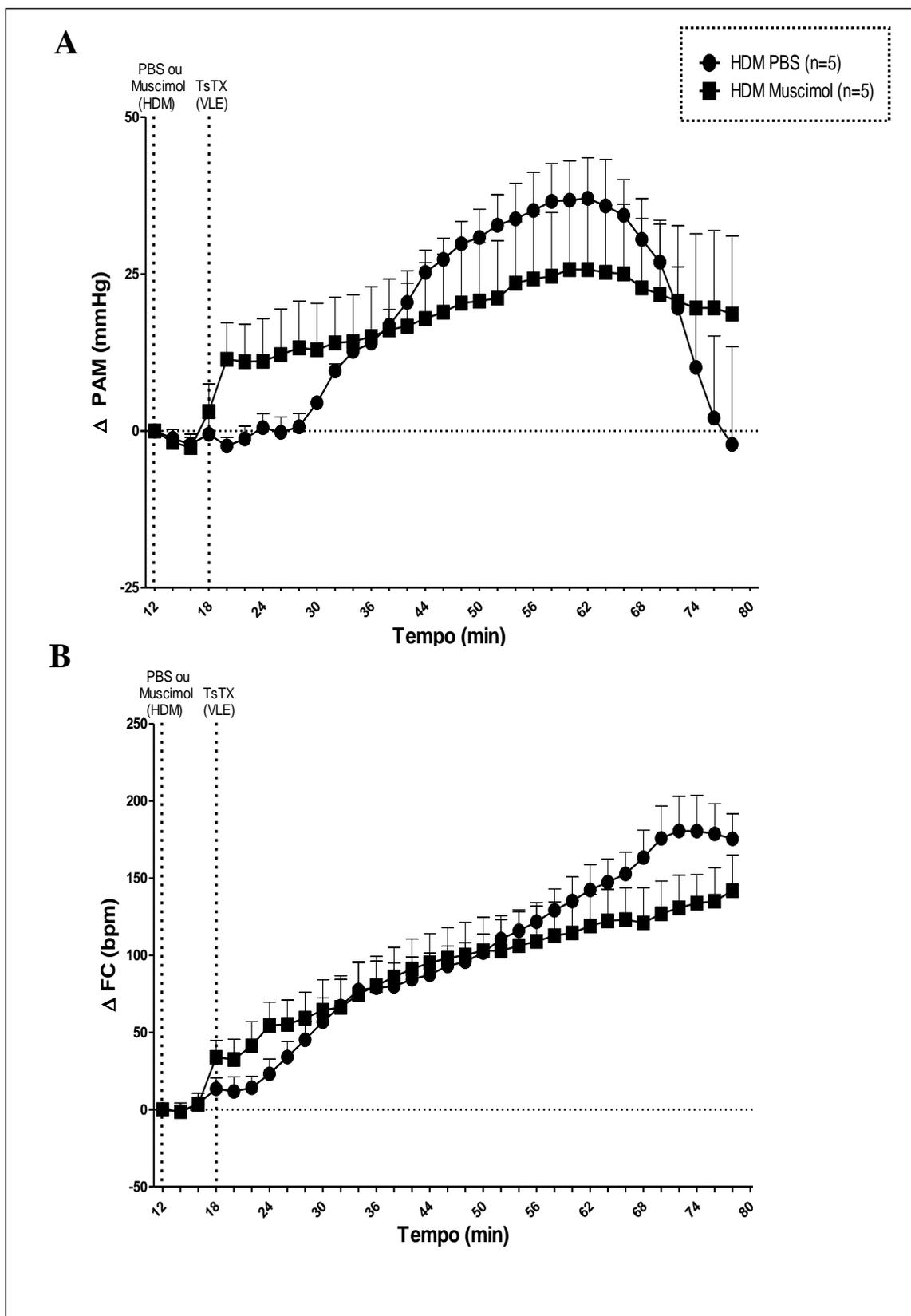
Como esperado, a injeção de TsTX (0,116µg/µL, i.c.v) evocou elevadas repostas pressora e taquicárdica em todos os animais, os quais receberam, previamente, injeções bilaterais de PBS no HDM (HDM PBS= Δ PAM máx.: 37±7 mmHg; tempo 58 min, p<0,05; e Δ FC máx.: 181±22 bpm; tempo 72 min, p<0,05, Anova one-way, pós-teste de Dunnett), respectivamente, **Figuras 11A e 11B**.

Porém, a ativação dos receptores GABA<sub>A</sub>, por meio de injeções bilaterais de muscimol (100pmol/100nL) no HDM, não modificou o perfil das repostas cardiovasculares evocadas pela TsTX (para tratamento, HDM PBS vs. HDM muscimol; Δ PAM:  $F_{(1,264)} = 0,03$ , p>0,05), ΔFC:  $F_{(1,264)} = 3,06$ , p>0,05), respectivamente, **Figuras 11A e 11B**.

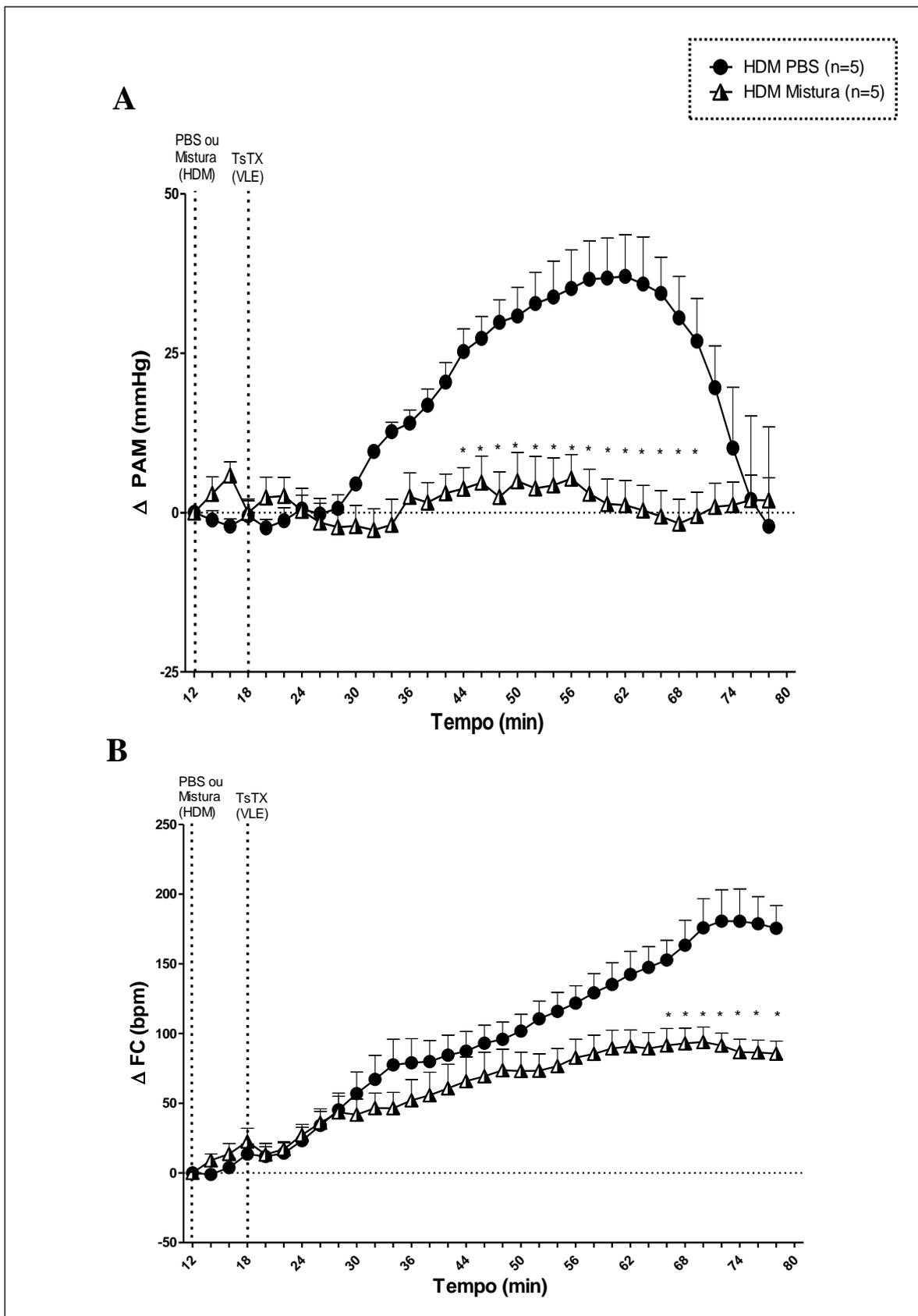
### ***5.3.2- Efeitos do bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM sobre a hipertensão e taquicardia evocadas pela injeção de TsTX***

A injeção da mistura de AP5 e CNQX (respectivamente, antagonistas de receptores NMDA e AMPA/Kainato: 100pmol+100pmol/100nL) no HDM extinguiu a resposta pressora e diminuiu significativamente a resposta taquicárdica produzidas pela TsTX (para tratamento, HDM PBS vs. HDM mistura;  $\Delta$ PAM:  $F_{(1, 264)} = 175,7$ ;  $p < 0,0001$ ,  $\Delta$ FC:  $F_{(1, 264)} = 105,1$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente, **Figuras 12A e 12B**). Adicionalmente, a injeção isolada de AP5 (antagonista de receptores NMDA: 200pmol/100nL) no HDM aboliu as respostas cardiovasculares evocadas pela TsTX (para tratamento HDM PBS vs. HDM AP5;  $\Delta$ PAM:  $F_{(1, 297)} = 404,8$ ;  $p < 0,0001$ ,  $\Delta$ FC:  $F_{(1, 264)} = 986,3$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente, **Figuras 13A e 13B**). Do mesmo modo, a injeção isolada de CNQX (antagonista de receptores AMPA/Kainato: 200pmol/100nL) no HDM também eliminou as alterações cardiovasculares decorrentes da injeção i.c.v. de TsTX (para tratamento HDM PBS vs. HDM CNQX;  $\Delta$ PAM:  $F_{(1, 264)} = 293,3$ ;  $p < 0,0001$ ,  $\Delta$ FC:  $F_{(1, 264)} = 105,1$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente, **Figuras 14A e 14B**).

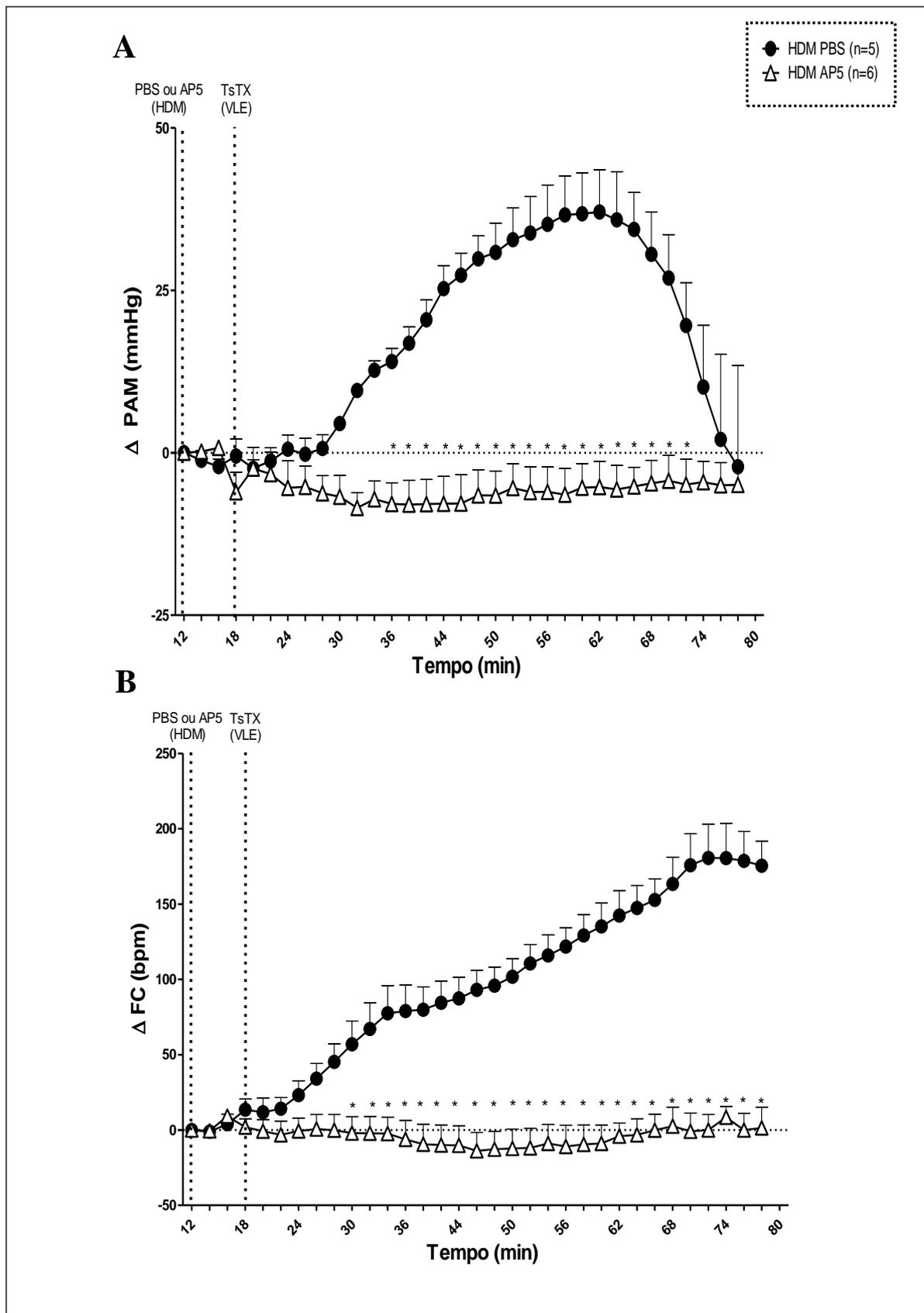
Em resumo, estes resultados evidenciam a importante participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM sobre a hipertensão e taquicardia observadas no envenenamento escorpiônico.



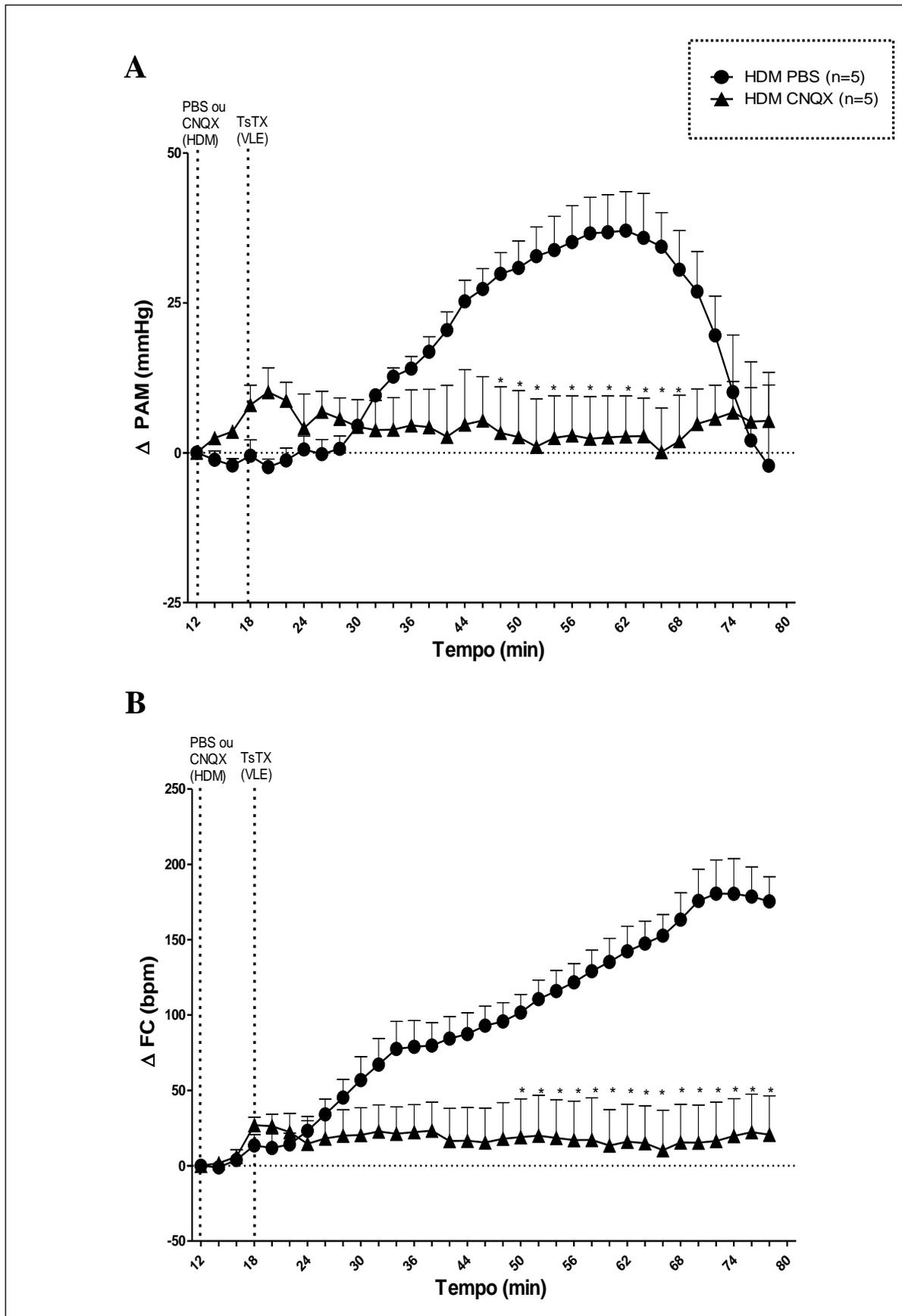
**Figura 11:** Efeito da ativação dos receptores  $GABA_A$  do HDM sobre as respostas cardiovasculares evocadas pela injeção i.c.v. de TsTX em ratos anestesiados com uretana. (A) Pressão arterial média (PAM, mmHg) and (B) Frequência cardíaca (FC, bpm) após a injeção bilateral de PBS (100nL) ou muscimol (100pmol/100nL) no HDM e injeção de TsTX no ventrículo lateral esquerdo (VLE). Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. As linhas pontilhadas ilustram as microinjeções de PBS ou muscimol no HDM, e TsTX no VLE.



**Figura 12:** Efeito do bloqueio de todos os subtipos de receptores glutamatergicos ionotrópicos do HDM sobre as respostas cardiovasculares evocadas pela injeção i.c.v. de TsTX em ratos anestesiados com uretana. (A) Pressão arterial média (PAM, mmHg) and (B) Frequência cardíaca (FC, bpm) após a injeção bilateral de PBS (100nL) ou da mistura de AP5 e CNQX (100pmol+ 100pmol/100nL) no HDM e injeção de TsTX no ventrículo lateral esquerdo (VLE). Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. \*Diferença estatística entre HDM PBS e HDM Mistura ( $p < 0,05$ ; ANOVA two-way, pos-teste de Bonferroni). As linhas pontilhadas ilustram as microinjeções de PBS ou mistura no HDM, e TsTX no VLE.



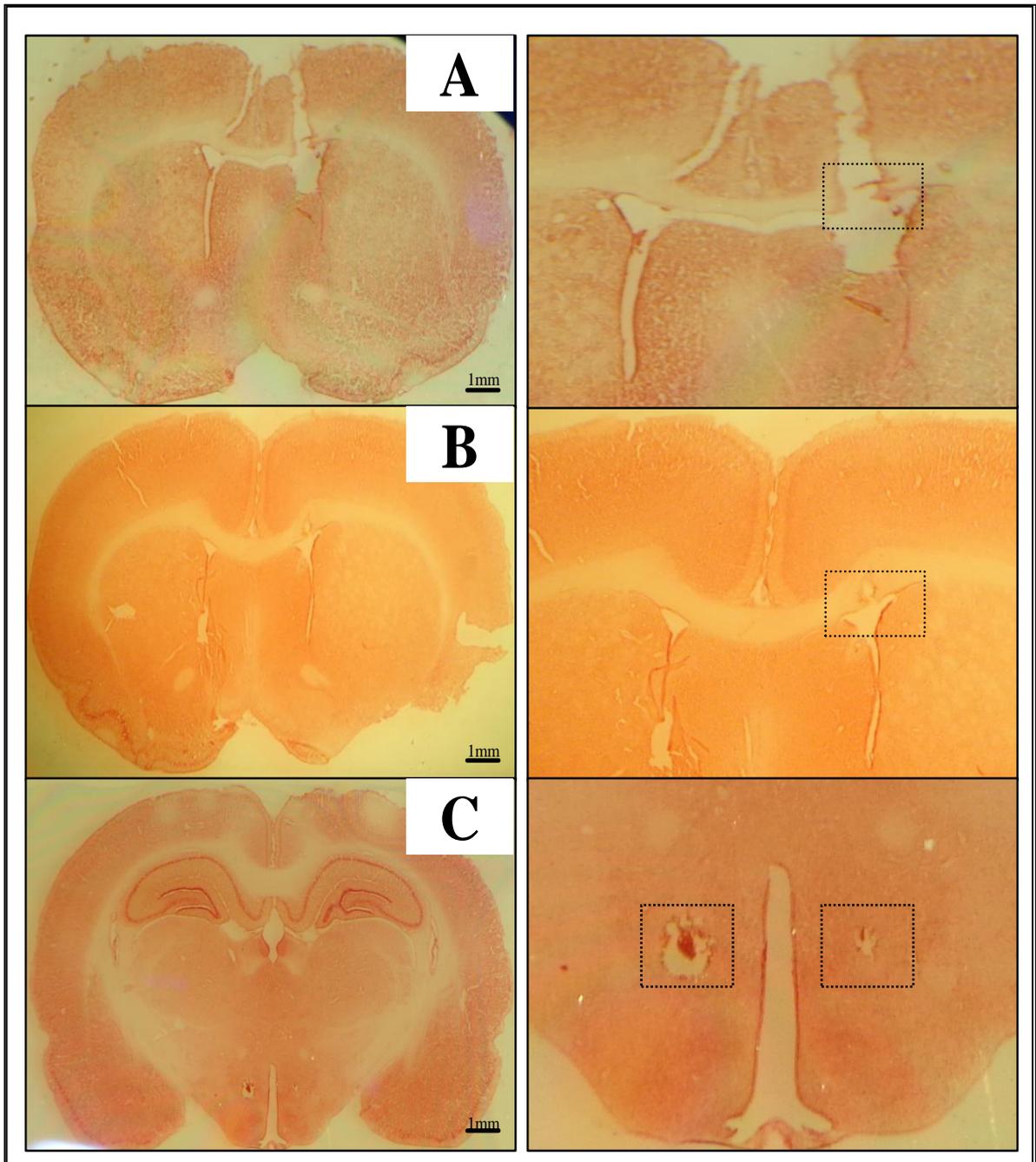
**Figura 13:** Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares evocadas pela injeção i.c.v. de TsTX em ratos anestesiados com uretana. **(A)** Pressão arterial média (PAM, mmHg) and **(B)** Frequência cardíaca (FC, bpm) após a injeção bilateral de PBS (100nL) ou de AP5 (200pmol/100nL) no HDM e injeção de TsTX no ventrículo lateral esquerdo (VLE). Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. \*Diferença estatística entre HDM PBS e HDM AP5 ( $p < 0,05$ ; ANOVA two-way, pos-teste de Bonferroni). As linhas pontilhadas ilustram as microinjeções de PBS ou AP5 no HDM, e TsTX no VLE.



**Figura 14:** Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos AMPA/Kainato do HDM sobre as respostas cardiovasculares evocadas pela injeção i.c.v. de TsTX em ratos anestesiados com uretana. **(A)** Pressão arterial média (PAM, mmHg) and **(B)** Frequência cardíaca (FC, bpm) após a injeção bilateral de PBS (100nL) ou de CNQX (200pmol/100nL) no HDM e injeção de TsTX no ventrículo lateral esquerdo (VLE). Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. \*Diferença estatística entre HDM PBS e HDM CNQX ( $p < 0,05$ ; ANOVA two-way, pos-teste de Bonferroni). As linhas pontilhadas ilustram as microinjeções de PBS ou CNQX no HDM, e TsTX no VLE.

## 5.4- Confirmação dos sítios de microinjeção

A **figura 15** evidencia os sítios de microinjeção no ventrículo lateral esquerdo de ratos acordados (**A**) e anestesiados (**B**) e no hipotálamo dorsomedial esquerdo e direito (**C**).



**Figura 15:** Fotomicrografia de secções coronais do encéfalo de rato Wistar, com os respectivos sítios de microinjeção: **(A)** VLE (rato acordado), **(B)** VLE (rato anestesiado) e **(C)** no hipotálamo direito e esquerdo. Método de coloração: vermelho neutro.

## 6- DISCUSSÃO

Ao longo deste estudo, observamos diversos efeitos decorrentes da injeção i.c.v. de doses muito baixas de TsTX, tanto em ratos acordados, quanto em anestesiados. Assim, nossos principais achados foram: (i) a comprovação de uma elevada sensibilidade do SNC à toxicidade exercida pela TsTX, mesmo em doses mínimas; (ii) a relação dose-dependente entre o recrutamento de estruturas encefálicas e o comprometimento cardiovascular (elevação da PAM e FC); (iii) a constatação de uma alta correlação positiva entre a prematuridade das alterações no ritmo cardíaco e a latência para o agravo destas respostas (determinada pela amplitude máxima da FC); (iv) a evidente e elevada correlação positiva entre a latência para o agravo das respostas pressora e taquicárdica, e o tempo de sobrevida; (v) o aumento da responsividade do nervo simpático renal e (vi) a fundamental participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos nas respostas hipertensiva e taquicárdica mediadas pela ação central da TsTX.

Inicialmente, no intuito de avaliarmos a participação do SNC na gênese das alterações cardiovasculares observados no envenenamento escorpiónico, realizamos uma curva dose-resposta com doses mínimas de TsTX. Em seguida, investigamos a influência das injeções i.c.v. destas doses (1,74 $\mu$ g; 0,174 $\mu$ g; 0,116 $\mu$ g e 0,087 $\mu$ g) sobre a PAM, FC, porcentagem de letalidade e tempo de sobrevida; e a possível correlação temporal entre estes parâmetros, em ratos acordados.

Corroborando outros trabalhos, nossos resultados mostraram que injeções centrais de TsTX produziram evidentes repostas pressora e taquicárdica semelhantes às observadas em estudos em que a administração de TsTX foi periférica (Guidine, Moraes-Santos, 2008c, Mesquita, Moraes-Santos, 2003, Silva, Guidine, 2013). Tal fato sustenta a hipótese de que os efeitos cardiovasculares causados pelas toxinas escorpiónicas são, parcialmente, mediados pelo SNC. Embora as três maiores doses de TsTX tenham ocasionado alterações cardiovasculares de mesma amplitude, o perfil e latência com que ocorreram foram diferentes. As doses de 1,74 e 0,174  $\mu$ g de TsTX produziram respostas idênticas: hipertensão e taquicardia iniciais, seguidos de hipotensão e bradicardia terminais – manifestações cardiovasculares típicas do envenenamento escorpiónico grave (Abdoon and Fatani, 2009, Lima and Freire-Maia, 1977, Silva, Guidine, 2013). A dose de 0,116 $\mu$ g causou hipertensão e taquicardia sustentadas, respectivamente, até o final do registro e por 50 min após a injeção de

TsTX, bem como ocorreu com as duas menores doses (2,5 e 5 $\mu$ g) utilizadas por Lima et al. em um estudo experimental precursor, onde a TsTX foi injetada i.c.v em ratos anestesiados (Lima and Freire-Maia, 1977). Já a dose de 0,087 $\mu$ g não causou mudanças significativas na PAM e FC. Tanto a primeira alteração, quanto a alteração máxima observadas na PAM e FC, ocorreram com maior latência no grupo TsTX 0,116 $\mu$ g, em relação aos grupos injetados com doses maiores de TsTX. Ao detectarmos que as latências para o aparecimento e agravamento das manifestações cardiocirculatórias era o que diferenciava os grupos, resolvemos correlacioná-las. Deste modo, observamos uma elevada correlação positiva entre as latências para a primeira variação e para variação máxima ocorridas na FC. Novamente, como proposto por Lima et al., no estudo previamente citado, no qual doses de TsTX (aproximadamente 20 vezes maiores) foram injetadas i.c.v. (Lima and Freire-Maia, 1977), esses resultados sugerem uma relação dose-dependente entre o recrutamento de núcleos encefálicos e o comprometimento cardiovascular, e evidenciam a associação entre a prematuridade das alterações no ritmo cardíaco e a latência para o agravamento destas respostas.

Nós também investigamos a influência da ação central da TsTX sobre a porcentagem de letalidade e o tempo de sobrevivência. De modo surpreendente, apenas as doses de 1,74 $\mu$ g e 0,174 $\mu$ g de TsTX ocasionaram o óbito em 100% dos animais em tempos semelhantes, enquanto a dose de 0,087 $\mu$ g não causou o óbito de nenhum animal. A dose de 0,116 $\mu$ g, embora tenha produzido variações máximas na PAM e FC, análogas às doses maiores, apresentou menor porcentagem de letalidade e maior tempo de sobrevivência. Neste contexto, optamos por estimar possíveis correlações entre as latências para as alterações dos parâmetros cardiovasculares e o tempo de sobrevivência. Curiosamente, observamos elevada correlação positiva entre: (i) a latência para alteração máxima na PAM e o tempo de sobrevivência e (ii) as latências para a primeira alteração e para a variação máxima na FC e o tempo de sobrevivência. Esses dados, que a longo prazo talvez possam ser usados como preditores do comprometimento cardiovascular e do óbito nos envenenamentos escorpionícos graves, são corroborados por estudos de Guidine et al., que comprovaram a correlação entre descargas de alta amplitude no NTS, alterações eletrocardiográficas (por ex.: bloqueios atrioventriculares de diferentes graus, batimentos ectópicos, taquicardia ou bradicardia sinusal e despolarização atrial e ventricular prematuras) e tempo de sobrevivência em ratos jovens injetados s.c. com TsTX (6mg/kg) (Guidine, Mesquita, 2009). Porém, nosso estudo foi o primeiro que avaliou, em ratos acordados, a influência da ação central de doses muito

baixas de TsTX sobre aferições diretas de PAM e as correlacionou ao tempo de sobrevida.

Como 0,116µg de TsTX foi a menor dose capaz de promover alterações cardiovasculares mantendo a sobrevida do animal por 60 minutos, optamos por utilizá-la em todos os outros protocolos. Adicionalmente, no intuito de excluirmos os artefatos de movimento gerados pelas alterações comportamentais (por ex.: tremores, convulsões, saltos, giros, dentre outros) decorrentes da ação central da TsTX em animais acordados e, portanto, melhor analisarmos o comprometimento cardiovascular, também optamos por realizar os demais experimentos em animais anestesiados com uretana. Diante disso, foi necessário padronizarmos os efeitos cardiovasculares decorrentes da injeção central de TsTX em animais anestesiados. Para tal, avaliamos a influência da injeção i.c.v. de 0,116µg de TsTX sobre a atividade simpática renal e os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC). Legitimando os estudos pioneiros de Lima et al, nossos resultados revelaram que essa dose de TsTX promoveu resposta pressora e taquicárdica em ratos anestesiados (Lima and Freire-Maia, 1977), e, de maneira inovadora, demonstrou o aumento crescente na amplitude da RSNA. De fato, durante o envenenamento escorpiônico, ocorre uma hiperestimulação do SNA, com predomínio da subdivisão simpática e liberação tecidual de catecolaminas, as quais podem tanto ser liberadas pela medula adrenal quanto pela estimulação das terminações simpáticas periféricas, (Freire-Maia, Pinto, 1974, Ismail, 1994, 1995, Ito, Nakazato, 1981), incluindo as terminações simpáticas para o nervo renal. Ademais, estudos experimentais em ratos evidenciaram que a ativação dos neurônios do HDM, como sugerimos acontecer no envenenamento escorpiônico grave, resultam em aumento da atividade simpática para os leitos cardíaco e renal (Fontes, Menezes, 2006). Em síntese, demonstramos que injeções i.c.v. de TsTX (0,116µg) foram eficientes em produzir significativas respostas pressora e taquicárdica, além de aumentar a RSNA, inclusive em animais anestesiados- situação em que ocorre atenuação da modulação simpática (Hara and Harris, 2002). Deste modo, a exclusiva ação da TsTX sobre o SNC pode justificar as alterações periféricas observadas nos casos graves de envenenamento pelo escorpião *Tityus serrulatus* (Mesquita, Moraes-Santos, 2003).

Desde os anos 2000, pesquisadores retomaram a investigação sobre as consequências periféricas das injeções centrais da TsTX, apontando a natureza neurogênica destas respostas. Neste sentido, foi comprovado que a injeção i.c.v. de TsTX, em ratos, produziu edema pulmonar, o qual foi eliminado com a injeção i.m. de

fenobarbital (um agonista GABA<sub>A</sub>) (Mesquita, Moraes-Santos, 2002). Além disso, a injeção i.c.v. de TsTX causou descargas epileptiformes corticais precoces correlacionadas temporalmente à arritmias cardíacas, seguidas de morte. (Guidine, Moraes-Santos, 2008c). Esse mesmo grupo de pesquisadores evidenciou algo surpreendente: tais descargas epileptiformes corticais ocorreram com maior latência quando comparadas às descargas observadas no NTS de ratos jovens submetidos à injeção s.c. de TsTX (Guidine, Mesquita, 2009). Tal fenômeno pode justificar porque as alterações neurológicas são menos comuns e/ou constatadas mais tardiamente que o comprometimento cardiovascular no envenenamento escorpiônico (Ministério da Saúde, 2001), uma vez que o registro eletroencefalográfico, em humanos, é realizado por eletrodos corticais. Todos esses sintomas observados por Guidine et al. foram prevenidos por injeções i.p. de carbamazepina (um bloqueador de canais para sódio dependentes de voltagem) (Guidine, Mesquita, 2009, Guidine, Moraes-Santos, 2008c). Em outro estudo, a injeção i.c.v. de TsTX marcada com agente fluorescente, Alexa Fluor 568, produziu intenso sinal fluorescente em todas as áreas periventriculares, principalmente em neurônios do tronco cerebral (Guidine, Cash, 2014). Deste modo, os resultados obtidos em nosso estudo associados a resultados previamente publicados, demonstram que o SNC exerce uma participação crucial na gravidade da intoxicação pelo veneno escorpiônico.

Por fim, baseando nos resultados descritos acima e no fato da ativação do HDM produzir respostas cardiovasculares e comportamentais (DiMicco, Stotz-Potter, 1996, Graeff, 1990, Jardim and Guimaraes, 2001) similares àquelas induzidas pela injeção i.c.v. de TsTX (Guidine, Moraes-Santos, 2008c, Mesquita, Moraes-Santos, 2002, Silva, Guidine, 2013), nós investigamos a contribuição dos neurônios do HDM sobre as respostas cardiocirculatórias induzidas pela injeção i.c.v. de TsTX em ratos anestesiados. Assim, nós avaliamos o efeito da inibição química do HDM sobre tais respostas utilizando dois protocolos: 1) ativação dos receptores GABAérgicos, por meio da injeção de agonista GABA<sub>A</sub>; e 2) bloqueio de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, por meio da injeção de antagonistas de receptores NMDA e AMPA/Kainato.

Primeiramente, investigamos os efeitos da ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela ação central da TsTX. A microinjeção bilateral de muscimol (agonista GABA<sub>A</sub>) no HDM não alterou o perfil de respostas pressora e taquicárdica induzidas pela injeção de TsTX em ratos anestesiados com

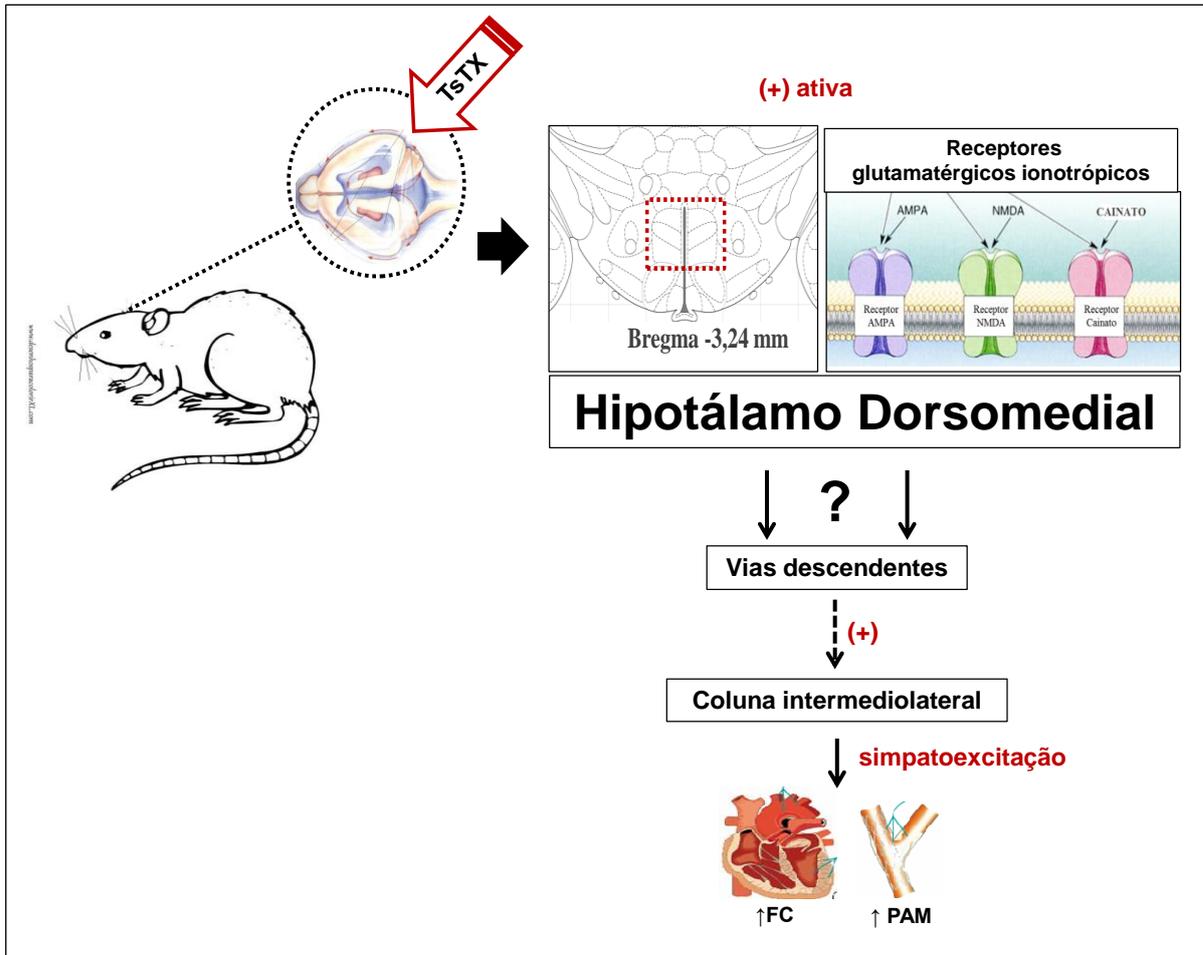
uretana. Notavelmente, a TsTX aumenta o tempo de despolarização dos CSVD e, conseqüentemente, induz excessiva liberação de neurotransmissores, tais como: dopamina e glutamato (Fernandes, Massensini, 2004, Massensini, Moraes-Santos, 1998, Nencioni et al. , 2003). A hiperexcitabilidade neuronal (neste caso mediada pela TsTX) promove um desequilíbrio entre a excitação e inibição cerebral, favorecendo a excitação (Fisher and Coyle, 1991) e sustenta a susceptibilidade do SNC à danos neurológicos desencadeados pela ação central da TsTX (Guidine et al. , 2008a, Guidine, Mesquita, 2009, Guidine et al. , 2008b, Guidine, Moraes-Santos, 2008c, Lima and Freire-Maia, 1977, Mesquita, Moraes-Santos, 2003, Nencioni et al. , 2009, Sandoval and Lebrun, 2003). Deste modo, é plausível considerar que a hiperexcitabilidade, induzida pela excessiva liberação de glutamato, pode não ser contrabalanceada pela ativação dos receptores GABA<sub>A</sub>, o que pode explicar, parcialmente, porque a injeção bilateral de muscimol no HDM não alterou as respostas evocadas pela TsTX. Também seria razoável conjecturar que a uretana tivesse influenciado nossos resultados. Contudo, consideramos tal hipótese improvável, visto que, injeções de muscimol no HDM, acentuadamente, reverteram o aumento na FC e na temperatura corporal causada pela injeção de prostaglandina E2 na área pré-óptica em ratos anestesiados com uretana (Zaretskaia et al. , 2003); sugerindo, portanto, que o anestésico não alterou a farmacodinâmica do muscimol no HDM de ratos anestesiados.

No intuito de avaliarmos a hipótese de que hiperexcitabilidade do HDM, induzida pela liberação excessiva de glutamato, é essencial para indução das manifestações cardiocirculatórias evocadas pela injeção i.c.v. de TsTX, nós testamos o efeito do bloqueio dos diferentes tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA e AMPA/Kainato) presentes no HDM, por meio de uma mistura ou separadamente. Injeções da mistura dos antagonistas de receptores NMDA e AMPA/Kainato (AP5 e CNQX, respectivamente) no HDM aboliram a resposta hipertensiva e diminuíram as alterações cronotrópicas produzidas pela injeção de TsTX. Em seguida, quando bloqueamos os receptores NMDA do HDM por meio das injeções isoladas de AP5, as respostas produzidas pela ação da TsTX foram completamente eliminadas. Similarmente, injeções isoladas de CNQX também resultaram na supressão destas respostas. A mistura utilizada, cuja concentração foi baseada na literatura (de Menezes, Zaretsky, 2009), não foi totalmente eficaz em reduzir alterações na FC, como ocorreu com os antagonistas isolados, provavelmente porque a dose da mistura correspondeu à metade das doses usadas nos experimentos em que os antagonistas

foram injetados separadamente. Adicionalmente, variáveis como a hiperestimulação glutamatérgica induzida pela TsTX e a diferente sensibilidade entre as respostas pressoras e cronotrópicas podem ser úteis na explicação desses resultados. Neste sentido, doses mais altas da mistura seriam cruciais para bloquear totalmente a taquicardia.

É bem estabelecido que a TsTX inibe a inativação dos CSDV e aumenta a liberação de aminoácidos excitatórios (AAE) (Possani et al. , 1999). Ademais, injeções de AAE no HDM produzem aumento na PAM e FC (De Novellis et al. , 1995, Soltis and DiMicco, 1991a, b), enquanto o bloqueio dos receptores de AAE no HDM suprime as respostas cardiovasculares evocadas pela injeção de antagonista de receptor GABA<sub>A</sub> na mesma região (Soltis and DiMicco, 1991b). Outros estudos tem mostrado que as respostas cardiocirculatórias desencadeadas pela ativação da coluna dorsolateral da PAG dependem da atividade neuronal do HDM (de Menezes, Zaretsky, 2009, Horiuchi, McDowall, 2009), apontando a participação da neurotransmissão glutamatérgica na modulação de tais respostas durante as reações de defesa (Jardim and Guimaraes, 2001). De fato, os subtipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos estão amplamente presentes no hipotálamo, com elevada expressão na região dorsomedial (Meeker et al. , 1994). Adicionalmente, os antagonistas de receptores NMDA e AMPA/Kainato demonstram um extensivo espectro anticonvulsivante e neuroprotetor (Nencioni, Lebrun, 2003). Injeções de antagonistas de receptores glutamatérgicos parcialmente/totalmente bloqueiam os efeitos convulsivos e neurodegenerativos produzidos pela injeção de TsTX no hipocampo de ratos acordados (Nencioni, Lebrun, 2003).

Assim, considerando os nossos resultados e os achados previamente publicados na literatura, nós sugerimos que a resposta pressora e a taquicardia induzidas pela injeção i.c.v. da TsTX dependem da ativação dos receptores NMDA e AMPA/Kainato presentes nos neurônios do HDM, conforme representado na **Figura 16**. Neste contexto, nosso trabalho contribui para um novo entendimento acerca dos mecanismos neuroanatômicos e neuroquímicos envolvidos na fisiopatologia da síndrome do envenenamento escorpiónico grave.



**Figura 16:** Representação da participação do hipotálamo dorsomedial (HDM) nas respostas cardiovasculares promovidas pela injeção i.c.v. de TsTX em ratos. A ativação de receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA/kainato do HDM, ocorrida após injeção i.c.v. da TsTX, gera estímulos que possivelmente ativam núcleos descendentes de controle cardiovascular. Estes fazem sinapses excitatórias com a coluna intermediolateral e, conseqüentemente, aumentam a atividade simpática cardíaca e vasomotora, elevando, portanto, a frequência cardíaca e a pressão arterial.

## **7- CONCLUSÕES**

Injeções i.c.v. de doses muito baixas de Tityustoxina reforçam a elevada sensibilidade do SNC aos seus efeitos tóxicos, e sugerem: (i) uma relação dose-dependente entre o recrutamento de núcleos encefálicos e o comprometimento cardiovascular (aumento de PAM e FC), (ii) uma elevada correlação positiva entre a prematuridade das alterações no ritmo cardíaco e a latência para o agravamento destas respostas (determinada pela amplitude máxima da FC); (iii) uma evidente e elevada correlação positiva entre a latência para o agravamento das respostas pressora e taquicárdica, e o tempo de sobrevivência; (iv) o aumento da responsividade do nervo simpático renal e (v) a essencial participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos nas respostas hipertensiva e taquicárdica mediadas pela ação central da TsTX.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdoon NA, Fatani AJ. Correlation between blood pressure, cytokines and nitric oxide in conscious rabbits injected with *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* scorpion venom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2009;54:471-80.

Abroug F, ElAtrous S, Noura S, Haguiga H, Touzi N, Bouchoucha S. Serotherapy in scorpion envenomation: a randomised controlled trial. *Lancet*. 1999;354:906-9.

Azevedo AD, Silva AB, Cunha-Melo JR, Freire-Maia L. Cardiovascular and respiratory effects induced by a purified scorpion toxin (tityustoxin) in unanesthetized rats. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1983;21:753-9.

Bahloul M, Bouaziz M, Dammak H, Ben Hamida C, Ksibi H, Rekik N, et al. Value of the plasma protein and hemoglobin concentration in the diagnosis of pulmonary edema in scorpion sting patients. *Intensive Care Med*. 2002;28:1600-5.

Bailey TW, Dimicco JA. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2001;280:R8-15.

Barhanin J, Giglio JR, Leopold P, Schmid A, Sampaio SV, Lazdunski M. *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. Tityus gamma toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem*. 1982;257:12553-8.

Becerril B, Marangoni S, Possani LD. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1997;35:821-35.

Bernard C. Lecture on the physiology of the heart and its connections with the brain Savannah, Purse. Sorbonne: By J.S. Morel; 1867

Campolina D. Georreferenciamento e estudo clínico-epidemiológico dos acidentes escorpiônicos atendidos em Belo Horizonte, no Serviço de Toxicologia de Minas Gerais [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.

Cannon WB. *The Wisdom of the Body*. . New York:: W.W. Norton; 1939.

Cao W, Morrison SF. Disinhibition of rostral raphe pallidus neurons increases cardiac sympathetic nerve activity and heart rate. *Brain Research* 2003;980:1-10.

Casali TA, Gomez RS, Moraes-Santos T, Gomez MV. Differential effects of calcium channel antagonists on tityustoxin and ouabain-induced release of [3H]acetylcholine from brain cortical slices. *Neuropharmacology*. 1995;34:599-603.

Catterall WA. Modulation of sodium and calcium channels by protein phosphorylation and G proteins. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1997;31:159-81.

Celeste Henriques M, Gazzinelli G, Diniz CR, Gomez MV. Effect of the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* on adrenal gland catecholamines. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1968;5:175-9.

Clot-Faybesse O, Guieu R, Rochat H, Devaux C. Toxicity during early development of the mouse nervous system of a scorpion neurotoxin active on sodium channels. *Life sciences*. 2000;66:185-92.

Cupo P, Hering SE. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2002;40:823-30.

Cupo P, Jurca M, Azeedo-Marques MM, Oliveira JS, Hering SE. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1994;36:67-76.

Dampney RA, Tagawa T, Horiuchi J, Potts PD, Fontes M, Polson JW. What drives the tonic activity of presympathetic neurons in the rostral ventrolateral medulla? *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2000;27:1049-53.

De Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MA, DiMicco JA. Microinjection of muscimol into caudal periaqueductal gray lowers body temperature and attenuates increases in temperature and activity evoked from the dorsomedial hypothalamus. *Brain research*. 2006;1092:129-37.

De Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MA, DiMicco JA. Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. *J Physiol*. 2009;587:1201-15.

De Menezes RC, Zaretsky DV, Sarkar S, Fontes MA, Dimicco JA. Microinjection of muscimol into the periaqueductal gray suppresses cardiovascular and neuroendocrine response to air jet stress in conscious rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008;295:R881-90.

De Novellis V, Stotz-Potter EH, Morin SM, Rossi F, DiMicco JA. Hypothalamic sites mediating cardiovascular effects of microinjected bicuculline and EAAs in rats. *The American journal of physiology*. 1995;269:R131-40.

Dehesa-Davila M, Possani LD. Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1994;32:1015-8.

Del Pozo EC. [Pharmacology of venoms of Mexican Centruroides]. *Revista de investigacion en salud publica*. 1968;28:51-66.

DiMicco JA, Stotz-Potter EH, Monroe AJ, Morin SM. Role of the dorsomedial hypothalamus in the cardiovascular response to stress. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 1996;23:171-6.

Diniz CR, Gonçalves JM. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*. 1960;41:470-7.

Dorce VA, Sandoval MR. Effects of *Tityus serrulatus* crude venom on the GABAergic and dopaminergic systems of the rat brain. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1994;32:1641-7.

Efrati P. Poisoning by scorpion stings in Israel. *Am J Trop Med Hyg*. 1949;29:249-57.

Efrati P. Acute hypothalamic discharge in man due to scorpion stings. *Confinia neurologica*. 1951;11:152-67.

Fan HW, Cardoso JLC, Araújo FAA. Epidemiology of scorpion envenomations in Brazil. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1994;34:160-1.

Fatani AJ, Harvey AL, Furman BL, Rowan EG. The effects of lignocaine on actions of the venom from the yellow scorpion "*Leiurus quinquestriatus*" in vivo and in vitro. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2000;38:1787-801.

Fernandes VM, Massensini AR, Prado MA, Silva MA, Moraes-Santos T, Gomez MV. Effects of alpha-scorpion toxin, tityustoxin on the release of [<sup>3</sup>H] dopamine of rat brain prefrontal cortical slices. *Neurochem Int*. 2004;44:91-7.

Fisher RS, Coyle T. Summary: neurotransmitters and epilepsy. In: Fisher RS, Coyle T, editors. *Neurotransmitters and epilepsy*. New York: Wiley-Liss; 1991. p. 247-52.

Fontes MA, Tagawa T, Polson JW, Cavanagh SJ, Dampney RA. Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2001;280:H2891-901.

Fontes MA, Xavier CH, de Menezes RC, Dimicco JA. The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience*. 2011;184:64-74.

Fontes MAP, Menezes RCA, Villela DC, da Silva Jr LG. 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 2006;39:13-20.

Freire-Maia L, Campos JA. Patophysiology and treatment of scorpion poisoning. Natural toxins , characterization, pharmacology and therapeutics Proceedings of the 9th world congress on animal, plant and microbial toxins Pergamon Press, Oxford. 1989.

Freire-Maia L, Campos JA, Amaral CF. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 1994;32:1009-14.

Freire-Maia L, Pinto GI, Franco I. Mechanism of the cardiovascular effects produced by purified scorpion toxin in the rat. J Pharmacol Exp Ther. 1974;188:207-13.

Fundação Nacional de Saúde. Manual de Diagnostico por Animais Peçonhentos. 2001.

Goldstein DS. Control of sympathetic outflows and functions of central catecholamines. In: Press OU, editor. Stress, catecholamines and cardiovascular disease 1995. p. 165-233.

Gomez MV, Diniz CR. Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. Memórias do Instituto Butantan. 1966;33:899-902.

Graeff F. Brain defence systems and anxiety. In: Roth M, Burrows GD, R N, editors. Handbook of anxiety. Amsterdam: Elsevier; 1990. p. 307– 54.

Gueron M, Ilia R, Sofer S. The cardiovascular system after scorpion envenomation. A review. J Toxicol Clin Toxicol. 1992;30:245-58.

Guidine PA, Assumpcao G, Moraes-Santos T, Massensini AR, Chianca DA, Jr., Moraes MF. Dose-dependent effect of carbamazepine on weanling rats submitted to subcutaneous injection of tityustoxin. Neuroscience letters. 2008a;433:170-3.

Guidine PA, Cash D, Drumond LE, de Souza ERGH, Massensini AR, Williams SC, et al. Brainstem structures are primarily affected in an experimental model of severe scorpion envenomation. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2014;137:147-57.

Guidine PA, Mesquita MB, Moraes-Santos T, Massensini AR, Moraes MF. Electroencephalographic evidence of brainstem recruitment during scorpion envenomation. *Neurotoxicology*. 2009;30:90-6.

Guidine PA, Moraes-Santos T, Massensini AR, Moraes MF. Carbamazepine is effective in the treatment of 21-day-old Wistar rats injected with *Tityus serrulatus* crude venom. *Brain research*. 2008b;1239:256-60.

Guidine PA, Moraes-Santos T, Massensini AR, Moraes MF. Carbamazepine protects the CNS of Wistar rats against the central effects of scorpion envenomation. *Neurotoxicology*. 2008c;29:136-42.

Guidine PAM. Acidentes escorpiônicos graves: uma proposta terapêutica com agentes neurotrópicos [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2005.

Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:335-46.

Guyton AC. Blood pressure control — special role of the kidneys and body fluids. *Science* 1991;252:1813–6.

Hamed MI. Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12-years experience with serotherapy. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2003;21:170-4.

Hara K, Harris RA. The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesthesia and analgesia*. 2002;94:313-8, table of contents.

Hering SE, Azevedo- Marques MM, Cupo P. Escorpionismo. Plantas venenosas e animais peçonhentos. S Schvartsman 1992:216-27

Horiuchi J, McAllen RM, Allen AM, Killinger S, Fontes MA, Dampney RA. Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2004;287:R824-32.

Horiuchi J, McDowall LM, Dampney RA. Vasomotor and respiratory responses evoked from the dorsolateral periaqueductal grey are mediated by the dorsomedial hypothalamus. The Journal of physiology. 2009;587:5149-62.

Ismail M. The treatment of the scorpion envenoming syndrome: the Saudi experience with serotherapy. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 1994;32:1019-26.

Ismail M. The scorpion envenoming syndrome. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 1995;33:825-58.

Ismail M, Kertesz G, Osman OH, Sidra MS. Distribution of 125I labelled scorpion (*Leiurus quinquestriatus* H and E) venom in rat. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 1974;12:209-11.

Ismail M, Osman OH, el-Asmar MF. Pharmacological studies of the venom from the scorpion *Buthus minax* (L. Koch). Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 1973;11:15-20.

Ismail M, Osman OH, Ibrahim SA, el-Asmar MF. Cardiovascular and respiratory responses to the venom from the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. East African medical journal. 1972;49:273-81.

Ismail M, Shibl AM, Morad AM, Abdullah ME. Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-labelled antivenin to the venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi*. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 1983;21:47-56.

Ito S, Nakazato Y, Ohga A. Further evidence for the involvement of the sodium channels in the release of adrenal catecholamines: the effect of scorpion venom and grayanotoxin I. *Br J Pharmacol*. 1981;72:61-7.

Jardim MC, Guimaraes FS. GABAergic and glutamatergic modulation of exploratory behavior in the dorsomedial hypothalamus. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2001;69:579-84.

Kalapothakis E, Chavez-Olortegui C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 1997;35:1523-9.

Lima EG, Freire-Maia L. Cardiovascular and respiratory effects induced by intracerebroventricular injection of scorpion toxin (tityustoxin) in the rat. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 1977;15:225-34.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.

Magalhães O. Scorpionism. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1938;41:393-9.

Magalhaes OC. Contribution to the knowledge of poisoning by scorpions venom. *Memories of Oswaldo Cruz Institute*. 1928;21:5-159.

Massensini AR. Estudo comparativo dos efeitos da Tityustoxina e da Toxina-gama sobre o sistema nervoso central de ratos [Dissertação de Mestrado]: Universidade Federal de Minas Gerais; 1996.

Massensini AR, Moraes-Santos T, Gomez MV, Romano-Silva MA. Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on  $[Na^+]_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$ . *Neuropharmacology*. 1998;37:289-97.

Meeker RB, Greenwood RS, Hayward JN. Glutamate receptors in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. 1994;134:621-9.

Mesquita MB, Moraes-Santos T, Moraes MF. Phenobarbital blocks the lung edema induced by centrally injected tityustoxin in adult Wistar rats. *Neuroscience letters*. 2002;332:119-22.

Mesquita MB, Moraes-Santos T, Moraes MF. Centrally injected tityustoxin produces the systemic manifestations observed in severe scorpion poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003;187:58-66.

Mesquita MSB. Estudo das ações centrais e periféricas da fração tóxica T2III do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* em ratos Wistar adultos. [Dissertação de Mestrado]: Universidade Federal de Minas Gerais; 2002.

Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2001.

Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. ; 2009a. p. 813.

Ministério da Saúde. Manual de Controle de Escorpiões. 2009b. p. 72.

Ministério da Saúde. Ministério da Saúde/ Sistema de Informação de Agravos de Notificação/ Secretaria de Vigilância em Saúde. DATASUS; 2013.

Nencioni AL, Lebrun I, Dorce VA. A microdialysis study of glutamate concentration in the hippocampus of rats after TsTX toxin injection and blockade of toxin effects by glutamate receptor antagonists. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2003;74:455-63.

Nencioni AL, Lourenco GA, Lebrun I, Florio JC, Dorce VA. Central effects of *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* scorpion venoms after intraperitoneal injection in rats. *Neuroscience letters*. 2009;463:234-8.

Nunan EA, Moraes MF, Cardoso VN, Moraes-Santos T. Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Life sciences*. 2003;73:319-25.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press; 1986.

Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1999;264:287-300.

Price CJ, Hoyda TD, Ferguson AV. The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist*. 2008;14:182-94.

Revelo MP, Bambirra EA, Ferreira AP, Diniz CR, Chavez-Olortegui C. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1996;34:1119-25.

Sampaio SV, Laure CJ, Giglio JR. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1983;21:265-77.

Sandoval MR, Lebrun I. TSII toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom: behavioral, electroencephalographic, and histopathologic studies. *Brain Res Bull*. 2003;62:165-72.

Silva FC, Guidine PA, Ribeiro MF, Fernandes LG, Xavier CH, de Menezes RC, et al. Malnutrition alters the cardiovascular responses induced by central injection of tityustoxin in Fischer rats. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2013;76:343-9.

Skolnik AB, Ewald MB. Pediatric scorpion envenomation in the United States: morbidity, mortality, and therapeutic innovations. *Pediatr Emerg Care*. 2013;29:98-103; quiz 4-5.

Soltis RP, Cook JC, Gregg AE, Stratton JM, Flickinger KA. EAA receptors in the dorsomedial hypothalamic area mediate the cardiovascular response to activation of the amygdala. *The American journal of physiology*. 1998;275:R624-31.

Soltis RP, DiMicco JA. GABAA and excitatory amino acid receptors in dorsomedial hypothalamus and heart rate in rats. *The American journal of physiology*. 1991a;260:R13-20.

Soltis RP, DiMicco JA. Interaction of hypothalamic GABAA and excitatory amino acid receptors controlling heart rate in rats. *The American journal of physiology*. 1991b;261:R427-33.

Teixeira AL, Fontoura BF, Freire-Maia L, Machado CR, Camargos ER, Teixeira MM. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2001;39:703-9.

Thayer JF, Lane RD. Claude Bernard and the heart-brain connection: further elaboration of a model of neurovisceral integration. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2009;33:81-8.

Tibiriçá E. Controle Central da Pressão Arterial In: *Fisiopatologia em Medicina Cardiovascular* Rio de Janeiro: Revinter; 2001.

Tonhajzerova I, Ondrejka I, Turianikova Z, Javorka K, Calkovska A, Javorka M. Heart Rate Variability: An Index of the Brain–Heart Interaction In: Yamada T, editor. *Tachycardia*: InTech; 2012.

Vijverberg HP, Pauron D, Lazdunski M. The effect of *Tityus serrulatus* scorpion toxin gamma on Na channels in neuroblastoma cells. *Pflugers Arch*. 1984;401:297-303.

Xavier CH, Beig MI, Ianzer D, Fontes MA, Nalivaiko E. Asymmetry in the control of cardiac performance by dorsomedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013;304:R664-74.

Zaretskaia MV, Zaretsky DV, DiMicco JA. Role of the dorsomedial hypothalamus in thermogenesis and tachycardia caused by microinjection of prostaglandin E2 into the preoptic area in anesthetized rats. *Neuroscience letters.* 2003;340:1-4.

Zhong MK, Duan YC, Chen AD, Xu B, Gao XY, De W, et al. Paraventricular nucleus is involved in the central pathway of cardiac sympathetic afferent reflex in rats. *Experimental physiology.* 2008;93:746-53.

## **9- ANEXOS**

### **9.1- Produções científicas relacionadas à tese**

#### **9.1.1- Artigo publicado**

**SILVA, FERNANDA CACILDA DOS SANTOS; MAIA GUIDINE, PATRÍCIA ALVES; RIBEIRO, MARA FERNANDES; FERNANDES, LUCIANO GONÇALVES ; XAVIER, CARLOS HENRIQUE ; DE MENEZES, RODRIGO CUNHA ALVIM ; SILVA, MARCELO EUSTÁQUIO ; MORAES SANTOS, TASSO ; MORAES, MÁRCIO FLÁVIO DUTRA ; CHIANCA, DEOCLÉCIO ALVES .** Malnutrition alters the cardiovascular responses induced by central injection of tityustoxin in Fischer rats. *Toxicon* (Oxford), v. 76, p. 343-349, 2013.

#### **9.1.2- Manuscrito aceito para publicação**

**SILVA, FERNANDA CACILDA DOS SANTOS; MAIA GUIDINE, PATRÍCIA ALVES; MACHADO, NATÁLIA LIMA SANTOS; XAVIER, CARLOS HENRIQUE ; DE MENEZES, RODRIGO CUNHA ALVIM; MORAES SANTOS, TASSO ; MORAES, MÁRCIO FLÁVIO DUTRA ; CHIANCA, DEOCLÉCIO ALVES .**

The role of Dorsomedial Hypothalamus ionotropic glutamate receptors in the hypertensive and tachycardic responses evoked by Tityustoxin intracerebroventricular injection. *Neurotoxicology*, 2014.

#### **9.1.3- Resumos publicados em anais de eventos internacionais**

**FERNANDA C. S. SILVA, CARLOS H. XAVIER, RODRIGO C. A. DE MENEZES, MÁRCIO FLÁVIO D. MORAES, PATRÍCIA A. M. GUIDINE, DEOCLÉCIO A. CHIANCA-JR.** Cardiovascular responses induced by tityustoxin central injection: role of dorsomedial hypothalamus ionotropic glutamate receptors. In: Symposium Bristol – São Paulo Research Summit Autonomic And Neuroendocrine Dysfunction In Chronic Diseases, held in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, on August 07 - 09, 2014.

**F. C SILVA,; F. MARINS ; M. A. FONTES ; R. C. DE MENEZES ; P. A. GUIDINE ; D. A. CHIANCA-JR .** Intracerebroventricular injection of Tityustoxin increases the cardiovascular parameters and renal sympathetic nerve activity. In: *Experimental Biology*, 2014, San Diego. *Experimental Biology Program*, 2014. v. Sunday. p. 210.

**FERNANDA C SILVA; CARLOS H XAVIER; RODRIGO C DE MENEZES; GUIDINE, P.A.M. ; DEOCLÉCIO A CHIANCA-JR .** Cardiovascular responses to central injections of tityustoxin in Wistar rats. In: *Neuroscience Annual Meeting Conference 2012*, 2012, Nova Orleans. *SfN's Program*, 2012.

**SILVA, F. C. S.,; RIBEIRO, M.F. ; GUIDINE, P. A. M. ; CHIANCA-JR, D.A .**The influence of protein undernutrition on the cardiovascular symptoms triggered by the scorpion tityustoxin central action in Fischer rats. In: *Brain origins of cardiovascular disorders*, 2011, Ouro Preto. *Brain origins of cardiovascular disorders*, 2011.

### 9.1.4- Resumos publicados em anais de eventos nacionais

**SILVA, F. C. S.**; RIBEIRO, M.F.; GUIDINE, P. A. M.; CHIANCA-JR, D.A. Baixas doses de tityustoxina escorpiônica injetadas intracerebroventricularmente promovem respostas cardiovasculares em ratos. In: Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2012, Goiânia. Anais do Simposio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascluar, 2012.

**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 Autônômico 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. Anais do Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2011.

## 9.2- Produções científicas não relacionadas à tese

### 9.2.1- Artigos Publicados

JOELMA MC GOMIDE; RODRIGO C DE MENEZES; LUCIANO G FERNANDES; **FERNANDA C SILVA**; LEONARDO M CARDOSO; LUIZ G JR DA SILVA; MERCIA P LIMA; JORGE L PESQUERO; GISELLE FOUREAUX; ANDERSON J FERREIRA; DEOCLECIO A CHIANCA JR. Increased activity of the renin-angiotensin and sympathetic nervous systems is required to the regulation of the blood pressure in rats fed a low protein diet. *Experimental Physiology (Print)*, v. 1, p. 1-2, 2012.

MIRIAM C RODRIGUES-BARBOSA; CLAUDIA M CARNEIRO; LISANDRA B OLIVEIRA ; **FERNANDA C SILVA**,; CARLOS H XAVIER ; LUCIANO G FERNANDES ; DEOCLECIO A CHIANCA-JR. Protein malnutrition modifies medullary neuronal recruitment in response to intermittent stimulation of the baroreflex. *Brain Research*, v. 1483, p. 20-30, 2012.

FOLLY, G. A. F.; SILVA, E. N.; VERNER, F. V.; **FERNANDA C SILVA**; VOLP, A. C. P. Aceptación de productos artesanales formulados con nueces y frutooligosacáridos. *Nutrición Hospitalaria*, v. 28, p. 86-92, 2012.

### **9.2.2- Resumos publicados em anais de eventos nacionais**

NIMER, M.; **SILVA, F. C. S.**; MELLO, J. B. M.; BARROS, F. S.; PREVIATO, H. D. R. A.. Perfil antropométrico e consumo alimentar de idosos. In: 12º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2013, Foz do Iguaçu. Anais do Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2013.

ADRIANA MOURA VIEIRA; YASMIM REZENDE ROCHA; MARGARETE NIMER; **FERNANDA C SILVA**. Avaliação Antropométrica dos Idosos do Programa Terceira Idade: Vitalidade e Cidadania. In: XX Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Ouro Preto, 2012, Ouro Preto. Anais do XX Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Ouro Preto, 2012.

YASMIM REZENDE ROCHA; ADRIANA MOURA VIEIRA; **FERNANDA C SILVA**; MARGARETE NIMER . Projeto: Assistência Nutricional e Dietoterápica aos integrantes do Projeto 'Terceira Idade: Vitalidade e Cidadania'. In: XIII Seminário de Extensão da UFOP - Encontro dos Saberes, 2012, Ouro Preto. Anais do XIII Seminário de Extensão da UFOP - Encontro dos Saberes, 2012.