

SILMARA ARAUJO AMARAL DA SILVA

EFEITO DE TITYUSTOXINA GAMA MARCADA COM
TECNÉCIO 99m SOBRE O SISTEMA COLINÉRGICO
CENTRAL EM RATOS.

Faculdade de Farmácia UFMG

Belo Horizonte, MG

2008

SILMARA ARAUJO AMARAL DA SILVA

EFEITO DE TITYUSTOXINA GAMA MARCADA COM
TECNÍCIO 99m SOBRE O SISTEMA COLINÉRGICO
CENTRAL EM RATOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos

Faculdade de Farmácia UFMG

Belo Horizonte, MG

2008

Dedico esse trabalho à minha filha Stéffany, razão da minha vida e de tudo que eu faço, e aos meus pais que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos sinceros:

A DEUS pelo dom da vida e pelas oportunidades;

Ao Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos pelo exemplo de ser humano, de ética e princípios. Pela orientação e ensinamentos.

À minha mãe pelo exemplo de força e dedicação, pelo apoio e incentivo. Ao meu pai pela paciência e apoio. À minha linda filha pela compreensão da minha ausência, pelo amor e incentivo, às minhas irmãs e ao meu sobrinho pelo incentivo. Ao Fábio, pelo companheirismo.

Ao Prof. Valbert Nascimento Cardoso, pela ajuda e colaboração.

Ao Prof. André Ricardo Massensini pela ajuda.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Experimental, Maria das Graças Vilela Torquato, Vinícius Paganini, Wagner Miranda, Renata Abreu, Eliane Moreto, Gustavo Rezende, Marclênia Ramos, Renata Lacerda, Ricardo Dornas, Antônio Massensini, pela colaboração durante a realização deste trabalho e pela amizade.

À veterinária Maria Adelaide Fernandes responsável pelo biotério da Faculdade de Farmácia e ao José Batista Viturino, funcionário do biotério, pela disponibilidade e auxílio na manutenção dos animais utilizados.

E a todos que acreditaram em mim.

SUMÁRIO

<i>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</i>	7
FIGURAS	7
TABELAS	7
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	8
<i>RESUMO</i>	9
<i>ABSTRACT</i>	11
1. <i>INTRODUÇÃO</i>	13
1. <i>INTRODUÇÃO</i>	13
2. <i>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</i>	15
2.1. A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA.....	15
2.2 SINAPSE E LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES	17
2.3 TRANSMISSÃO COLINÉRGICA.....	18
2.4 DESNUTRIÇÃO E SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	19
2.5 O VENENO DE ESCORPIÃO	20
2.5.1 A Tityustoxina gama	22
2.6 A TOXINA E A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA.....	23
3. <i>OBJETIVOS</i>	25
4. <i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	25
4.1 <i>MATERIAL</i>	25
4.1.1 Reagentes	25
4.1.2 Equipamentos.....	26
4.2 <i>SOLUÇÕES</i>	26
4.3 <i>MÉTODOS</i>	30
4.3.1. Modelo experimental (animais).....	30

4.3.2 Obtenção da toxina gama (TiTX- γ).....	31
4.3.3. Marcação da toxina TiTx- γ com tecnécio- 99m.....	32
4.3.4 Determinação da dose adequada para estimulação da liberação de acetilcolina in vivo com TiTX- γ	33
4.3.5 Estimulação da liberação de neurotransmissores em cérebro de ratos por TiTX- γ in vivo e sacrifício	36
4.3.6 Preparação das amostras e extração do TCA.....	37
4.3.7 Determinação da acetilcolina.....	38
4.3.8. Determinação de Proteína.....	38
4.3.9. Determinação de DNA.....	39
4.3.10 Análise estatística dos dados	40
5. RESULTADOS.....	40
5.1 EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SOBRE O PESO CORPORAL E ENCEFÁLICO DOS ANIMAIS.....	40
5.2 INFLUÊNCIA DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR NA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E DNA CEREBRAL.....	42
5.3 EFICIÊNCIA DA MARCAÇÃO DA TITYUSTOXINA GAMA COM TECNÉCIO 99M.....	44
5.4 INFLUÊNCIA DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR NA CAPTAÇÃO DE TOXINA RADIOATIVA PELO CÉREBRO.....	45
5.5 EFEITO DA TOXINA ^{99m} Tc-TiTX- γ NO CONTEÚDO DE ACh DO CERÉBRO DE RATOS NORMONUTRIDOS E DESNUTRIDOS APÓS O DESMAME	45
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO.....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

FIGURAS

1. Recuperação no cérebro da quantidade de [^{99m} Tc]-TiTX-γ injetada por via intraperitoneal em ratos de 21 dias	33
2. Crescimento corporal de ratos, do nascimento até o 21º dia de vida	37
3. Conteúdo de proteína cerebral de ratos	39
4. Conteúdo de DNA cerebral de ratos	39
5. Relação proteína por DNA no cérebro de ratos	40
6. Perfil de filtração cromatográfica em Sephadex	44
7. Porcentagem de radiação recuperada em cérebro de ratos	41
8. Teor de acetilcolina por grama de tecido, expressa em nmol de ACh por g de tecido	42
9. Teor de acetilcolina por miligrama de DNA, expressa em nmol de ACh por mg de DNA	43
10. Teor de acetilcolina por miligrama de proteína, expressa em nmol de ACh por mg de proteína.....	43
11. Teor de acetilcolina total em cérebro de ratos	44

TABELAS

1. Massa corporal e encefálica	38
--------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

^{99m}Tc	Tecnécio – 99 meta estável
$^{99m}\text{TcO}_2$	Dióxido de tecnécio (tecnécio reduzido)
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Pertecnetato
$^{99m}\text{Tc-TiTX-}\gamma$	Tityustoxina gama marcada com tecnécio – 99m
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BHE	Barreira hematoencefálica
cpm	Contagem por minuto
DC	Desnutrido controle
DE	Desnutrido estimulado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GD	Grupo desnutrido
GN	Grupo normal
ICV	Intracerebroventricular
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
NC	Normonutrido controle
NE	Normonutrido estimulado
RNA	Ácido ribonucléico
SNC	Sistema nervoso central
TCA	Ácido tricloroacético
TiTX- γ	Tityustoxina gama
TsTX	Tityustoxina

RESUMO

A toxina escorpiônica, TiTX- γ , tem efeito no sistema nervoso central mesmo quando injetada por via subcutânea, como acontece nas picadas por escorpião. Contudo, não há evidência direta de sua presença no encéfalo nessa circunstância. O objetivo nesse trabalho foi demonstrar que a TiTX- γ pode atravessar a barreira hematoencefálica de animais jovens normonutridos e desnutridos, atingindo o cérebro e induzindo a liberação de acetilcolina. Foram utilizados quatro grupos de animais: NC (normal controle); NE (normal estimulado pela injeção de toxina); DC (desnutrido controle); DE (desnutrido estimulado pela injeção de toxina). Os grupos desnutridos receberam 60% da dieta consumida pelos grupos normonutridos. Aos 21 dias de vida, os grupos NE e DE receberam injeção intraperitoneal de [^{99m}Tc]-TiTX- γ e os grupos NC e DC receberam injeção via intraperitoneal do meio utilizado para marcação com tecnécio. Após noventa minutos os animais foram então decapitados e a radioatividade em seus cérebros foi contada em cintilador gama. Os cérebros foram homogeneizados e alíquotas usadas para o ensaio quimioluminescente de acetilcolina. A restrição alimentar diminuiu o peso corporal e encefálico dos animais desnutridos $24,63 \pm 1,13$ g; $0,94 \pm 0,06$ g, respectivamente, em relação aos animais normais $41,62 \pm 7,01$ g; $1,09 \pm 0,04$ g. Os animais normonutridos captaram 50% mais toxina radioativa, avaliada por cpm existente no órgão em relação àquela injetada, do que os animais desnutridos ($0,33 \pm 0,04\%$ versus $0,17 \pm 0,06\%$). TiTX- γ foi capaz de atravessar a barreira hematoencefálica de todos os animais que receberam injeção de toxina provocando aumento na concentração de acetilcolina no cérebro desses animais e em maior quantidade nos animais normonutridos (nmol ACh/g de tecido \pm EPM): NC $1,80 \pm 0,44$; NE $3,15 \pm 0,75$; DC $1,22 \pm 0,47$ e DE $2,17 \pm 0,21$. Conclui-se que TiTX- γ atravessa a barreira hematoencefálica e exerce sua função, já comprovada, de ativar canais de sódio aumentando a concentração de acetilcolina no sistema nervoso central.

Palavras-chave: restrição alimentar, tecnécio, barreira hematoencefálica, acetilcolina, tityustoxina gama.

ABSTRACT

The scorpion toxin, TiTX- γ , affects central nervous system even when injected by subcutaneous via, as it happens in scorpion stings. However, there is no direct evidence of its presence in brain in this circumstance. The goal in this work was to demonstrate that TiTX- γ can cross the blood-brain barrier in young well-nourished and malnourished animals, reaching the brain and inducing the acetylcholine release. Four groups of rats were used: NC (normal control); NE (normal stimulated by toxin injection); DC (malnourished control); DE (malnourished stimulated by toxin injection). The malnourished groups received 60% of the diet consumed by the well-nourished groups. At 21 days of life, the groups NE and DE received intraperitoneal injection of [^{99m}Tc]-TiTX- γ and the groups NC and DC received intraperitoneal injection of the medium used for technetium labeling. After ninety minutes animals were decapitated and the radioactivity in their brain was counted in gamma scintillation equipment. The brains were homogenized and aliquots used to assay acetylcholine by chemiluminescent procedure. The food restriction decreased body and brain weight of the malnourished animals 24.63 ± 1.13 g; 0.94 ± 0.06 , respectively, in relation to well nourished animals 41.62 ± 7.01 g; 1.09 ± 0.04 g. The well-nourished animals took 50% more radioactive toxin, evaluated by cpm in the organ related to that injected, than that in the malnourished animals ($0,33 \pm 0,04\%$ versus $0,17 \pm 0,06\%$). TiTX- γ crossed brains blood barrier in all animals that received toxin injection promoting increase in the acetylcholine concentration in brain of the animals and in greater quantity in well nourished rats (nmol ACh/g de tecido \pm EPM): NC $1,80 \pm 0,44$; NE $3,15 \pm 0,75$; DC $1,22 \pm 0,47$ e DE $2,17 \pm 0,21$. It is concluded that TiTX- γ cross the blood-brain barrier and fulfills its function, as already proved, activating sodium channels and augmenting acetylcholine concentration in the central nervous system.

Keywords: Food restriction, technetium, blood-brain barrier, acetylcholine, tityustoxin gamma.

1. INTRODUÇÃO

A barreira hematoencefálica é uma junção estática, de células endoteliais especializadas, não fenestradas, unidas firmemente por meio de junções íntimas, rígidas e comprimidas. Ela regula a entrada de macromoléculas e de micromoléculas de solutos do sangue periférico para o sistema nervoso central, formando uma barreira à troca de algumas substâncias entre os capilares e o tecido encefálico (HUBER et al., 2001; VORBRODT e DOBROGOWSKA, 1994). Funcionalmente, não se encontra completamente desenvolvida até os seis meses de idade em humanos (BERTELLI et al., 1994).

O sistema nervoso é especialmente vulnerável se exposto a agentes tóxicos durante a fase inicial de desenvolvimento (período crítico de crescimento e desenvolvimento do cérebro). Não se pode descartar o fácil acesso de componentes tóxicos ao cérebro pela barreira hematoencefálica imatura, como causa do dano neuronal (GOLDSTEIN e BETZ , 1981).

Um estado nutricional adequado é essencial para o funcionamento e desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Negativamente, a desnutrição causa modificações bioquímicas, fisiológicas, anatômicas e comportamentais resultando em efeitos de longa duração ou até mesmo permanentes. Assim sendo, sistemas neurotransmissores catecolaminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, gabaérgicos e opiáceos são afetados pela desnutrição (ROTTA, 2003). No cérebro, a desnutrição em ratos neonatos diminui a capacidade de síntese e liberação de acetilcolina (ACh). A síntese e liberação desse neurotransmissor, quando estimuladas por toxina de escorpião *Tityus serrulatus*, encontram-se diminuídas em animais desnutridos (ESPÍNDOLA, 1983).

A síndrome de envenenamento por picada de escorpião é um grave problema de saúde pública, com alta prevalência em países tropicais (FUNASA, 2001). As crianças são mais freqüentemente picadas que os adultos e apresentam envenenamento mais grave (FREIRE-MAIA et al., 1994).

Toxinas ativas em canais de sódio têm sido amplamente utilizadas como ferramentas para estudar mecanismos sinápticos sob condições fisiológicas ou patológicas (MASSENSINI et al., 2003). Neurotoxinas agindo em canais de sódio são capazes de induzir liberação de neurotransmissores em fatias de córtex (NICOLATO et al., 2002).

Toxinas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* desempenham, no sistema nervoso central, um papel importante no aparecimento de sintomas graves, o que poderia explicar a gravidade dos envenenamentos em pacientes acidentados por picada de escorpião (GUIDINE et al., 2008).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A barreira hematoencefálica (BHE) é formada por células endoteliais numa junção estática, rígida e comprimida. Ela regula a entrada de macromoléculas e de micromoléculas dos solutos do sangue periférico para o sistema nervoso central (SNC) (HUBER et al., 2001; VORBRODT e DOBROGOWSKA, 1994). É uma barreira física e metabólica que isola o SNC do resto do corpo, consistindo de células endoteliais especializadas que recobrem o sistema vascular cerebral (MARCHI et al., 2004). Protege o cérebro de substâncias tóxicas provenientes do sangue periférico e mantém a homeostase do microambiente encefálico, o que é fundamental para o bom funcionamento do cérebro (PLATE, 1999; RISAU, 1990).

A BHE é uma estrutura plástica capaz de responder rapidamente às mudanças no cérebro ou sangue (HUBER et al., 2001). Em condições normais, tem quatro funções principais: separar e proteger o cérebro de compostos circulantes no resto do corpo; transportar compostos necessários para o cérebro de modo seletivo; detectar alterações no sangue e comunicar essas mudanças ao cérebro; e metabolizar substâncias presentes no cérebro e sangue (HAYASHI et al., 1997).

O endotélio tem pelo menos três tipos de união célula-célula, que também se encontram entre o endotélio e os astrócitos: uniões de fenda (junções GAP), uniões aderentes e uniões estreitas. As junções GAP são formadas por grupos de proteínas transmembranas (conexinas) que ligam o citoplasma entre células endoteliais. As uniões aderentes são formadas por proteínas tipo caderinas (BERNHARDI, 2004). E as uniões estreitas são compostas por proteínas integrais e periféricas de membrana. A alta concentração de uniões estreitas é uma característica especial da BHE. Elas fecham os espaços intercelulares entre as

células endoteliais e os astrócitos, determinando que os capilares da BHE tenham uma resistência elevada e sejam impermeáveis à maioria das macromoléculas (RUBIN et al., 1999). Tais uniões formam cinturões intercelulares contínuos estabelecendo múltiplas barreiras (SAUNDERS et al., 2000).

O desenvolvimento da BHE ocorre por um processo complexo que começa no primeiro trimestre de vida fetal humana e realiza-se em duas fases principais (MOLLGARD e SUNDERS, 1975). Na primeira fase, conhecida como angiogênese cerebral, células endoteliais derivadas de vasos permeáveis do plexo vascular perineural invadem a neuroectoderme e formam vasos cerebrais por um processo angiogênico. Durante a segunda fase, ocorre diferenciação do endotélio cerebral envolvendo o estabelecimento de complexas junções entre as células e sistemas de transporte hidrofílicos exigidos pelo cérebro. A função da barreira hematoencefálica não se encontra completamente desenvolvida até os seis meses de idade em humanos (BERTELLI et al., 1994). Em ratos esse processo começa em torno do décimo segundo dia de gestação e continua até cerca do vigésimo dia após o nascimento, a segunda fase é completada entre o vigésimo quarto e trigésimo dia de vida nos ratos (SONG et al., 2002).

O sistema nervoso é especialmente vulnerável se exposto a agentes tóxicos durante a fase inicial de desenvolvimento (período crítico de crescimento e desenvolvimento do cérebro). É possível que o dano neuronal seja devido ao fácil acesso de substâncias tóxicas ao cérebro pela barreira hematoencefálica imatura (GOLDSTEIN e BETZ, 1981).

2.2 SINAPSE E LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES

A maioria das conexões das células nervosas é conhecida por sinapse química. Nesta, a transmissão do impulso nervoso de um neurônio a outro é realizada por neurotransmissores. Os neurônios, constituintes do sistema nervoso, são responsáveis pelos sinais transmitidos de um ponto a outro, virtualmente sem alteração. Quando o neurônio é estimulado, ocorre uma mudança local na condutância da membrana para a passagem de íons sódio e potássio. Para o sinal passar de um neurônio a outro, ele precisa atravessar a fenda sináptica. Essa transmissão é efetuada pela liberação de um composto químico chamado neurotransmissor. Esse processo é denominado transmissão sináptica neuroquímica (DUNANT e ISRAËL, 1985).

A mudança de potencial elétrico na célula pré-sináptica provoca, por excitose Ca^{+2} -dependente, a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica que se ligará a sítios receptores da membrana do neurônio pós-sináptico, transmitindo desta forma o impulso nervoso. No cérebro humano, a comunicação entre os neurônios se dá por contatos sinápticos que usam na sua maior parte, aminoácidos como transmissores (NICHOLLS et al., 1993).

Um simples neurônio pode ser afetado, simultaneamente, por estímulos excitatórios e inibitórios de axônios provenientes de muitos neurônios. Os diferentes sinais diminuem ou aumentam o potencial que se movimenta ao longo da membrana plasmática, a partir do ponto de sinapse para o corpo celular, e daí para o cone axonal. A partir daí, um novo potencial de ação será gerado ou não, dependendo do balanço de tempo, amplitude, e localização dos vários potenciais excitatórios e inibitórios, recebidos pelo neurônio (LOPES, 1999).

2.3 TRANSMISSÃO COLINÉRGICA

A acetilcolina (ACh) foi isolada e caracterizada, estrutural e funcionalmente em 1935 por Dale, dessa forma o sistema colinérgico foi o primeiro a ser utilizado nos experimentos que investigam a neurotransmissão. Esse neurotransmissor desempenha papel importante na comunicação celular, evocando respostas dos neurônios pós sinápticos.

A síntese desse neurotransmissor se dá no terminal pré sináptico a partir da colina e da acetilcoenzima-A (TUCEK, 1978). Primeiramente, a colina, resultante da hidrólise de fosfolipídios e da hidrólise de acetilcolina anteriormente liberada, é transportada para o interior do neurônio pré-sináptico (YAMAMURA et al., 1972; KUHAR et al., 1978). A acetil-CoA, substância derivada do metabolismo da glicose, é o outro substrato necessário para síntese da ACh. A colina acetil-transferase é a enzima responsável pela acetilação da colina (FONNUM, 1968). A acetilcolina então formada no citosol é estocada em vesículas sinápticas do terminal nervoso.

A liberação da acetilcolina é causada por um impulso elétrico que transita pelo axônio até o terminal nervoso. Além da entrada de sódio, o potencial de ação também ocasiona a entrada de cálcio para o interior da célula, e com esse cálcio no terminal há a liberação de ACh na fenda sináptica. O neurotransmissor se difunde através da fenda sináptica e se liga aos sítios receptores na membrana pós-sináptica ocasionando outra alteração elétrica e transmitindo assim o impulso ao neurônio posterior ou fibras musculares (MORGAN e WINICK, 1985).

Na fenda sináptica a acetilcolina é rapidamente degradada pela acetilcolinesterase (AChE). Toda ACh é então hidrolisada a acetato e colina. Dessa forma cessa a estimulação da célula pós sináptica.

2.4 DESNUTRIÇÃO E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

No sistema nervoso central (SNC), em fases iniciais da vida, especialmente no período do surto de crescimento, quando é mais vulnerável, a desnutrição causa efeitos irreversíveis à sua formação (JONES, 1976). Bioquimicamente, a desnutrição, tem um efeito deletério e irreversível sobre os sistemas neurotransmissores (MAFRA, 1993)

Com relação às células neuronais é no período do surto de crescimento que ocorre o maior incremento dos processos (dendritos e axônios) e formação de sinapses (MORGANE et al., 2002). Estudos morfológicos indicam alterações provocadas pela desnutrição nessas estruturas (BASS, 1970; CRAGG, 1972). Estudos neuroanatômicos realizados em ratos têm demonstrado que a desnutrição, após o nascimento modifica o desenvolvimento cortical, diminuindo o número e amplitude de processos basais dendríticos, o número de dendritos e a proporção neurônio/sinapse, reduzindo a espessura cortical (CORDERO et al., 2003). A restrição alimentar no período de amamentação afeta o desenvolvimento neuronal particularmente os processos ontogenéticos: neurogênese, migração e sinaptogênese (BEDI, 2003).

Com relação ao efeito da desnutrição sobre o metabolismo protéico, nessas células, foi demonstrado que a desnutrição leva à diminuição da síntese protéica, no período de maior crescimento das células neuronais (SANTOS,1979; MORAES-SANTOS, 1981). A reabilitação nutricional posterior não é capaz de reverter o dano na formação do sistema nervoso central (SNC) e na síntese e liberação de neurotransmissores (GONÇALVES, 2001).

Um estado nutricional adequado é essencial para o funcionamento, desenvolvimento sistema nervoso (SNC). Negativamente, a desnutrição causa

modificações bioquímicas, fisiológicas, anatômicas e comportamentais resultando em efeitos de longa duração ou até mesmo permanentes. Assim sendo, sistemas neurotransmissor catecolaminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, gabaérgico e opiáceos são afetados pela desnutrição (ROTTA, 2003).

No cérebro, a desnutrição em ratos neonatos diminui a capacidade de síntese e liberação de acetilcolina. A síntese e liberação desse neurotransmissor, quando estimuladas por toxina de escorpião *Tityus serrulatus*, encontram diminuídas em animais desnutridos (ESPÍNDOLA, 1983). Durante o período de amamentação de ratos (21 dias), a desnutrição diminui o teor de acetilcolina e a atividade das enzimas envolvidas no seu metabolismo no córtex cerebral (NASCIMENTO et al., 1991).

2.5 O VENENO DE ESCORPIÃO

A síndrome do envenenamento por escorpião é um grave problema de saúde pública, com alta prevalência em países tropicais. No Brasil, verificam-se 8000 acidentes notificados por ano. A principal espécie envolvida em acidentes de envenenamento por escorpião é o *Tityus serrulatus* - agente responsável pela maior parte dos acidentes graves (FUNASA, 2001).

Sintomas clínicos de envenenamento por escorpião dependem do tipo de acidente, região do corpo de inoculação do veneno e da idade do paciente. As conseqüências podem variar de leve ou moderada dor local e parestesia (90% dos acidentes) a disfunções sistêmicas graves (principalmente em pacientes pediátricos), tais como arritmias cardíacas, alterações gastrointestinais, edema pulmonar, pancreatite, convulsões, lesões neurológicas, coma e até mesmo a morte (FERNANDEZ-BOUZAS et al., 2000; OSNAYA-

ROMERO et al., 2001). Sobre o sistema nervoso central sabe-se que por vezes são observadas convulsões como sintomas clínicos, principalmente em crianças (CARVALHO et al., 1998).

Em crianças os acidentes por envenenamento escorpiônico são freqüentemente mais graves que em adultos (SOFER, 1988; AMIN, 1992; FREIRE-MAIA et al., 1994; KRIFI et al., 1998). Manifestações do SNC são mais comuns em crianças mais novas do que em crianças maiores e adultos. A alta sensibilidade das crianças pode ser devido a diferenças na permeabilidade da barreira hematoencefálica para neurotoxinas (GUERON, 1992; ISMAIL, 1994), uma vez que em ratos quando a quantidade de veneno injetada foi corrigida para peso, ou seja mesma quantidade por Kg de peso, animais jovens apresentaram maior mortalidade que animais adultos (NUNAN et al., 2001)

Polipeptídeos tóxicos foram isolados pela primeira vez, a partir do veneno do escorpião sul americano *Tityus serrulatus* (GOMEZ e DINIZ, 1966). Essa toxina demonstrou capacidade de liberar neurotransmissores em preparações de íleo de cobaia e foi denominada tityustoxina (TsTX) (GOMEZ et al., 1995)

O veneno de escorpião é constituído de uma mistura complexa de proteínas farmacologicamente ativas. Toxinas do veneno de escorpião têm sido classificadas de acordo com seus efeitos nos canais iônicos de células excitáveis (MARANGONI et al., 1995).

Existem dois tipos principais de toxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*: a tityustoxina que é do tipo α -toxina, que atua inibindo a inativação do canal de sódio (COURAUD et al., 1982); e a tityus gama (TiTX- γ) que é do tipo β -toxina que se liga ao canal de sódio ativando o mesmo, e é a que mostra mais alta afinidade pelo canal (BARHANIN et al., 1982). As toxinas TsTX e TiTX- γ possuem características próprias. Apesar de ambas se ligarem aos canais de sódio dos

terminais nervosos, aumentando a concentração intracelular de Na^+ , a primeira age principalmente retardando a inativação dos canais, enquanto que a segunda promove uma mudança na corrente de íons sódio, propiciando que ela exista mesmo estando a membrana em potenciais entre -70 e -40 mV (ARANTES et al., 1994).

Toxinas de escorpião ativam os canais de sódio e têm sido amplamente utilizadas como ferramentas para estudar mecanismos sinápticos sob condições fisiológicas ou patológicas (MASSENSINI et al., 2003). Neurotoxinas agindo em canais de sódio são capazes de induzir liberação de neurotransmissores em fatias de córtex (NICOLATO et al., 2002). TsTX e TiTX- γ se ligam em canais de sódio, e seus efeitos sobre a liberação de acetilcolina é semelhante à estimulação elétrica causando aumento da função colinérgica (GOMEZ et al., 1975).

2.5.1 A Tityustoxina gama

A tityustoxina gama é uma proteína básica composta de 61 aminoácidos, PM 6675 (SAMPAIO et al., 1983, 1991). Sua obtenção é feita por purificação do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, da fração T1. Esta toxina age sobre os canais de Na^+ voltagem dependentes no sítio 4, aumentando a probabilidade de abertura desses canais em valores de potenciais transmembrânicos mais negativos (VIJVERBERGER et al., 1984), por isso é considerada uma toxina do tipo β . A constante de dissociação do complexo formado entre a toxina e o canal de sódio em diversos tecidos animais está na faixa de $3,0 \times 10^{-12}$ e $3,0 \times 10^{-10}$, mostrando uma alta estabilidade do complexo. (BARHANIN et al., 1982, 1984). TiTX- γ é de particular interesse para o estudo de canais de sódio em membranas excitáveis. Ela é a toxina de maior afinidade por canais de sódio, uma propriedade que tem sido

explorada com sucesso em experimentos bioquímicos (VIJVERBERG et al., 1984; LOMBET; LAZDUNSKI, 1984).

2.6 A TOXINA E A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

O sistema nervoso central foi inicialmente excluído como sítio de interesse direto para a ação do veneno de escorpião, porque pouca radioatividade foi recuperada a partir de cérebro de ratos adultos que tinham recebido injeção de toxina marcada (OSMAN et al., 1973). Apesar dos poucos relatos encontrados na literatura, a ação de frações tóxicas de veneno escorpião sobre o SNC tem sido de certa forma negligenciada, principalmente devido ao entendimento comum de que esses peptídeos não atravessam a barreira hematoencefálica (REVELO et al., 1996).

A neurotoxicidade do veneno ou toxinas isoladas pode ser de uma a cinco vezes maior quando administrada por injeção intracerebroventricular (ICV) que por via subcutânea (ISMAIL et al., 1974). Então um efeito direto da toxina no SNC envolve a eventual passagem pela barreira hematoencefálica e não pode ser excluída. Estudos clínicos foram incapazes de distinguir manifestações com origem periféricas de manifestações neurológicas secundárias, para os efeitos diretos da neurotoxina no SNC. Convulsões freqüentemente ocorrem durante a intoxicação grave por veneno de escorpião e pode resultar de disfunção do SNC induzida pela neurotoxina (ISMAIL et al., 1974, MARTIN et al., 1985). No entanto, em ratos recém-nascidos, a barreira hematoencefálica não está inteiramente desenvolvida (CLOT-FAYBESSE et al., 2000). Em 2003, Nunan e colaboradores demonstraram a presença de TsTX marcada nos cérebros dos ratos recém desmamados, após injeção subcutânea de TsTX marcada com tecnécio, indicando que TsTX pode

atravessar barreira hematoencefálica, e que a distribuição de TsTX no cérebro desses animais jovens era três vezes maior que a encontrada nos animais adultos.

Injeção intracerebroventricular de TsTX leva aos mesmos sintomas observados após envenenamento grave por escorpião (tais como edema pulmonar e arritmia cardíaca e respiratória), essa mesma dose quando administrada por via intravenosa (IV) não apresenta nenhum sintoma similar ao de envenenamento escorpiônico, além disso, após administração intramuscular (IM) de fenobarbital houve bloqueio do edema pulmonar induzido pela injeção IVC, sugerindo um papel importante do SNC no mecanismo de ação da toxina (MESQUITA et al., 2003). Administração de lignocaína, bloqueador de canal de sódio voltagem dependente, foi eficiente em atenuar os sintomas de envenenamento escorpiônico em coelhos, diminuindo a letalidade (FATANI et al., 2000). Ratos foram tratados com carbamazepina e injetados com TsTX ICV e apresentaram menos arritmias cardíacas graves do que aqueles que foram tratados apenas com veículo. A latência para o início das alterações cardíacas foi retardada em ratos tratados com carbamazepina. Além disso, os animais tratados apresentaram menor índice de edema pulmonar quando comparados com os tratados somente com veículo. Esses dados sugerem que o efeito das toxinas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* sobre o sistema nervoso central desempenham um papel mais importante no aparecimento de sintomas graves, o que explica o aumento da incidência de envenenamentos graves em pacientes subdesenvolvidos ou com comprometimento da barreira hematoencefálica (GUIDINE et al., 2008).

3. OBJETIVOS

Diante do exposto, o objetivo nesse trabalho foi o de verificar que a β -toxina do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, TiTX- γ , atravessa a barreira hematoencefálica de animais jovens recém desmamados e se apresenta funcional no cérebro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes

- SIGMA CHEMICAL CO., St Louis, MO, USA

Cloreto de acetilcolina, Acetilcolinesterase (C-2888, tipo V-S: de “Electric Eel”, E.C 3.1.1.7), Peroxidase (P-8250, tipo II de Rabanete, EC 1.11.1.7), Colina-Oxidase (C-5896), Luminol (A-8511), Glicina, Brometo de etídio (Brometo de 2,7-diamino-10-etil-9-fenilfenantrídio), Ácido desoxirribonucléico (Tipo III de salmão), Albumina bovina (Fração V), Ribonuclease A (Tipo II-A de Pâncreas bovino EC 3.1.27.5), Carboximetilcelulose-52, Sephadex G-10 e Sephadex G-25.

- REAGEN – Quimibrás Indústrias Químicas SA, RJ, Brasil,

Ácido tricloroacético, Metaperiodato de sódio.

- LABORCLIN – Produtos para laboratórios LTDA

Reativo de Folin-Ciocalteu, Hidróxido de sódio, Tris base (Tris-(hidroximetil)-aminometano)

- LABSYNTH – Produtos para laboratório LTDA.

Éter dietílico, Cloreto de estanho, Borohidreto de sódio, ácido clorídrico.

- MERCK S.A.– Indústrias Químicas,

Carbonato de Sódio, Cloreto de sódio.

- INLAB S.A.

Sulfato de Cobre e Tartarato de sódio e potássio

- ECOGRAF – Medicina Nuclear

Pertecnetato de sódio

4.1.2 Equipamentos

- Banho de agitação e temperatura regulável, modelo BT 25 da YAMATO SCIENTIFIC CO.
- Espectrofluorímetro SHIMADZU, modelo RF 5301 PC, Japão.
- Espectrofotômetro Hitachi, modelo UV 160 A, Japão.
- Centrífuga refrigerada, modelo CR 21 da HITACHI, Japão.
- Cintilador automático ANSR-Abbot, USA. Intertechnique CG-4000 γ counter
- Homogeneizador de tecidos Potter Elvehjem com motor MARCONI, Brasil.
- Liofilizador, modelo L4KR da EDWARDS DO BRASIL LTDA, SP, Brasil.
- Luminômetro, modelo 12250 da BIO ORBIT OY, Turku, Finlândia.

4.2 SOLUÇÕES

- Tampão glicina (67 mM pH 8,6)

Glicina 5,03 g

Água bidestilada.....q.s.p..... 1000 ml

A glicina foi pesada em balança analítica, dissolvida em 950 ml de água bidestilada. O pH foi ajustado para 8,6 com NaOH 1M. O volume foi completado para 1000 ml em balão volumétrico.

- Ácido tricloroacético (TCA) 5%

Ácido tricloroacético..... 5,0 g

Água bidestilada..... 100 ml

- Metaperiodato de sódio 0,5%

Metaperiodato de sódio..... 0,1250 g

Água bidestilada.....q.s.p..... .25,0 ml

- Luminol (0,9 mg/ml ou 5,0 mM)

Luminol..... 2,7 mg

NaOH 1M..... gotas

Tampão glicina..... 3,0 ml

- Pool de enzimas para determinação de acetilcolina pelo método quimioluminescente

Colina oxidase140U..... 10,0 mg

Microperoxidase 3,0 mg

Luminol (0,9µg/µl)..... 300 µl

Tampão glicina.....q.s.p..... 3,0 ml

A solução resultante foi aliquotada em frações de 80 µl em tubo eppendorf e congeladas até o momento do uso.

- Acetilcolinesterase (0,08U/µl)

Foi adicionado ao frasco de origem da acetilcolinesterase 1,25 ml de água bidestilada (solução estoque). Foram então pipetados 300 µl desta solução e adicionados a 2,7 ml de água bidestilada (solução de uso).

Essa solução de uso foi então alíquotada em frações de 80 µl em frasco eppendorf e congeladas até o momento do uso.

- Acetilcolina padrão (1,82 pmoles/µl)

Foi adicionada ao frasco de origem água bidestilada suficiente para uma concentração de 10 µg/µl (solução original). Posteriormente, foram pipetados 100 µl dessa solução e completados para 10,0 ml com HCl 0,01 N (solução estoque, 0,1 µg/µl). Então foram pipetados 50 µl dessa solução estoque e completado para 15,0 ml com água bidestilada (solução de uso, 330,0 pg/µl ou 1,82 pmoles/µl).

- Solução A (dosagem de proteína)

Tartarato de sódio e potássio..... 2,0 g

Carbonato de sódio100g

Hidróxido de sódio 1N.....500ml

Água bidestilada.....q.s.p.....1000ml

- Solução B (dosagem de proteína)

Tartarato de sódio e potássio..... 2,0 g

Sulfato de cobre pentahidratado..... 1,0g

Hidróxido de sódio 1N..... 100,0 ml

- Solução C (dosagem de proteína)

Esta solução foi preparada imediatamente antes de ser usada, solubilizando 200µl de Folin-Ciocalteu e 2,8 ml de água bidestilada

- Padrão de albumina (BSH)

Solução de uso 500µg/ml

- Tampão Tris (0,1 M)-NaCl (0,3 M) pH 8,0 (dosagem de DNA)

Cloreto de sódio..... 4,388 g

Tris..... 3,028 g

Água bidestilada.....q.s.p..... 250 ml

O pH foi ajustado para 8,0 com solução de HCl 0,1 N.

- Brometo de etídio

Pesaram-se 0,0200 g de brometo de etídio que foi dissolvido em um béquer com 50 ml de água. O volume foi completado para 100 ml em um balão volumétrico (solução estoque). Foi então pipetado 1,0 ml desta primeira solução e, em um balão volumétrico, completou-se o volume para 100 ml (solução de uso).

- Padrão de DNA

Ácido desoxiribonucléico..... 5,0 mg

Água bidestilada.....q.s.p..... 50 ml

A solução foi alíquotada em frações de 1,5 ml em frasco eppendorf e congelada até o momento do uso.

- RNase (2,0 µg /ml)

Ribonuclease..... 5,0 µg

Água bidestilada.....q.s.p..... 2,5 ml

4.3 MÉTODOS

4.3.1. Modelo experimental (animais)

Ratos da raça Wistar, da colônia do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia da UFMG, foram acasalados e, por volta do 19º dia de prenhez, identificada por esfregaço vaginal, as fêmeas foram transferidas para gaiolas individuais e divididas aleatoriamente em quatro grupos: um grupo normonutrido formado por duas fêmeas que receberam dieta composta por ração de biotério (Labina, Brasil) enriquecida com 20% de ração para cães (Bonzo Mix Carnes - SP, Brasil) para complementar o teor de proteínas e lipídios; um grupo desnutrido, composto por duas fêmeas que receberam 60% da ração consumida pelo grupo normonutrido. Todas as dietas experimentais foram oferecidas a partir do 19º dia após a prenhez. Após o nascimento, os filhotes foram distribuídos aleatoriamente em número de oito por mãe. Durante o período de amamentação duas mães de cada grupo (Normal) foram mantidas recebendo água e comida *ad libitum*. Outras duas mães (desnutridas) receberam 60% da quantidade de ração consumida pelas mães controles. Os filhotes foram pesados diariamente até o dia do sacrifício (21 dias de vida), dessa forma os animais utilizados no experimento foram desnutridos indiretamente, pois eram provenientes de mães que sofreram restrição alimentar na prenhez e no aleitamento. Com os 32 filhotes quatro grupos foram formados:

NC - grupo normal controle constituído por oito filhotes que no dia do sacrifício (21 dias de vida) foram injetados intraperitonealmente com meio utilizado para marcação com tecnécio.

NE - grupo normal estimulado constituído por oito filhotes que no dia do sacrifício (21 dias de vida) foram injetados intraperitonealmente com toxina marcada.

DC - grupo desnutrido controle constituído por oito filhotes que no dia do sacrifício (21 dias de vida) foram injetados intraperitonealmente com meio utilizado para marcação com tecnécio.

DE - grupo desnutrido estimulado constituído por oito filhotes que no dia do sacrifício (21 dias de vida) foram injetados intraperitonealmente com toxina marcada.

4.3.2 Obtenção da toxina gama (TiTX- γ)

No escorpionário da Faculdade de Farmácia da UFMG, escorpiões *Tityus serrulatus* foram mantidos em caixas plásticas tampadas por telas de nylon e alimentados com uma dieta líquida à base de fígado bovino cru, peptona, mistura de sais minerais e vitaminas (Rezende, 1991). Periodicamente, veneno desses animais foi extraído aplicando-se estímulo elétrico em sua glândula secretora. O veneno bruto é recolhido em tubo de ensaio, e posteriormente liofilizado e mantido em freezer a -20°C .

A purificação das toxinas presentes no veneno bruto foi realizada seguindo as técnicas de Gomez e Diniz (1966), modificadas por Sampaio e colaboradores (1983). O veneno bruto liofilizado foi extraído com água bidestilada, e o extrato centrifugado a 15 000 G por 10 minutos a 4°C (Centrifuga refrigerada, modelo CR 21 da HITACHI, Japão). O sobrenadante foi aplicado em coluna Sephadex G-25 (120 cm x 2,5 cm), eluída com solução de amônia a 0,05 M e as frações coletadas por 20 minutos cada tubo (cerca de 8,5 ml). Quatro picos foram identificados sendo que as frações tóxicas apareceram nos picos dois e quatro. Os picos contendo toxinas foram coletados e liofilizados. Em seguida, o pó correspondente ao segundo pico tóxico foi dissolvido com solução de 0,01 N de NH_4HCO_3 , aplicado em coluna de troca iônica CM celulose (30 cm x 1,5 cm),

eluída por gradiente de concentração de NH_4HCO_3 (0,01 a 0,7 M). Frações coletadas por 12 minutos cada tubo (cerca de 2,5 ml). O último pico correspondente à toxina TiTX- γ o qual foi coletado e liofilizado.

Após liofilização, a fração correspondente à toxina TiTX- γ foi mantida no freezer até o momento do uso.

4.3.3. Marcação da toxina TiTx- γ com tecnécio- 99m

A marcação da toxina TiTX- γ foi realizada, segundo descrito por Nunan e colaboradores (2003). Uma mistura de 2,0 μl de cloreto de estanho (2mg/ml em ácido clorídrico 0,25 M) e 2,0 μl de borohidreto de sódio (10 mg/ml em NaOH 0,1 M) em 100 μl de solução salina da toxina (com peso de TiTX- γ entre 200 e 250 μg), o pH foi ajustado para 7,0 com HCl 0,1M, utilizando um papel indicador. Foram acrescentados à mistura anterior 200 μl de solução salina de pertecnetato de sódio (0,74 MBq) e a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 20 minutos.

A contaminação radioquímica, principalmente TcO_2 presente no produto final, foi eliminada por filtração em gel usando coluna de Sephadex G-10 (Sigma) de 13,0 x 1,0 cm, equilibrada e eluída com salina. Frações de 1,0 ml foram coletadas e monitoradas por radioatividade e absorbância a 280nm.

A eficiência do processo foi medida por dois sistemas de cromatografia, o primeiro em sílica gel 60 (Merck) e o segundo em papel Whatman número 1. No primeiro processo 3,0 μl da mistura marcada foram aplicados à sílica gel 60 (1,5 X 10 cm) e eluídos com acetona. A tira foi dividida em 10 segmentos de 1,0 cm e contada no cintilador automático ANSR-Abbot, USA. O tecnécio reduzido ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2$) e [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-TiTX- γ apresentaram R_f : 0-0,1 e o tecnécio não reduzido

($^{99m}\text{TcO}_4^-$) migrou para o topo da tira, determinando-se assim o percentual de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre. Na segunda cromatografia a mistura marcada foi aplicada em tira de papel Whatman número 1 (5 X 36 cm) previamente saturada em solução de albumina bovina 1%. Solução salina foi usada para eluir a mistura até 15 cm. A tira foi cortada em fragmentos de 1,0 cm cada e contada no cintilador automático. O ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e [99mTc]-TiTX- γ migraram para o fim da tira (R_f : 0,7-1,0) e o tecnécio reduzido ($^{99m}\text{TcO}_2$) ficou na origem, determinando-se dessa forma o percentual de $^{99m}\text{TcO}_2^-$ livre. Assim a porcentagem de TiTX- γ marcada foi calculada da seguinte maneira:

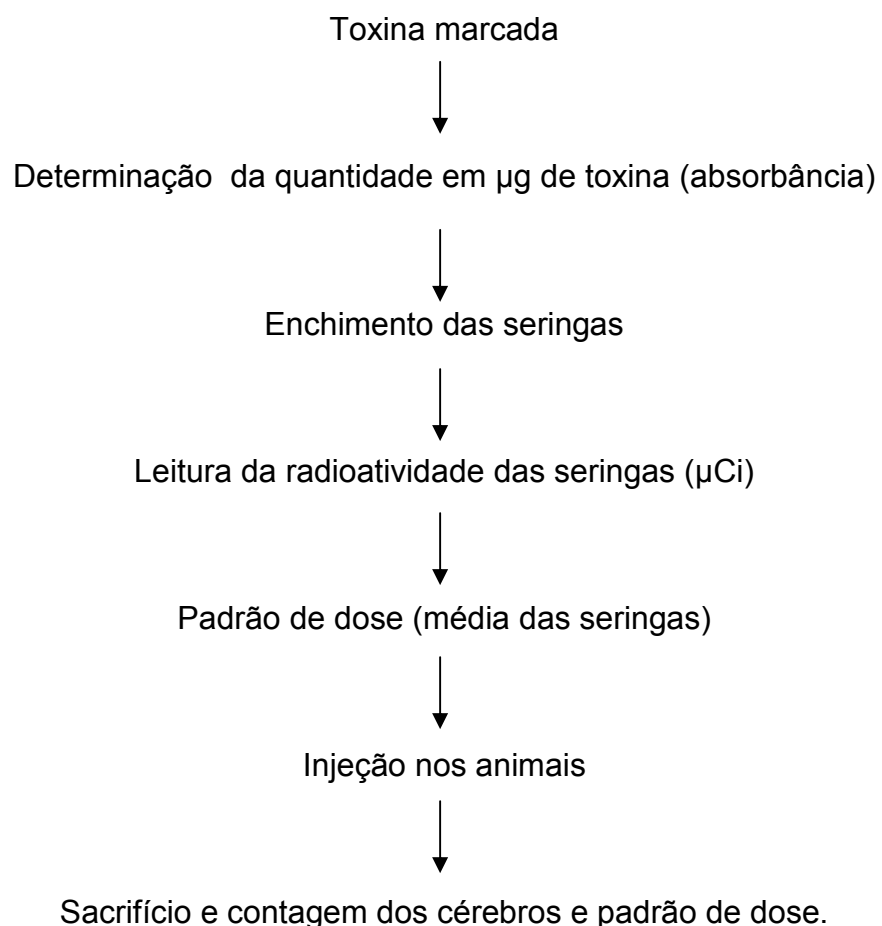
$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{cpm } [^{99m}\text{Tc}] \text{- TiTX-}\gamma}{\text{cpm total } ([^{99m}\text{Tc}] \text{- TiTX-}\gamma + ^{99m}\text{TcO}_4^- + ^{99m}\text{TcO}_2)} \times 100$$

4.3.4 Determinação da dose adequada para estimulação da liberação de acetilcolina in vivo com TiTX- γ

Em estudo preliminar, foram aplicadas, em animais com 21 dias de vida, doses crescentes de toxina marcada por via intraperitoneal (IP). Noventa minutos após a injeção os animais foram sacrificados e a radioatividade presente em seus cérebros foi contada em cintilador gama. A quantidade de radiação recuperada foi calculada a partir da fórmula:

$$\% \text{ rad recuperada} = \frac{\text{contagem (cpm) no cérebro} \times 100\%}{\text{contagem (cpm) injetada}}$$

Nesse procedimento foi levada em conta a curta meia vida do tecnécio meta estável ($T_{1/2} = 6 \text{ h}$), por isso sempre que foram feitas as injeções nos animais, um tubo com a mesma quantidade de toxina marcada (padrão de dose) foi deixada em repouso durante todo o tempo do experimento. Esse tubo foi contado junto com os tubos contendo os cérebros dos animais, dessa forma o decaimento da radioatividade foi corrigido com o padrão de dose, de acordo com o esquema abaixo:



A partir das contagens obtidas nos tubos contendo os cérebros e o padrão de dose foram feitos os cálculos para se determinar a porcentagem de radiação recuperada.

Exemplo:

- Cálculo para 20 µg de toxina marcada

Seringa 1 – 14 µCi

Seringa 2 – 13 µCi → Padrão de dose – 14 µCi

Seringa 3 – 15 µCi (toxina marcada)

Contagem em cpm

PD - 14 µCi – $1,8907333 \cdot 10^7$

S1 - $1,8907333 \cdot 10^7$

S2 - $1,7556809 \cdot 10^7$

S3 - $2,0257856 \cdot 10^7$

Para S1: Contagem do cérebro – $1,0576 \cdot 10^4$

$1,8907333 \cdot 10^7$ ---- 100 %

$1,0576 \cdot 10^4$ ---- X

X = 0,06 % de radioatividade recuperada no cérebro

Foram então analisados, a partir dos resultados, os efeitos da toxina e a porcentagem de radioatividade recuperada em relação às quantidades crescentes de $^{99m}\text{Tc-TiTX-}\gamma$ injetada. A dose máxima suportada sem que houvesse morte do animal (Fig.1) foi aquela que estava abaixo da dose letal, ou seja, provocava todos os sintomas de envenenamento, mas o animal continuava vivo até 01h30 após a injeção de $^{99m}\text{Tc-TiTX-}\gamma$, tempo necessário para que houvesse pico máximo de toxina no cérebro (NUNAN et al., 2003)

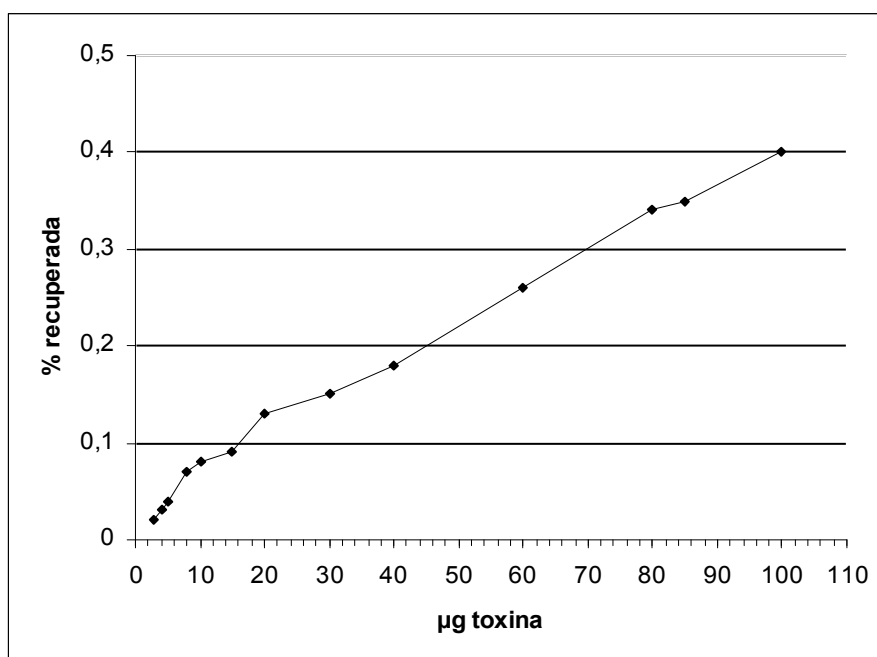


Figura 1- Recuperação no cérebro da quantidade de [^{99m}Tc]-TiTX- γ injetada por via intraperitoneal em ratos de 21 dias.

A partir desses dados foi estipulada então a dose máxima de 2,0 mg/Kg de peso que cada animal poderia receber de TiTX- γ marcada.

4.3.5 Estimulação da liberação de neurotransmissores em cérebro de ratos por TiTX- γ in vivo e sacrifício

Aos 21 dias de idade, os animais dos grupos NE e DE receberam injeção intraperitoneal (IP) de toxina marcada na dose de 2,0 mg/Kg de peso. Os animais controle NC e DC receberam injeção do mesmo de meio utilizado para marcação da toxina.

Noventa minutos após a injeção os animais estimulados foram decapitados e seus cérebros retirados rapidamente sobre placa de gelo, os cérebros foram então seccionados ao meio e colocados em dois tubos distintos, para cada animal, um tubo contendo 500 μ l de TCA 5%, onde o cérebro era macerado para que houvesse contato do TCA com todo o tecido presente, e outro vazio

(todos os tubos foram previamente pesados), os quais foram pesados novamente e seus valores anotados. A metade do cérebro que estava no tubo contendo TCA 5% foi utilizada no ensaio quimioluminescente de acetilcolina; a metade que se encontrava no tubo vazio foi utilizada para os ensaios de proteína e DNA. Os tubos foram mantidos no gelo e a radioatividade cada um foi contada em cintilador gama, e os valores de radioatividade resultante dos dois tubos, de cada animal, foram somados para se obter o valor de radioatividade recuperada em cada cérebro, os tubos foram então congelados a -70°C até o momento das análises.

O mesmo procedimento foi realizado com o controle.

4.3.6 Preparação das amostras e extração do TCA

Os cérebros foram homogeneizados em 500 μl de solução de TCA a 5 %. O homogenato foi aquecido a 100°C por 10 min. e centrifugado por 10 min. a 10.000 g.

A fervura do tecido provoca a precipitação de proteínas e diminui a turvação do sobrenadante após a centrifugação, turvação essa que pode interferir na determinação quimioluminescente da acetilcolina. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido, congelado a -70°C até o momento da dosagem, e o precipitado desprezado. As alíquotas foram descongeladas e o TCA extraído adicionando-se 1,0 ml de éter etílico à amostra e agitando-se em agitador de tubo de vidro por 60 seg. Após a separação das fases, a fase etérea foi removida por sucção e a aquosa mantida no tubo. O procedimento foi repetido mais seis vezes. O éter remanescente foi removido por fluxo de ar. A solução aquosa final mostrou um pH de 4,5-5,0. Adicionou-se ainda a essa amostra 0,05

ml de metaperiodato de sódio 0,5 % com a finalidade de oxidar qualquer agente que pudesse interferir na dosagem posterior da acetilcolina.

4.3.7 Determinação da acetilcolina

Para essa determinação foi usada a técnica desenvolvida por Israel e Lesbasts (1981), modificada por Prado e colaboradores (1990).

O ensaio quimioluminescente foi realizado em tubo inserido na câmara escura do luminômetro, que foi acoplado a um banho, formando uma jaqueta em torno da cubeta, cuja função era manter a temperatura constante a 37°C, essencial para a atividade das enzimas.

Ao tubo foi adicionado 960 µl de tampão glicina, 40 µl do pool enzimático e 200 µl de amostra. O primeiro pico da reação luminosa foi devido principalmente à oxidação da colina já presente do meio. Quando a linha de base foi restabelecida, foi registrado um novo pico devido a luminescência proveniente da oxidação da colina formada pela a hidrólise da ACh, após a adição de 40 µl de solução de acetilcolinesterase 1,6 U. ACh foi quantificada medindo-se a altura dos picos, usando padrões de ACh submetidos ao mesmo tratamento das amostras.

4.3.8. Determinação de Proteína

A dosagem de proteína seguiu o método de Lowry (1951), modificado por Hartree (1972).

Um homogeneizado do tecido foi preparado em tampão Tris-HCl (pH 7,4) na proporção de 1:10. Exatamente 0,1 ml deste homogeneizado foi adicionado a 2,0 ml de NaOH 1N. Essa solução foi então incubada em banho aquecido (50°C)

por 1 hora e resfriada totalmente. Desta solução foram feitas alíquotas de 125 µl em tubos de ensaio em duplicata. Completou-se o volume com água destilada para um volume final de 1,0 ml. Foi adicionado, a cada tubo, um volume de 0,9 ml da solução A (2,0 g de tartarato de sódio e potássio; 100,0 g de carbonato de sódio e 500,0 ml de solução de NaOH 1N) e a mistura aquecida em banho maria a 50 °C por 10 minutos. Após resfriamento, foi adicionado um volume de 0,1 ml da solução B (2,0 g de tartarato de sódio e potássio; 1,0 g de CuSO₄.5H₂O e 10,0 ml de 1N NaOH), seguindo-se homogeneização. Após repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente, foi adicionado 3,0 ml da solução C (um volume de Folin-Ciocalteu (~2N) para cada quinze volumes de água destilada) em jatos, seguido de agitação vigorosa. Logo após, foi incubado em banho aquecido (50°C) por mais 10 minutos. Após resfriamento, realizou-se a leitura das amostras no espectrofotômetro a 650 nm. Albumina bovina sérica (BSH) foi utilizada como padrão.

4.3.9. Determinação de DNA

A determinação do DNA foi realizada procedendo-se de acordo com o método de Prasad et al. (1972), que se baseia na medida da fluorescência desenvolvida pelo brometo de etídio ao interagir com os ácidos nucléicos.

Partindo do homogeneizado de 1:10 preparado para a dosagem de proteínas, foi feita uma diluição 1:6. E seguiram-se os seguintes passos: Pipetou-se um volume de 0,2 ml do homogeneizado diluído que foi transferido para um tubo de ensaio. Adicionou-se um volume de 1,8 ml de tampão Tris-NaCl (pH entre 7,5-8,5) e 2,0 ml de solução de brometo de etídio (2,0 µg/ml). Todas as amostras e padrões foram feitos em duplicata. Foi acrescentado 30 µl de solução de ribonuclease (2,0 µg/ml), para a hidrólise de RNAs. Após

agitação, aqueceram-se os tubos em banho a 50°C, por uma hora. A fluorescência resultante foi lida em espectrofluorímetro, utilizando o comprimento de onda de excitação 365 nm e de emissão 590 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de DNA por grama de tecido, utilizando DNA de salmão como padrão.

4.3.10 Análise estatística dos dados

Foi utilizado ANOVA com a discriminação das médias pelo teste de Duncan.

5. RESULTADOS

5.1 EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SOBRE O PESO CORPORAL E ENCEFÁLICO DOS ANIMAIS

O peso corporal dos animais dos dois grupos, submetidos a duas dietas quantitativamente diferentes (normal e com restrição alimentar), foi acompanhado diariamente. Os animais apresentavam ao nascer pesos que não foram estatisticamente diferentes. Ambos os grupos apresentaram ganho de peso, porém a partir do sétimo dia de vida, após nascimento, pôde-se observar a diferença de peso entre os dois grupos. O grupo desnutrido teve um ganho de peso consideravelmente menor que o grupo normal e apresentou aos 21 dias peso em torno de 60% do peso do grupo normal.

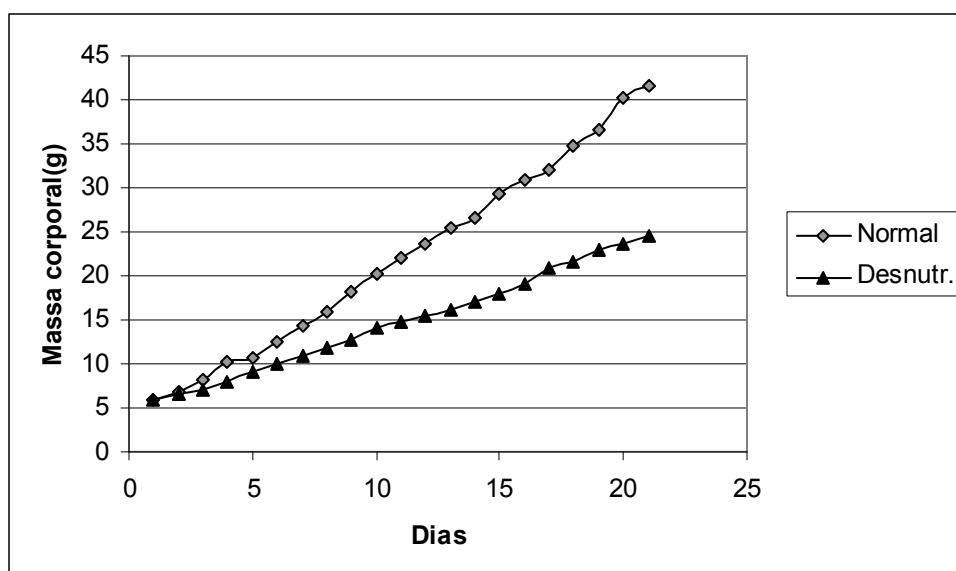


Figura 2 – Crescimento corporal de ratos, do nascimento até o 21º dia de vida. Grupo normal representa ratos filhos de mães normonutridas que receberam dieta *ad libitum* e grupo desnutrido ratos filhos de mães que foram submetidas a 40% de restrição de alimentos em relação à dieta das normonutridas. O peso dos animais desnutridos foi menor a partir do 7º dia ($p \leq 0,05$).

O peso encefálico dos animais dos dois grupos também apresentou alteração devido à restrição alimentar. Os animais submetidos a essa restrição apresentaram, aos 21 dias de vida, peso encefálico significativamente menor que os animais sem restrição. O peso encefálico dos animais do grupo desnutrido foi em torno de 85% do peso encefálico dos animais do grupo normal.

Tabela 1- Massa corporal e encefálica, medida ao sacrifício, de ratos normonutridos e submetidos à restrição de alimentos. $n = 8$

Grupo	Peso corporal (g)	Peso encefálico (g)
Normal	41,62±7,01 ^a	1,09±0,04 ^c
Desnutrido	24,63±1,13 ^b	0,94±0,06 ^d

A restrição consistiu em oferecer aos animais 60% da quantidade de ração ingerida pelos normonutridos. As médias ± EPM sobrescritas com letras distintas indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

5.2 INFLUÊNCIA DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR NA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E DNA CEREBRAL

Os conteúdos de proteína e de DNA no cérebro dos animais dos dois grupos (normonutridos e desnutridos), nas figuras 3 e 4, expressos em miligrama de proteína por grama de tecido ou DNA por grama de tecido, não foram diferentes estatisticamente, apesar de os valores dos grupos desnutridos terem sido um pouco menores.

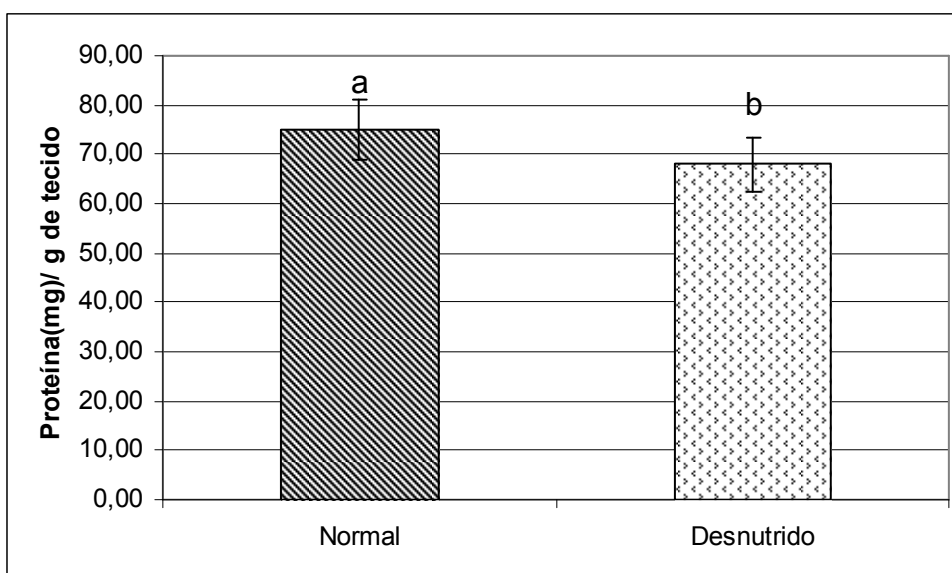


Figura 3 – Conteúdo de proteína cerebral em ratos submetidos a dietas quantitativamente diferentes. Grupo normal representa ratos filhos de mães normonutridas que receberam dieta *ad libitum* e grupo desnutrido ratos filhos de mães que foram submetidas a 40% de restrição de alimentos em relação à dieta das normonutridas. As médias não foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

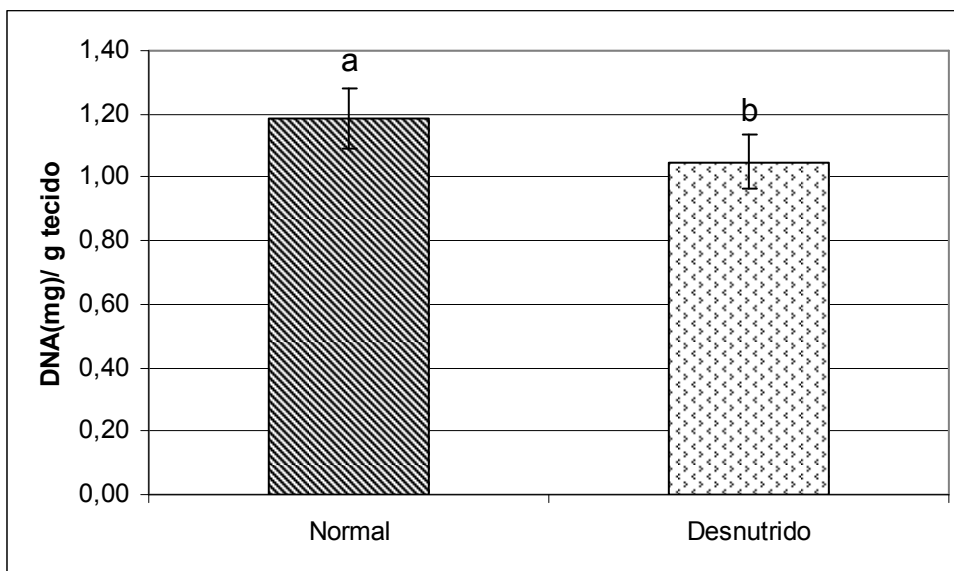


Figura 4 – Conteúdo de DNA cerebral em ratos submetidos a dietas quantitativamente diferentes. Grupo normal representa ratos filhos de mães normonutridas que receberam dieta *ad libitum* e grupo desnutrido ratos filhos de mães que foram submetidas a 40% de restrição de alimentos em relação à dieta das normonutridas. As médias não foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

A relação entre a quantidade de proteína por DNA, figura 5, expressa em miligrama de proteína por miligrama de DNA, não foram estatisticamente diferentes nos grupos normonutridos e desnutridos.

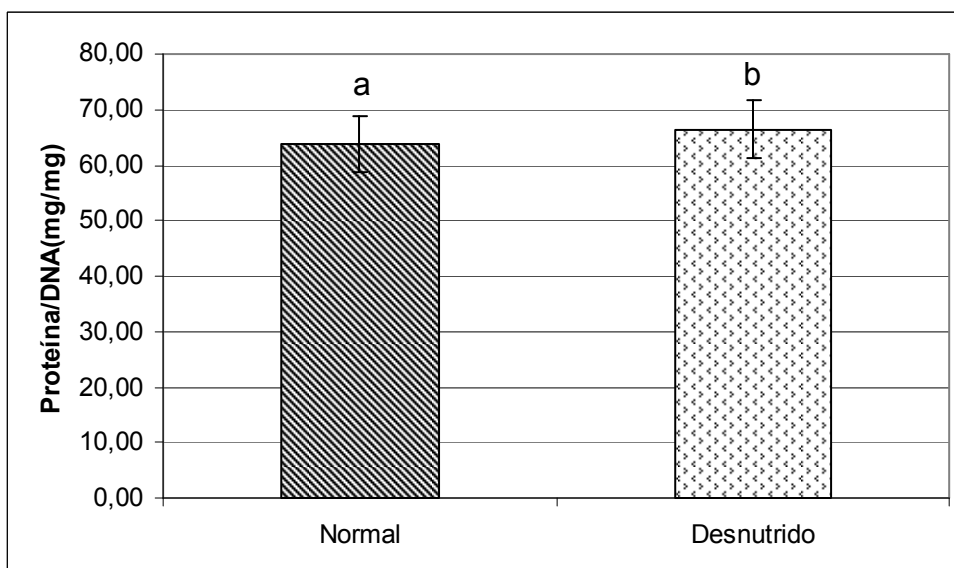


Figura 5 – Relação proteína por DNA no cérebro de ratos submetidos a dietas quantitativamente diferentes. Grupo normal representa ratos filhos de mães normonutridas que receberam dieta *ad libitum* e grupo desnutrido ratos filhos de mães que foram submetidas a 40% de restrição de alimentos em relação à dieta das normonutridas. As médias não foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

5.3 EFICIÊNCIA DA MARCAÇÃO DA TITYUSTOXINA GAMA COM TECNÉCIO 99M

A marcação da Tityustoxina gama foi eficiente e parece não alterar o tamanho da molécula, uma vez que aparece um único pico coincidente tanto para a avaliação da proteína (absorbância) quanto para a radioatividade (cpm) (figura 6), mostrando que a toxina foi efetivamente marcada, pois só há uma quantidade significativa de radioatividade nos tubos que contém toxina.

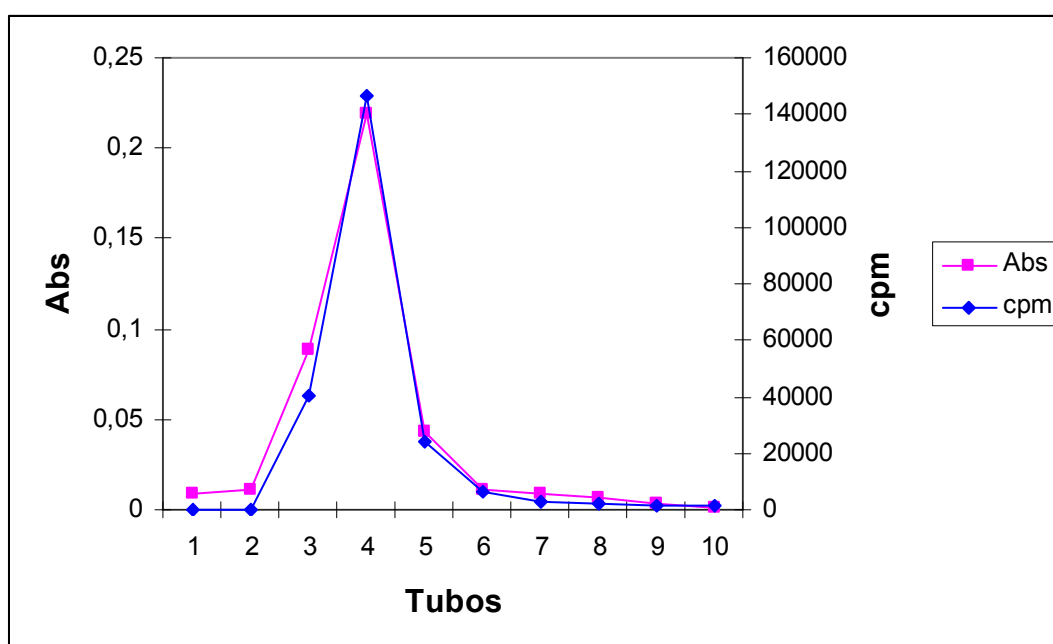


Figura 6 – Perfil de filtração de ^{99m}Tc -Tityustoxina- γ em coluna de gel Sephadex G-10 (13,0 cm x 1,0 cm), eluída com salina. Abs – absorbância em 280 nm. Cpm – contagem por minuto dos tubos contendo, cada um, 1,0 ml da solução eluída.

Quanto ao rendimento da marcação esse também foi satisfatório, obteve-se em torno de 86% de rendimento de marcação. Uma vez que feitas as cromatografias para separação dos contaminantes a amostra de tityustoxina gama marcada apresentou cerca de 2% de tecnécio não reduzido livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e cerca de 12% de tecnécio reduzido livre ($^{99m}\text{TcO}_2$). E após a cromatografia em Sephadex G10 para purificação da toxina marcada, a amostra apresentou-se livre de contaminantes.

5.4 INFLUÊNCIA DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR NA CAPTAÇÃO DE TOXINA RADIOATIVA PELO CÉREBRO.

A quantidade de toxina radioativa que fica retida no cérebro dos animais desnutridos é menor que nos animais normonutridos. Os animais desnutridos os quando receberam a mesma dose (2,0 mg/kg de peso corporal) administrada por via intraperitoneal.

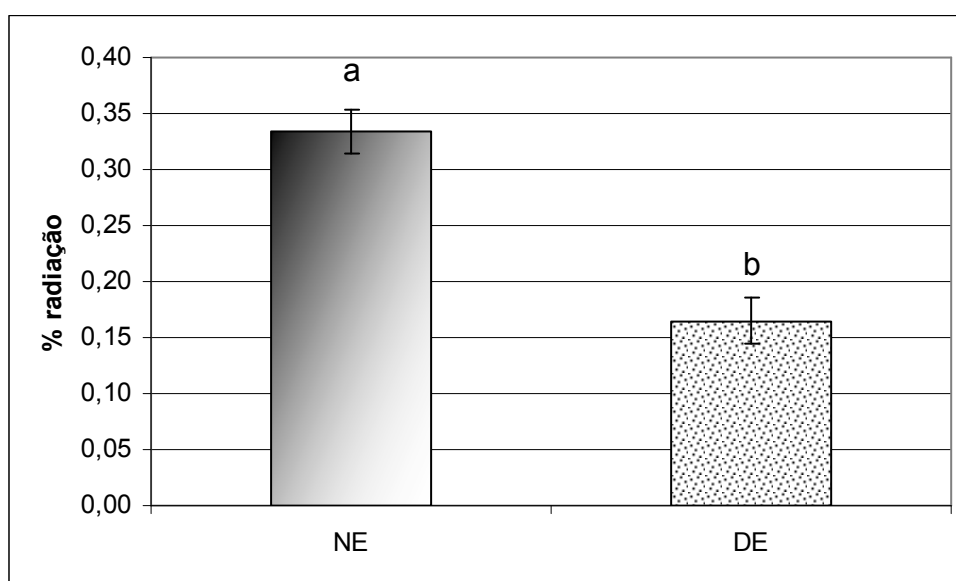


Figura 7 – Porcentagem de radiação recuperada em cérebro de ratos submetidos a dietas quantitativamente diferentes (grupo NE representa ratos filhos de mães normonutridas que receberam dieta *ad libitum* e grupo DE os ratos filhos de mães que foram submetidas a 40% de restrição de alimentos em relação à dieta das normonutridas), injetados intraperitonealmente com mesma dose de TiTX- γ marcada com ^{99m}Tc (2,0 mg/Kg). As barras sobrescritas com letras distintas apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

5.5 EFEITO DA TOXINA $^{99m}\text{Tc-TiTX-}\gamma$ NO CONTEÚDO DE ACh DO CERÉBRO DE RATOS NORMONUTRIDOS E DESNUTRIDOS APÓS O DESMAME

A quantidade de acetilcolina, expressa em nmol de ACh por grama de tecido, conforme figura 8, nos cérebros dos animais do grupo DC foi estatisticamente

menor (32%) do que aquela encontrada nos animais do grupo NC (grupos de animais controle, sem estímulo de $^{99m}\text{Tc-TiTX-}\gamma$). Efeito semelhante da desnutrição se observa quando o sistema colinérgico foi estimulado por $^{99m}\text{Tc-TiTX-}\gamma$. A quantidade de ACh encontrada foi significativamente menor (31%) em DE do que a encontrada em NE (grupos de animais estimulados).

Os teores de ACh encontrados nos cérebros dos animais, expressos em nmol de ACh por grama de tecido, figura 8, foram estatisticamente maiores (cerca de 45%) nos animais que receberam estímulo de $^{99m}\text{Tc-TiTX-}\gamma$ do que nos animais que receberam injeção de meio utilizado para marcação com tecnécio.

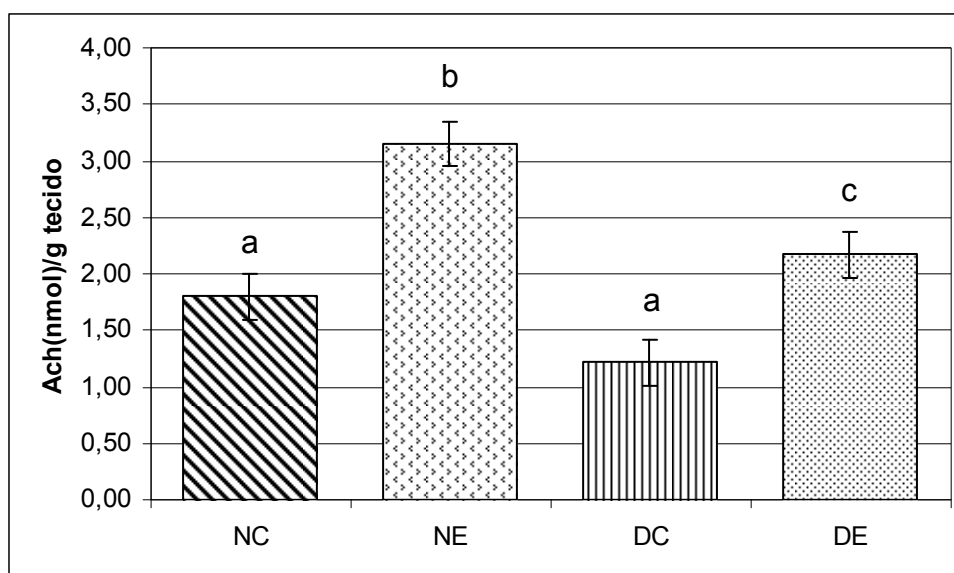


Figura 8 – Teor de acetilcolina ACh (nmol) por grama de tecido, na ausência (controle) e presença (estimulado) de $^{99m}\text{Tc-TiTX-}\gamma$ no cérebro de ratos submetidos a dietas quantitativamente diferentes (grupo normal representa ratos filhos de mães normonutridas que receberam dieta ad libitum e grupo desnutrido os ratos filhos de mães que foram submetidas a 40% de restrição de alimentos em relação à dieta das normonutridas). NC e NE representam os animais normais controle e estimulado respectivamente e DC e DE representam os animais desnutridos controle e estimulado respectivamente. As barras sobrescritas com letras distintas apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Expressando-se quantidade de ACh cerebral em nmol por mg de DNA (figura 9) e em nmol de ACh por mg de proteína (figura 10), de modo semelhante ao ocorrido com os valores por grama de tecido, os animais desnutridos, estimulados por $^{99m}\text{Tc-TiTX-}\gamma$, apresentaram menores teores de acetilcolina no cérebro do que os normonutridos estimulados e maiores do que os não estimulados.

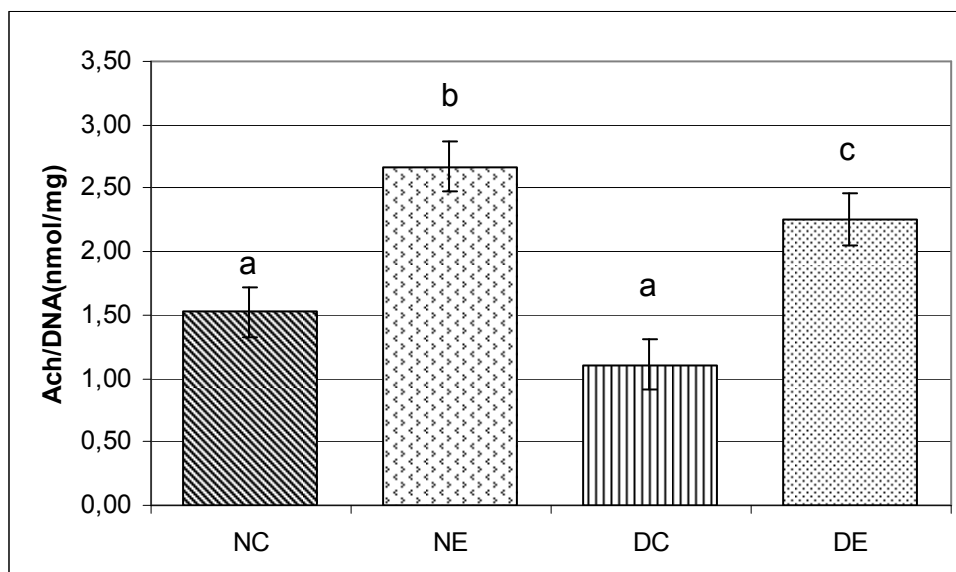


Figura 9 – Teor de acetilcolina expressa em nmol de ACh por mg de DNA, na ausência (controle) e presença (estimulado) de $^{99m}\text{Tc-TiTX-}\gamma$, no cérebro de ratos submetidos a dietas quantitativamente diferentes (grupo normal representa ratos filhos de mães normonutridas que receberam dieta ad libitum e grupo desnutrido os ratos filhos de mães que foram submetidas a 40% de restrição de alimentos em relação à dieta das normonutridas). NC e NE representam os animais normais controle e estimulado respectivamente e DC e DE representam os animais desnutridos controle e estimulado respectivamente. As barras sobscritas com letras distintas apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

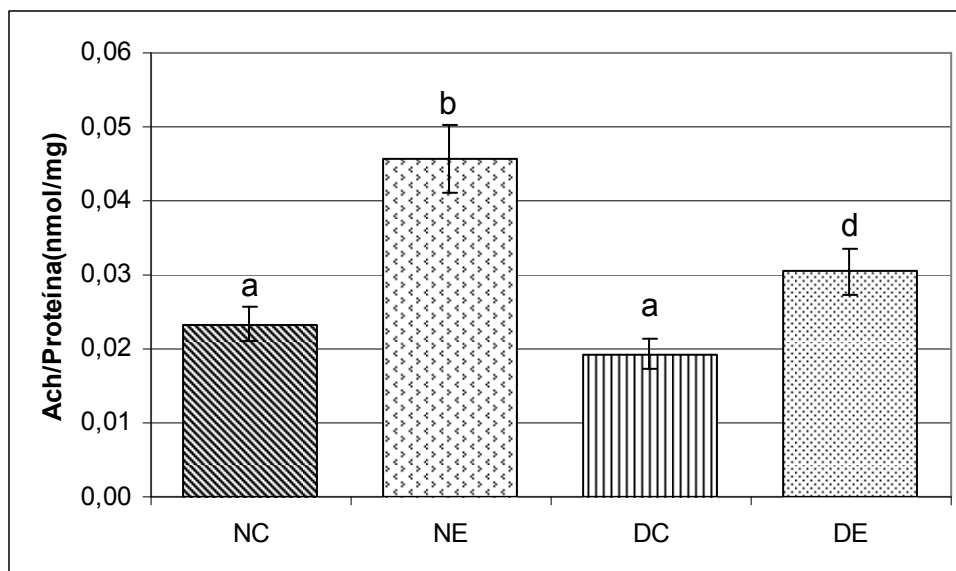


Figura 10 – Teor de acetilcolina expressa em nmol de ACh por mg de proteína, na ausência (controle) e presença (estimulado) de TiTX- γ marcada ^{99m}Tc , no cérebro de ratos submetidos a dietas quantitativamente diferentes (grupo normal representa ratos filhos de mães normonutridas que receberam dieta *ad libitum* e grupo desnutrido os ratos filhos de mães que foram submetidas a 40% de restrição de alimentos em relação à dieta das normonutridas). NC e NE representam os animais normais controles e estimulados respectivamente e DC e DE representam os animais desnutridos controles e estimulados respectivamente. As barras sobrescritas com letras distintas apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Quando comparado o teor total de acetilcolina contido no cérebro dos animais controle e estimulados, expresso em nmol de ACh por cérebro (figura 11), verifica-se que o efeito produzido pela ^{99m}Tc -TiTX- γ injetada aumenta a quantidade de acetilcolina, resultado já obtido quando se expressa a concentração desse neurotransmissor por g de tecido, mg de proteína e mg de DNA.

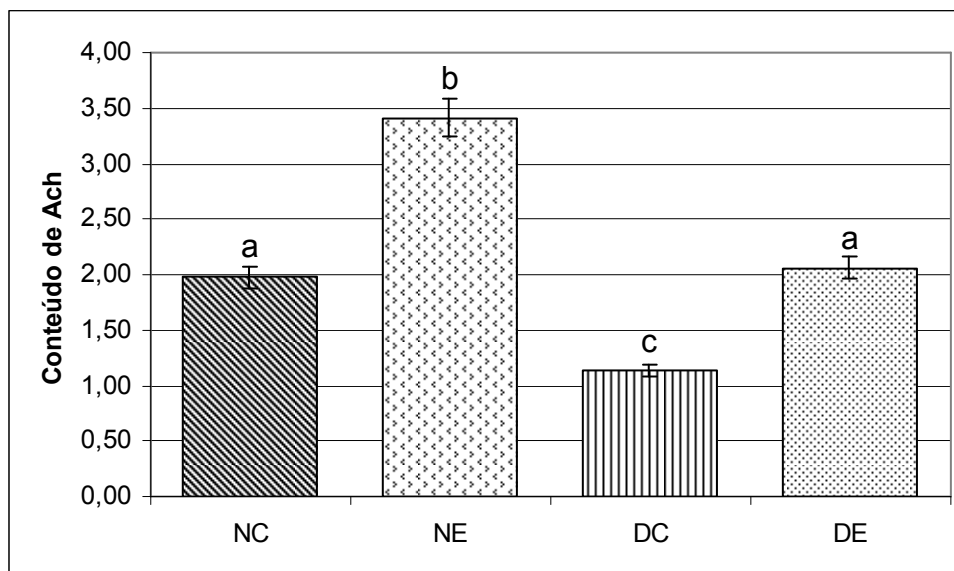


Figura 11 – Teor de acetilcolina total em cérebro de ratos, expresso em nmols de ACh, na ausência (controle) e presença (estimulado) de $^{99m}\text{Tc-TiTX-}\gamma$. Os animais foram submetidos a dietas quantitativamente diferentes (grupo normal representa ratos filhos de mães normonutridas que receberam dieta *ad libitum* e grupo desnutrido os ratos filhos de mães que foram submetidas a 40% de restrição de alimentos em relação à dieta das normonutridas). NC e NE representam os animais normais controles e estimulados respectivamente e DC e DE representam os animais desnutridos controles e estimulados respectivamente. As barras sobrescritas com letras distintas apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A restrição alimentar imposta durante a fase de amamentação demonstrou ocasionar um déficit no crescimento e desenvolvimento corporal e encefálico dos animais. A restrição imposta tem sido mostrada ser benéfica para animais adultos, possibilitando condições salutaras para o organismo e promovendo maior longevidade (DE ANGELIS, 2001). Contudo em animais em desenvolvimento o efeito da desnutrição tem conseqüências bem conhecidas, como diminuição do peso e da síntese protéica. Esta observação confirma dados anteriores (WINICK e NOBLE, 1966, SANTOS e MORAES-SANTOS, 1979, MORAES-SANTOS, 1980 e 1981). O desenvolvimento do cérebro também foi afetado pela restrição alimentar, pois os animais apresentaram pesos cerebrais menores que os dos animais

normonutridos, como descrito na literatura (WINICK e NOBLE, 1966). Nessa fase, período da amamentação, ocorre o “surto do crescimento” e é o período em que há maior crescimento e divisão celular. Em ratos, esse período cessa na época do desmame (WINICK, 1970), portanto, a restrição alimentar imposta nessa fase leva a diminuição da síntese protéica, número e tamanho das células (WINICK e NOBLE, 1966; SANTOS e MORAES-SANTOS, 1979).

Desta forma, poder-se-ia esperar que entre os efeitos adversos da desnutrição a barreira hematoencefálica se encontrasse mais permeável. Hipótese que não pôde ser confirmada no presente estudo, uma vez que não foram feitos estudos de permeabilidade da barreira.

Quando se observou a concentração de proteína e a de DNA por grama de tecido percebeu-se que não houve diferença significativa entre os grupos normonutridos e desnutridos. Isso é de se esperar, já que se trata de um cérebro menor nos animais desnutridos, mas de constituição macromolecular semelhante. Os dados semelhantes da relação proteína/DNA confirmam essa conclusão. Observações semelhantes foram relatadas anteriormente (DOBBING, 1968; MORAES-SANTOS, 1980).

Trabalhos do nosso grupo têm mostrado que a marcação de proteínas com tecnécio-99m é uma ferramenta eficaz para estudos de biodistribuição em animais experimentais. No presente estudo verificou-se que a $^{99m}\text{Tc-TiTX-}\gamma$ injetada periféricamente estava presente no cérebro e foi capaz de exercer atividade fisiológica, tal como aumentar o teor de acetilcolina em quantidades diferentes em animais normonutridos e desnutridos. Estes últimos, sabidamente, possuem menos sítios de ligação no cérebro para a toxina utilizada experimentalmente (BASS, 1970; CRAGG, 1972).

A porcentagem de captação da toxina radioativa pelos cérebros dos animais desnutridos mostrou-se bem menor que nos animais normonutridos. Apesar de esse dado contrariar a hipótese de uma possível alteração na barreira hematoencefálica, o resultado não surpreende, uma vez que os animais desnutridos teriam menor quantidade de sítios de ligação de alta afinidade para a TITX- γ , os canais de sódio (BASS, 1970; CRAGG, 1972), presentes nas sinapses que por sua vez dependem da arborização dendrítica do neurônio (CORDERO et al., 2003). Esses canais são proteínas transmembranas presentes na membrana celular dos neurônios e estão agrupados em discretas áreas da membrana axonal, nos nodos de Ranvier, onde a bainha de mielina é interrompida (MASSACRIER et al., 1990). Durante a fase crítica do desenvolvimento ocorre o maior incremento dos processos (dendritos e axônios) e formação de sinapses (CALLEY e MAXWELL, 1968). Estudos morfológicos indicam alterações provocadas pela desnutrição nestas estruturas (BASS, 1970; CRAGG, 1972) com diminuição das ramificações dendríticas (MORGAN e WINICK, 1985). Dessa forma, pode-se aceitar que neurônios de animais desnutridos possam existir em menor quantidade e terão menos locais para ligação da toxina do escorpião, portanto, retendo menor quantidade de toxina proveniente da circulação sanguínea. Essa conclusão é corroborada pelo fato de que menor número de sinapses levaria a uma menor concentração de neurotransmissores no cérebro dos animais desnutridos. Este fato foi demonstrado pela avaliação de maior quantidade de acetilcolina no tecido nervoso dos animais normonutridos do que em animais desnutridos.

É sabido da literatura que a desnutrição causa modificações bioquímicas, fisiológicas, anatômicas e comportamentais resultando em efeitos de longa duração ou até mesmo permanentes (MORGANE et al., 1978). Assim sendo, sistemas neurotransmissores são afetados pela desnutrição (ROTTA, 2003), com

alteração que diminui a eficiência da síntese de acetilcolina (NASCIMENTO et al., 1991).

Dessa forma nossos dados indicam que a TiTX- γ atravessa a barreira hematoencefálica de animais jovens, promove acúmulo de acetilcolina, e estão de acordo com os estudos de Guidine et al (2008) que sugere que toxinas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, sobre o sistema nervoso central, desempenham um papel mais importante no aparecimento de sintomas graves, o que explica o aumento da incidência de envenenamentos graves em pacientes jovens.

7. CONCLUSÃO

A desnutrição neonatal diminuiu o teor de acetilcolina no cérebro provavelmente por diminuir a arborização dendrítica e por conseqüência o número de sinapses colinérgicas.

A estimulação do sistema central colinérgico pela ^{99m}Tc -TiTX- γ , avaliado pelo teor de acetilcolina, foi menos intensa no animal desnutrido do que no animal normonutrido.

TiTX- γ atravessa a barreira hematoencefálica e acumula-se em maior quantidade no cérebro de animais normonutridos do que no cérebro de animais desnutridos, provavelmente porque esses últimos possuem menos sítios de ligação para a toxina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN, E.O., Issues in management of scorpion sting in children. **Toxicon**, v. 30 p. 111-115, 1992.

ARANTES, E.C., NETO, F.R., SAMPAIO, S.V., VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R., (Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1199, p.69-75, 1994.

BARHANIN, J., GIGLIO, J.R., LÉOPOLD, P., SCHIMID, A., SAMPAIO, S.V. AND LAZDUNSKI, M. *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. Tityus γ -toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na⁺ channel. **Journal of Biological Chemistry** v.257, p. 12.553-12.558, 1982.

BARHANIN, J., ILDEFONSE, M., ROUGIER, O., SAMPAIO, S.V., GIGLIO, J.R. AND LAZDUNSKI, M. Tityus γ -toxin, a high affinity effector of the Na⁺ channel in muscle, with a selectivity for channels in the surface membrane **Pflügers Arch.** V.400, p. 22-27, 1984.

BASS, N.H. NETSKY, M.G. AND YOUNG, E. Effect of neonatal malnutrition on developing cerebrum. **Archives Neurology** v.23, p. 289-302, 1970.

BEDI, K.S., Nutritional effects on neuron numbers, **Nutritional Neuroscience**, v.6, p.141-152, 2003.

BERNHARDI, R. The Blood-Brain Barrier and the Pathology of the Central Nervous System: Its importance for the Inflammatory Response. **Revista Chilena de Neuropsiquiatria**; v.42, p.121-130, 2004

BERTELLI, M.S.B.; VASQUEZ, C.E.; FASOLI, C.; WORM, C.; TRICHES, G.L.; PEROTONNI, J.S.; BOFF, R.V.; Barreira hematoencefálica. **Revista científica da AMECS**; v. 3, p.34-6, 1994.

CALLEY, D.W. AND MAXWELL, D.S., An electron microscopic study of neurons during postnatal development of rat cerebral cortex. **The Journal of Comparative Neurology.**, 133, p.17-44, 1968.

CARVALHO, F.F., NENCIONI, A.L.A., LEBRUN, I., SANDOVAL, M.R.L., DORCE, V.A.C., Behavioral, electroencephalographic, and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from Tityus serrulatus scorpion venom in rats, **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.60, p. 7-14, 1998

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 Science**; v.66; p.185–192, 2000.

CORDERO, M.A., VALENZUELA, C.Y., RODRIGUEZ, A., ABOITIZ, F., Dendritic morphology and orientation of pyramidal cells of the neocortex in two groups of early postnatal undernourished– rehabilitated rats, **Developmental Brain Research**, v.142, p.37–45, 2003

COURAUD, F.; JOVER, E.; DUBOIS, J. M.; ROCHAT, H., Two types of scorpion neurotoxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. **Toxicon** v.20, p.9-16, 1982

CRAGG, B.G., The development of cortical synapses during starvation in the rat. **Brain**, v.95, p.143-150, 1972

DALE, H. H., Pharmacology and nerve endings. **Proceedings Royal Society of Medicine**, v.28, p.319-332, 1935

DE ANGELIS, R. C., Novos conceitos em nutrição: reflexões a respeito do elo dieta e saúde. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.38, p.269-271, 2001.

DOBBING, J., Effects of experimental malnutrition on development of nervous system. In: Malnutrition learning and behavior. **The MIT Press**, p 181-202, 1968.

DUNANT, Y. AND ISRAËL, M., The release of acetylcholine. **Scientific American**, v. 252 (4), p. 40-48, 1985.

ESPÍNDOLA, F.S. **Desnutrição protéico calórica neonatal em ratos; Influência na liberação e produção de acetilcolina no córtex cerebral, sob a ação in vitro da tityustoxina**. Dissertação de Mestrado, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, 1983.

FATANI A.J., HARVEY A.L., FURMAN B.L., ROWAN E.G., The effects of lignocaine on actions of the venom from the yellow scorpion “*Leiurus quinquestriatus*” in vivo and in vitro. **Toxicon**, v.38, p.1787–1801, 2000.

FERNANDEZ-BOUZAS A, MORALES-RESENDIZ M.L., LLAMAS-IBARRA F., MARTINEZ-LOPEZ, M., BALLESTEROS-MARESMA A., Brain infarcts due to scorpion stings in children. MRI. **Neuroradiology**; v.42, p.118–120, 2000.

FONNUM, F. The comparison of cholineacetyltransferase withim the synaptosome. **Biochemical Journal**, v. 103, p. 262-267, 1967.

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

Funasa, M.D.S. Manual de Diagnóstico e Tratamento por Animais Peçonhentos. Brasília; 2001.

GOLDSTEIN, G. W., BETZ, A. L. The blood–brain barrier. **Scientific American** , v.255, p.74–83, 1986.

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

GOMEZ, M.V., DINIZ, C.R. AND BARBOSA, T.S. A comparison of the

effects of scorpion venom tityustoxin and ouabain on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain. **Journal of Neurochemistry** v.24, p. 331-336, 1975.

GOMEZ, R.S. CASALI, T.A.A. ROMANO-SILVA, M.A. CORDEIRO, M.N., DINIZ, C.R., MORAES-SANTOS, T. PRADO, M.A.M. AND GOMEZ, M.V. The effect of PhTX3 on the release of 3H-acetylcholine induced by tityustoxin and potassium in brain cortical slices and myenteric plexus. **Neuroscience Letters**, v.196, p.131-133, 1995.

GONÇALVES, L.A.:(2001) **Efeito da restrição alimentar e do envelhecimento sobre o sistema colinérgico cortical de ratos**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas Faculdade de Farmácia ,UFMG. Belo Horizonte, MG, 2001

GUERON, M.; ILIA, R.; SOFER, S.; CLIN, J., Renin and aldosterone levels and hypertension following envenomation in humans by the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus*. **Toxicon**, v. 30, p. 245-258, 1992.

GUIDINE, P.A.M., MORAES-SANTOS, T., MASSENSINI, A.R., MORAES, M.F.D., Carbamazepine protects the CNS of Wistar rats against the central effects of scorpion envenomation, **NeuroToxicology**, v. 29, p.136–142, 2008

HÁRTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**., v. 48, p. 422-427, 1972.

HAYASHI Y, NOMURA M, YAMAGISHI S, HARADA S, YAMASHITA J, YAMAMOTO H. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. **Glia**, v.19, p.13-26, 1997.

HUBER, J.D., EGLETON, R.D., DAVIS, T.P., Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. **Trends in Neuroscience**, v.24, p. 719–725, 2001.

ISMAIL, M.; KERTESZ, G.; OSMAN, O. H; SIDRA, M. S. Distribution of ¹²⁵I labelled scorpion (*Leiurus quinquestriatus* H & E) venom in rat tissues. **Toxicon**, v.12, p. 209-211, 1974.

ISMAIL, M., ABD-ELSALAM, M. A.; AL-AHAIDIB, M. S., *Androctonus crassicauda* (Olivier), a dangerous and unduly neglected scorpionI. Pharmacological and clinical studies **Toxicon**, v. 32, p. 1599- 1618, 1994.

ISRAËL, M.; LESBATS, B., Continuous determination by a chemiluminescent method of acetylcholine release and compartmentation in Torpedo electric organ synaptosomes. **Journal of Neurochemistry**, v.37, p.1475-83, 1981.

JONES, D.G., The vulnerability of the brain to undernutrition. **Science Progress Oxford**, 63, p 17-23, 1976.

KRIFI, M.N.; KHARRAT, H.; ZGHAL, K.; ABDOULI, M.; ABROUG,F., BOUCHOUCHA, S.; DELAGI, K.; EL AYEB, M., Development of an Elisa for the detection of scorpion venoms in sera of humans envenomed by androctonus australis garzonii (AAG) and buthus occitanus tunetanus (BOT): correlation with clinical severity of envenoming in Tunisia **Toxicon**, v. 36, p. 887-900, 1998.

KUHAR, M. J., MURRIN, L. C., Sodium-dependent, high affinity choline uptake. **Journal of Neurochemistry**, v.30, p.15-21, 1978.

LOMBET, A. AND LAZDUNSKI, M. Characterization, solubilization, affinity labeling and purification of the cardiac Na⁺ channel using tityus toxin. **Eur. J. Biochem.** v.141, p. 651-660, 1984.

LOPES, A.C.P., ROSA, L.C. BELEBONI3, R.O., PEREIRA, R.N.R., VASCONCELOS, C.A.C., MOREIRA, J.E., Molecular aspects of synaptic transmission, **Medicina, Ribeirão Preto**, v.32, p.167-188, 1999.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry.**, v.193, p. 265-275, 1951.

MAFRA, R. A. **Alteração no sistema nervoso central colinérgico pela desnutrição neonatal.** Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia ICB, UFMG. Belo Horizonte, MG, 1983.

MARANGONI, S., TOYAMA, M.H.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; SILVA, C.A.; CARNEIRO, E.M.; GONÇALVES, A.A.; OLIVEIRA, B., Amino acid sequence of TsTX-V, an α -toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K^+ permeability of β -cell from isolated rats islets of Langerhans. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1243, p. 309-314, 1995.

MARCHI N, CAVAGLIA M, FAZIO V, BHUDIA S, HALLENE K, JANIGRO D. Peripheral markers of blood-brain barrier damage. **Clinica Chimica Acta**; v.342, p.1-12, 2004

MARTIN, M.F; BECHIS. G.; AL AYEB, M.; SAMPIERI, F.; BRANDO, T.; DINIZ, C.R. ROCAHT, H., Purification and characterization of eight toxins from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v.23, p. 594, 1985.

MASSACRIER, A., COURAUD, F. AND CAU, P. Voltage-sensitive Na^+ channels in mammalian peripheral nerves detected using scorpion toxins. **Journal of Neurocytology**, v.19, p. 850-872, 1990.

MASSENSINI, A.R.; ROMANO-SILVA, M.A; GOMEZ, M.V. Sodium Channel Toxins and Neurotransmitter Release, **Neurochemical Research**, v.28 (10), p.1607–1611, 2003.

MESQUITA, M.B.S, MORAES-SANTOS T., MORAES M.F.D., Centrally injected tityustoxin produces the systemic manifestations observed in severe scorpion poisoning. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.187, p.58–66, 2003.

MOLLGARD, K., SUNDEERS, N.R., Complex tight junctions of epithelial and endothelial cells in early foetal brain. **Journal of Neurocytology**, v. 4, p. 453– 468, 1975.

MORAES-SANTOS, T., Effect of maternal protein undernutrition on growth and development of rat brain progeny. **Nutrition Reports International**, v.20, p. 215-224, 1979.

MORAES-SANTOS, T. Effect of protein-calorie malnutrition on growth and development of neonatal rat forebrain. **Nutrition Reports International**, v.21, p.171-181, 1980.

MORAES-SANTOS, T., Dietary effects on in vitro rat neuronal protein synthesis during growth and development. **Brain Research Bulletin**, v.7, p.385-389, 1981.

MORGAN, B.L.G.; WINICK, M. Pathological effects of malnutrition on the Central Nervous System. In: SIDRANSKY, H. (Ed.) **Nutritional pathology; pathobiochemistry of dietary imbalances**. New York: Marcel Dekker, p.400, 1985.

MORGANE, P., MILER, M., STERN, W., BRONZINO, J., KISSANE, J., HAWRELEWICZ, E., RESNICK, O., The effects of protein malnutrition and developing central nervous system in the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** , v.2, p.137-230, 1978.

MORGANE, P.J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** , v.26, p. 471-483, 2002

NASCIMENTO, C.L.C.; GOMEZ, M.V.; MORAES-SANTOS, T. Acetylcholine and related enzymes from neonatal malnourished rat cerebral cortex. **Nutrition Research**, v.11, p.129-132, 1991.

NICHOLLS, D.G. The glutamatergic nerve terminal. **European Journal Biochemistry**, v.272, p.613-631, 1993.

NICOLATO, R., FERNANDES, V. M., MORAES-SANTOS, T., GOMEZ, R. S., PRADO, M. A., ROMANO-SILVA, M. A., AND GOMEZ, M. V. Release of gamma-[(3)H]aminobutyric acid in rat brain cortical slices by alpha-scorpion toxin. **Neuroscience Letters** V.325, p.155–158, 2002.

NUNAN, E.A., CARDOSO, V.N., MORAES-SANTOS, T., Lethal effect of the scorpion *Tityus serrulatus* venom: Comparative study on adult and weanling rats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 37 , p. 39-44, 2001

NUNAN EA, MORAES MFD, CARDOSO VN, MORAES-SANTOS T. Effect of age on body distribution of tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Life Science**, v.73, p.319–325, 2003.

OSMAN, O. H.; ISMAIL, M.; WENGE, T., Hyperthermic response to intraventricular injection of scorpion venom: role of brain monoamines. **Toxicon**, v.11, p.361-368, 1973.

OSNAYA-ROMERO, N., MEDINA-HERNANDEZ, T.D., FLORES-FERNANDEZ SS, LEON-ROJAS, G. Clinical symptoms observed in children envenomated by scorpion stings, at the children's hospital from the State of Morelos, Mexico. **Toxicon**; v.39, p.781–785, 2001.

PLATE, K. H. Mechanisms of angiogenesis in the brain. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology** , v. 58, p.313–320, 1999.

PRADO, M.A.M.; MORAES-SANTOS, T.; FREITAS, R.N.; SILVA, M.A.R.; GOMEZ, M.V.; Choline oxidase chemiluminescent assay, after removal of eserina from médium, of acetylcholine release in vitro from brain slices. **J. Neuroscience Methods**, v.31, p.193-196, 1990.

PRASAD, A.S.; DUMOUNDHELLE, E.; KONIUCH, D.; OBERLEAS, D. A simple fluorometric assay for the determination of RNA and DNA in tissues. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.80, p. 598-601, 1972..

REZENDE, M.B. **Efeito da desnutrição pós-natal na resposta colinérgica estimulada in vivo por toxina gama do escorpião *Tityus serrulatus***.. Dissertação de mestrado, ICB, UFMG Belo Horizonte, MG, 1991.

REVELO, M. P., BAMBIRRA, E.A., FERREIRA, A.P., DINIZ, C.R., CHAVEZOLORTEGUI, C., Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. **Toxicon**, v.34, p.1119–1125, 1996.

RISAU, W., AND WOLBURG, H. Development of the blood–brain barrier. **Trends in Neuroscience**, V.13, p.174–178,1990.

ROTTA, L.N. SCHMIDT, A. P., SOUZA, T.M., NOGUEIRA, C.W. SOUZA, K.B., IZQUIERDO, I.A., PERRY, M.L.S., SOUZA, D.O., Effects of undernutrition on Glutamatergic Parameters in Rat Brain, **Neurochemical Research**., v.28, p. 1181–1186, 2003.

RUBIN, L.L., STADDON, J.M. The cell biology of the blood-brain barrier. **Annual Review of Neuroscience**, v.22, p.11-28, 1999.

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

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

SANTOS, R.C.; MORES-SANTOS, T.; Effects of neonatal malnutrition on leucine renewal and protein biosynthesis in neurons of rats. **Brain Research Bulletin**, v.4; p. 207-211, 1979.

SAUNDERS N.R., KNOTT G.W., DZIEGIELEWSKA K.M., Barriers in the immature brain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.20, p. 29-40, 2000.

SOFER, S.; GUERON, M., Respiratory failure in children following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus*: Hemodynamic and neurological aspects **Toxicon** , v.26 , p. 93 I-939, 1988.

SONG, H.S., SON, M.J., LEE, Y.M., KIM, W.J., LEE, S.-W., KIM, C.W., KIM, K.W., Oxygen tension regulates the maturation of the blood–brain barrier. **Biochemical and biophysical research communications**, v.290, p.325–331, 2002.

TUCEK, S. Choline acetyltransferase. In: Acetylcholine synthesis in neurons. London, **Chapman and Hall**. p.3-32, 1978.

VIJVERBERG, H.P.M., PAURON, D., LAZDUNSKI, M. The Effect Of *Tityus Serrulatus* Scorpion Toxin Γ On Na^+ Channels In Neuroblastoma Cells. **Pflügers Archive**. V. 401, p.297-303, 1984.

VORBRODT, A.W., DOBROGOWSKA, D.H., Immunocytochemical evaluation of blood–brain barrier to endogenous albumin in adult, newborn and aged mice. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 32, p. 63–70, 1994

WINICK, M.; NOBLE, A., Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **Journal of Nutrition**, v.89, p.300-306, 1966.

WINICK, M.. Nutrition and nerve cell growth. **Federation Proceedings**, v.29, p.1510-1515, 1970.

YAMAMURA, H.I.; SNYDER, S. H. Choline: high-affinity uptake by rat brain synaptosomes. **Science**, v.178, p 626-628, 1972.