

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

**ELTON DA SILVA MORENO
GRACIELE AP. ALHER GARROTE
LETICIA BERTIN PEREIRA**

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM VENENO
EXTRAÍDO DO ESCORPIÃO AMARELO - *Tityus*
serrulatus SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO TUMOR
ASCÍTICO DE EHRLICH**

BAURU
2011

ELTON DA SILVA MORENO
GRACIELE AP. ALHER GARROTE
LETICIA BERTIN PEREIRA

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM VENENO
EXTRAÍDO DO ESCORPIÃO AMARELO - *Tityus*
***serrulatus* SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO TUMOR**
ASCÍTICO DE EHRLICH

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de Farmacêutico sob orientação da Prof^a. Dr^a. Dulce Constantino.

BAURU
2011

ELTON DA SILVA MORENO
GRACIELE AP. ALHER GARROTE
LETICIA BERTIN PEREIRA

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM VENENO EXTRAÍDO DO
ESCORPIÃO AMARELO - *Tityus serrulatus* SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Sagrado Coação como parte dos requisitos para obtenção do título de Farmacêutico sob orientação da Prof.^a. Dr.^a. Dulce Constantino.

Prof.^a.Dr.^a. Dulce Constantino.
Universidade Sagrado Coração

Prof. Ms. Fernando Tozze Alves Neves.
Universidade Sagrado Coração

Prof.^a Ms. Marcia Clélia Leite Marcellino
Universidade Sagrado Coração

Bauru 08 de Dezembro de 2011

Dedicamos este trabalho aos nossos pais,
irmãos e familiares por nos darem força
e acreditarem na nossa capacidade
de vencer e realizar os nossos sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Deus, em primeiro lugar, por nos guiar e estar sempre ao nosso lado em todos os momentos difíceis da nossa trajetória.

À Prof.^a Dr.^a. Dulce H. J. Constantino, nossa orientadora e amiga que nos proporcionou a realização do nosso sonho, por acreditar que seríamos capazes de realizar este trabalho. Obrigado pela ajuda, paciência e dedicação nessa caminhada que nos trouxe grandes satisfações.

A Prof.^a Dr.^a. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato pelo incentivo, conselhos, dedicação para conosco. Você é para nos um exemplo ser seguido.

A Prof.^a Silvia Regina Barrile pela atenção e ajuda com nosso trabalho.

Ao amigo Josias Ribeiro Lopes, pela doação dos escorpiões amarelos colaborando com nosso trabalho, sem a sua ajuda não haveria a realização do mesmo.

As funcionárias do biotério, Jusceleine Viana Lopes e Ana Carolina Santos Gonçalves, pelo carinho e ajuda na realização do tratamento dos animais.

Às biólogas Fabiane Bortoluci da Silva, Ligia Maria Alves Belmonte Honorato, por nos auxiliar sempre nas realizações de procedimentos no laboratório de biologia.

Ao Prof. Especialista Fernando Tozze Alves Neves pela atenção, disponibilidade e pelo incentivo e por ser um amigo presente .

À nossa amiga Marcela Maziero Nascimento pela ajuda, atenção para conosco na formatação do trabalho.

À USC pelo apoio financeiro e toda a estrutura necessária para realização do trabalho.

“Segredo do sucesso é a constância do propósito.”
(Benjamin Disraeli)

RESUMO

Nos dias atuais vem se empregando diversas pesquisas no ramo do tratamento de câncer, visando novas descobertas para encontrar a cura das neoplasias. Neste estudo buscamos correlacionar o efeito do tratamento com o veneno do escorpião amarelo sobre o crescimento do tumor de Ehrlich. O veneno do escorpião amarelo foi extraído *in vivo* com uma técnica experimental, que é diluído até a concentração apropriada para a metodologia usada na pesquisa. Foram empregados neste estudo 20 camundongos Suiços, machos, com idade 30 a 45 dias divididos em dois grupos, sendo 10 animais tratados com soro fisiológico e outros 10 animais tratados com veneno. Como parâmetro de avaliação foi tomado o crescimento tumoral, a produção de óxido nítrico NO, o influxo e espraçamento de macrófagos. Constatou-se que o tratamento com o veneno do escorpião amarelo reduziu o crescimento tumoral, não influenciou a produção de óxido nítrico. O veneno do *T. serrulatus* mostrou importante efeito quimiotático para macrófagos, porém, não foi capaz de induzir a um aumento na taxa de espraçamento dos mesmos. Com base nos resultados encontrados podemos ressaltar que o tratamento com veneno possui efeito significativo no controle do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich e estudos posteriores são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos neste evento.

Palavras-chave: Veneno. Escorpião (*Tityus serrulatus*). Neoplasia. Tumor ascítico de Ehrlich.

ABSTRACT

In the present day has been employing various research in the field of cancer treatment, new discoveries in order to find a cure for cancer. This study aims to correlate the effect of treatment with the venom of the yellow scorpion on the growth of Ehrlich tumor. The yellow scorpion venom was extracted with an *in vivo* experimental technique, which is diluted to the appropriate concentration for the methodology used in research. Used in this study were 20 Swiss mice, male, aged 30 to 45 days divided into two groups, 10 animals treated with saline and 10 animals treated with poison. Outcome measures were taken tumor growth, the production of nitric oxide NO, and spreading the influx of macrophages. It was found that treatment with the yellow scorpion venom reduced tumor growth did not influence the production of nitric oxide. The venom of *T. serrulatus* showed significant chemotactic effect for macrophages, however, was not able to induce an increase in the rate of spreading them. Based on these results, we stress that treatment with venom has significant effect in controlling tumor growth in Ehrlich ascites and further studies are needed to clarify the mechanisms involved in this event.

Keywords: Poison. Scorpion (*Tityus serrulatus*). Neoplasia. In Ehrlich ascites tumor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Camundongos da linhagem Swiss.....	16
Figura 2- Teste de viabilidade celular.....	17
Figura 3- Contenção do animal.....	18
Figura 4- Pinçamento da cauda do animal.....	18
Figura 5- Coleta do veneno.....	18
Figura 6- Escorpião amarelo – <i>T. serrulatus</i>	18
Figura 7 - Efeito do tratamento com o veneno do <i>T. serrulatus</i> sobre o número de células tumorais.....	22
Figura 8 - Efeito do tratamento com o veneno do <i>T. serrulatus</i> sobre óxido nítrico.....	23
Figura 9 - Efeito do tratamento com o veneno do <i>T. serrulatus</i> sobre macrófago.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do tratamento com veneno do escorpião amarelo – <i>Tityus serrulatus</i> sobre o número de células tumorais presentes no lavado peritoneal.....	21
Tabela 2 - Efeito do tratamento com veneno do escorpião amarelo – <i>Tityus serrulatus</i> sobre a produção de óxido nítrico (NO).....	22
Tabela 3 - Efeito do tratamento com veneno do escorpião amarelo – <i>Tityus serrulatus</i> sobre o espriamento de macrófagos.....	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	12
2. OBJETIVOS	16
2.1 GERAIS.....	16
2.2 ESPECÍFICOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS.....	17
3.2 ANIMAIS	17
3.3 NEOPLASIA	18
3.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	18
3.5 OBTENÇÃO DO VENENO DO <i>T. serrulatus</i>	19
3.6 IMPLANTE TUMORAL	20
3.7 TRATAMENTO	20
3.8 EUTANÁSIA.....	20
3.9 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL	20
3.10 CONTAGEM DE CÉLULAS PRESENTES NO LAVADO PERITONEAL	21
3.11 CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES E TUMORAIS.....	21
3.12 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	21
3.13 ESPRAIAMENTO DE MACRÓFAGOS	22
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA:.....	22
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Segundo Saltsma, (2009) o corpo humano é formado por milhões de células, que se renovam constantemente através de mitoses sucessivas para substituir as células que foram danificadas. Em condições normais esse processo é responsável pela regeneração dos tecidos saudáveis do corpo.

Crescimento e diferenciação celulares são processos essenciais para seres vivos. O crescimento celular, aqui entendido como multiplicação celular, é responsável pela formação do conjunto de células que compõem os indivíduos. Ele é indispensável durante o desenvolvimento normal dos organismos e necessário para repor as células que morrem após seu período de vida ou por processos patológicos. A diferenciação refere-se à especialização morfológica e funcional das células que permitem o desenvolvimento do organismo como um todo integrado. Em algumas situações nas quais estas células por razões variadas sofrem mutações e passam a proliferar rapidamente e sem controle. Perde a capacidade de se diferenciar, estas alterações são relacionadas à expressão de genes que regulam o crescimento e a diferenciação celular dando origem às neoplasias (BRASILEIRO FILHO, 2009).

As neoplasias são classificadas de acordo com o comportamento biológico do tumor, são classificadas em benignas ou malignas, ou de acordo com a célula local (LAWALL, 2009).

As neoplasias malignas oferecem maior risco, pois, invadem os tecidos a sua volta e se disseminam para outros órgãos e tecidos. Estas oferecem maior risco e potencialmente fatal, pode levar o portador à morte pela invasão progressiva e destrutiva de órgãos normais disseminando-se por metástases hematogênicas ou linfáticas (MILIOLI, 2008).

A morte celular em tecidos normais como uma forma de regulação da população celular é fenômeno biológico conhecido. Esta alta destruição ativa de células ou grupos de células é uma forma de morte denominada apoptose. A morte celular presente na renovação dos tecidos, na atrofia dos órgãos hormônio dependentes, na necrose de muitas neoplasias, nas necroses secundárias a vírus e nas mediadas por imunidade celular, constitui forma de apoptose. A apoptose começa com a condensação do núcleo e do citoplasma, diminuindo o volume celular. Há em seguida fragmentação do núcleo e da célula (corpos apoptóticos), com fagocitose total ou parcial da célula apoptótica por uma célula adjacente ou por um macrófago. Os genes envolvidos na regulação da morte celular programada, a apoptose, também participam da oncogênese (RIEDER; et.al, 2001).

Por muitos anos, os oncogênes e os genes supressores de câncer ocuparam uma posição central na compreensão da base molecular da tumorigênese. Embora atuem bem diferentemente os genes que pertencem as ambas as classes regulam a proliferação celular. Apenas recentemente tornou-se aparente que os genes impedem ou induzem a morte celular programada também são importantes variáveis na equação do câncer (COTRAN; ROBBINS, 2010).

A resposta de defesa antitumoral envolve a ativação da resposta imune celular, onde os macrófagos que são células com alto poder fagocitário, quando ativadas exibem uma citotoxicidade seletiva contra células tumorais. Os linfócitos T e os macrófagos podem colaborar na reatividade antitumoral porque o interferon gama (IFN- γ) uma citocina derivada de linfócitos T, é um potente ativador dos macrófagos. Estas células podem destruir tumores por mecanismos similares aos usados contra microrganismos ou pela secreção de fator alfa de necrose tumoral (TNF- α). Em adição os seus muitos outros efeitos, esta citocina é lítica para várias células tumorais (ALMEIDA-OLIVEIRA; DIAMONDE, 2008)

O principal objetivo no tratamento da neoplasia é obter completa erradicação das células tumorais, na busca de agentes eficientes com ação farmacológica com diferentes objetivos como eliminar das células tumorais, estimular a resposta de defesa anti-tumor ou evitar a progressão tumoral por metástases (RUBIN; FARBER, 2002).

Em função das dificuldades encontradas para impedir a progressão neoplásica e para propor novos tratamentos mais eficazes e com menor potencial lesivo, muitos estudos vêm sendo realizados, especialmente aqueles envolvendo neoplasias experimentais como o tumor ascítico de Ehrlich (SAAD-HOSSNE; SAAD-HOSSNE; PRADO; GAMBERINI, 2004).

O tumor de Ehrlich foi descrito em 1906 como um carcinoma mamário de camundongos fêmea. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, com Loewenthal e Jahn, é que surgiu a forma ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais (SILVA; SANTOS; CASSALI, 2006). Tem sido muito utilizado em pesquisas de ação de componentes químicos, físicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, imunológica e terapêutica de células tumorais (PINTO; 2009).

A vantagem da utilização de neoplasias transplantáveis, em comparação às demais, possibilita o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células

tumorais a serem inoculadas e sobre o desenvolvimento rápido da neoplasia, que restringe o tempo de estudo (SILVA; SANTOS; CASSALI, 2006).

Na biologia tumoral, os efeitos do óxido nítrico (NO) são complexos e dualísticos, ora favorecendo a gênese, o crescimento, a angiogênese e a invasão tumoral, ora com ações antitumorais, pela citotoxicidade e pela indução da apoptose. O determinante para produção de maiores ou menores quantidades de NO depende da duração da atividade nas células normais do hospedeiro, em condições fisiológicas (BEGNAMI, 2004).

A indução da síntese de NO está no contexto das defesas do organismo contra infecções, inflamações e muitas neoplasias, contudo, dependendo das quantidades geradas, pode levar à morte celular e danos teciduais. O NO é uma molécula importante como sinalizadora de diversas funções tais como vasodilatação, neurotransmissão, regulação da apoptose, carcinogêneses e metabolismo do ferro. O NO é gerado por uma família de isoenzimas expressas em uma grande variedade de células de mamíferos, através da catálise enzimática do aminoácido essencial L-arginina (FLORA FILHO, R; ZILBERSTEIN, 2000).

A catálise enzimática da reação do aminoácido L-arginina e oxigênio, que resulta na formação de L-citrulina e Óxido Nítrico, é feita por enzimas que são constitutivas (cONS) ou induzidas (iONS). As cONS são enzimas que estão presentes em muitas células; sua liberação depende da concentração intracelular de cálcio/calmodulina e, uma vez liberadas, sintetizam NO por curtos períodos. O NO formado por esta via participa de muitos processos homeostáticos. Por outro lado, as iONS independem da concentração intracelular de cálcio, e são liberadas por macrófagos poucas horas após sua ativação e também por outras células sob ação de citocinas. As iONS sintetizam NO por longos períodos (WIESINGER, 2001).

O NO também foi incriminado como agente de iniciação da carcinogênese em células com inabilidade de gerar NO. Esta inabilidade, associada a outros fatores, poderia levar ao descontrole da citoestase e da diferenciação celular, favorecendo a propagação de um clone maligno e culminar com o surgimento de tumor (FLORA FILHO, R; ZILBERSTEIN, 2000).

Uma das oportunidades terapêuticas para neoplasias, que se investiga na atualidade são os constituintes da peçonha de certos animais como serpentes e escorpiões. Estudos avaliando a constituição do veneno de escorpionídeos aumentou o interesse dos cientistas, levando bioquímicos, imunologistas, farmacologistas e fisiologistas ao conhecimento em nível molecular, incluindo seu mecanismo de ação (PERES, 2006).

O veneno da espécie *Tityus serrulatus*, que parece ser o mais tóxico de todos os escorpiões, é uma mistura de peptídeos tóxicos e não tóxicos de serotonina, nucleotídeos aminoácidos, enzimas (hialuronidase) e lípidos produzido pelas glândulas localizadas no telson, tem ação neurotóxica, afetando as transmissões nervosas e causando paralisias. O principal sintoma após uma picada é dor intensa e imediata no local, podendo ocorrer, em casos mais graves, arritmia cardíaca edema agudo de pulmão e diminuição da temperatura corporal (Possani et al, 1977). A toxina escorpiônica é uma mistura complexa de proteínas de baixo peso molecular associada a pequenas quantidades de aminoácidos e sais, sem atividade hemolítica proteolítica e fosfolipásica e não consome fibrinogênio (HERING, S.E. et al. 1993).

As neoplasias são doenças que representam um grave problema de saúde pública. Há alta incidência das mesmas e se observa um crescente aumento no número de casos. Por outro lado, os serviços de saúde conseguem diagnosticar de maneira mais eficaz e precoce, o que favorece uma boa resposta ao tratamento (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005).

Embora tenha ocorrido uma grande melhora com relação ao diagnóstico, os tratamentos atuais continuam não sendo eficazes para todos os tipos de neoplasias e apresentam uma série de efeitos indesejados. Muitos estudos se voltam para métodos terapêuticos mais eficazes e uso de peçonha de certos animais vêm apresentado resultados promissores (MENDES, 2007).

Em virtude dos fatos anteriores, buscamos com este trabalho realizar uma avaliação do tratamento com a peçonha do escorpião *T. serrulatus* no desenvolvimento do tumor de Ehrlich. (ALVIM; KWASNIEWSK, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Avaliar o efeito do veneno bruto extraído do escorpião *Tityus serrulatus* sobre o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar crescimento tumoral;
- Quantificar as células mononucleares presentes no lavado peritoneal e espraçamento de avaliar macrófagos e o efeito do veneno sobre a resposta inflamatória;
- Quantificar da produção de óxido nítrico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram constituídos dois grupos de 20 animais experimentais divididos em 2 grupos, I (controle) e II (tratado). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno e receberam ração comercial para camundongos e água “*ad libitum*”. Todos os animais foram inoculados, por via intraperitoneal (ip) com 10^3 células tumorais. Após 48h do implante tumoral foram iniciados os tratamentos. O grupo I foi tratado por quinze dias com solução fisiológica, na dose de 0,2 mL, por animal uma vez ao dia, por via intraperitoneal e o grupo II foi tratado com veneno extraído do *T. serrulatus* na diluição de 1:100 em solução fisiológica estéril, no volume de 0,2 mL por animal, uma vez ao dia por via intraperitoneal. Decorridos quinze dias os animais foram eutanasiados com dose letal de ketamina associada à xylasina (0,2mL de cada) e então recolhido o lavado peritoneal para subsequente avaliação: a) da produção de NO; b) da quantificação de células tumorais; c) da quantificação de células mononucleares; d) do espriamento de macrófagos.

Este protocolo foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade do Sagrado Coração (nº protocolo 178/11).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss*, machos, com idade entre 30 e 45 dias e procedentes do Biotério da Universidade do Sagrado Coração – USC (Figura 1). Durante os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (10 animais por caixa), com ingestão de água “*ad libitum*” e ração comercial específica para camundongos.



Figura 1- Camundongos da linhagem Swiss.

3.3 NEOPLASIA

Neste estudo foi empregado o tumor de Ehrlich, mantido no Biotério da Universidade do Sagrado Coração - USC. As células neoplásicas foram mantidas “*in vivo*” por repiques semanais em camundongos suíços, através do implante de 10^7 células tumorais por via intraperitoneal. Na obtenção de inóculos para implante do tumor, o fluido ascítico foi retirado, por punção da cavidade peritoneal, e a suspensão foi lavada por duas vezes em solução fisiológica a 1500 rpm, por 10 minutos. A determinação do número total de células neoplásicas foi realizada através da contagem em câmara de Neubauer, e a concentração desejada foi obtida mediante diluição em PBS estéril.

3.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

Com o objetivo de se determinar a viabilidade celular a um volume de suspensão de células, foi acrescido um volume de Azul de Trypan na concentração de 0,2%. A seguir, uma gota da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula, e procedida à contagem percentual, considerando-se vivas as células que excluam o corante e mortas as que incorporarem o Azul de Trypan (Figura 2). O percentual de células vivas foi determinado através de contagem de 200 células. Em todos os protocolos foram empregadas somente as suspensões que apresentarem viabilidade superior a 95%.

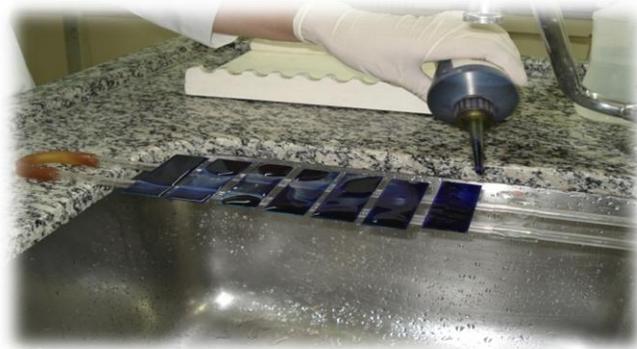


Figura-2 Teste de viabilidade celular

3.5 OBTENÇÃO DO VENENO DO *T. serrulatus*

O animal foi posicionado sobre uma superfície de uma placa de vidro, onde o mesmo foi preso por fita adesiva. Mantendo o corpo sem movimento, deixando apenas a cauda do animal livre. Com auxílio de uma pinça retirou-se o telson e foi coletada a gota de veneno da extremidade da cauda em tubo Ependorff. O método experimental descrito empregado não oferece riscos ao pesquisador ou sofrimento desnecessário ao animal (Figuras 3, 4, 5 e 6).



Figura 3- Contenção do animal

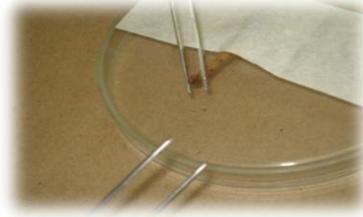


Figura 4 - Pinçamento da cauda do animal



Figura 5 - Coleta do veneno



Figura 6- Escorpião amarelo- *T.serrulatus*

3.6 IMPLANTE TUMORAL

Após a obtenção das células tumorais, foi estabelecida a concentração de 10^4 células /mL e cada animal foi inoculado por via intraperitoneal com volume de 0,1mL da suspensão.

3.7 TRATAMENTO

Após 48h do implante tumoral foram iniciados os tratamentos. Um grupo foi tratado por dez dias com solução fisiológica, na dose de 0,2 mL, uma vez ao dia, por via intraperitoneal e outro grupo foi tratado com veneno extraído do *T. serrulatus* na diluição de 1:100 em solução fisiológica estéril, no volume de 0,2mL por animal, uma vez ao dia por via intraperitoneal.

3.8 EUTANÁSIA

Os animais foram eutanasiados com dose letal de ketamina (0,2 mL) e xylasina (0,2 mL), administrada por via intraperitoneal com auxílio de seringa hipodérmica. Durante Este procedimento todo o cuidado foi observado para restringir ao mínimo o sofrimento do animal.

3.9 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL

Com auxílio de seringa descartável foram inoculados 3mL de solução fisiológica na cavidade peritoneal. O abdome do animal foi massageado e posteriormente foi realizada uma incisão na mesma região com o objetivo de se introduzir uma pipeta Pasteur e recolher o lavado peritoneal. Todo este procedimento foi realizado após o sacrifício do animal.

3.10 CONTAGEM DE CÉLULAS PRESENTES NO LAVADO PERITONEAL

Após a remoção do lavado peritoneal, a suspensão de células foi diluída na proporção de 1:100, uma alíquota de 0,5mL foi separada. A esta alíquota foi adicionado um volume de 0,05mL do corante Cristal Violeta. Posteriormente as células tumorais e mononucleares foram contadas em câmara de Neubauer.

3.11 CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES E TUMORAIS

Foram realizadas distensões da suspensão obtida do lavado peritoneal e coradas pelo método da hematoxilina-eosina (HE). Posteriormente, através de microscopia, foram avaliados cinco campos microscópios aleatórios e não coincidentes.

3.12 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A determinação da concentração de nitrito é uma forma indireta de se determinar a concentração de óxido nítrico (NO). Este procedimento foi feito utilizando-se o método de Griess, este método quantifica indiretamente a produção de NO pela determinação de nitritos e nitratos acumulados no sobrenadante das células, após o tratamento (Moshage, 1995). Para tanto a cada 0,2mL de lavado peritoneal foi acrescido de 1,8mL do reativo de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e Naphtylenediamina a 0,1% em água destilada). Como branco do teste empregamos 1,8mL de solução fisiológica acrescido de 0,2mL do lavado peritoneal. A reação ocorreu num período de 20min, após o qual foi realizada a leitura em espectrofotômetro (CELM) em comprimento de onda 540nm. O cálculo dos resultados foi realizado através da comparação do comprimento de onda dos testes com o comprimento de onda de um padrão com 100ug de nitrito/mL.

3.13 ESPRAIAMENTO DE MACRÓFAGOS

Foi removida uma alíquota de 200uL do lavado peritoneal. A esta alíquota foram acrescidos 200uL de meio RPMI 1640. O material foi depositado em lâmina de microscopia e incubado a 37°C por 1h. Decorrido este período as lâminas foram lavadas vigorosamente com auxílio de pipeta automática para remoção das células não aderentes. As lâminas foram então coradas pela HE e posteriormente realizada a contagem, em microscópio óptico, da proporção de macrófagos espreiados e não espreiados.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o objetivo de analisar comparativamente o número de células tumorais, células mononucleares, macrófagos espreiados e da produção de óxido nítrico. No estudo estatístico foi observado um nível de significância $p < 0,05$. Os dados obtidos foram avaliados com auxílio do software Sigma Stat versão 3.1 (Jandel Scientific).

4 RESULTADOS

Este estudo teve como principal alvo investigar se o tratamento com veneno do escorpião amarelo teria alguma influência sobre o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Para tanto avaliamos inicialmente o número de células tumorais presentes na cavidade peritoneal de camundongos portadores do TAE tratados com o veneno ou com solução fisiológica. Constatamos que o tratamento com o veneno reduziu significativamente o número de células tumorais. Estes resultados estão demonstrados na tabela 1 e figura 7.

Tabela 1 - Efeito do tratamento com veneno do escorpião amarelo – *Tityus serrulatus* sobre o número de células tumorais presentes no lavado peritoneal.

Tratamento ^a	Células tumorais ($\times 10^6/\text{mL}$)
Fisiológica	56,12 \pm 31,10 ^{b,c}
Veneno	4,12 \pm 2,15 [#]

Fonte: Elaborado pelos autores.

a – os animais foram tratados com solução fisiológica, 1x/dia, 0,2mL, ip ou com veneno do escorpião amarelo na diluição 1:100, 1x/dia, 0,2mL, ip.

b- resultados expressos em média \pm desvio padrão

c- n de 10 animais por grupo

#- $P < 0,05$ na comparação com o grupo tratado com solução fisiológica.

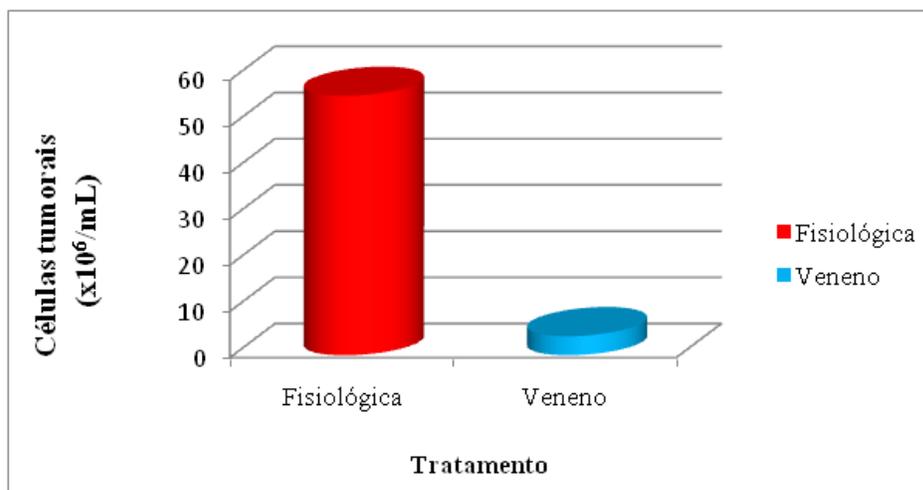


Figura 7 - Efeito do tratamento com o veneno do *T. serrulatus* sobre o número de células tumorais.

Outro parâmetro investigado, no sentido de esclarecer a resposta de defesa ao TAE frente ao tratamento com o veneno do escorpião amarelo, foi à produção de óxido nítrico. No modelo experimental estudado não foi constatado qualquer efeito do tratamento com o veneno sobre a produção deste mediador químico inflamatório. Estes resultados podem ser averiguados na tabela 2 e figura 8.

Tabela 2. Efeito do tratamento com veneno do escorpião amarelo – *Tityus serrulatus* sobre a produção de óxido nítrico (NO).

Tratamento ^a	NO (ug/mL)
Fisiológica	2,32±1,22 ^{b,c}
Veneno	2,97±1,61

a – os animais foram tratados com solução fisiológica, 1x/dia, 0,2mL, ip ou com veneno do escorpião amarelo na dose de 1:100 1x/dia, 0,2mL, ip.

b- resultados expressos em média ± desvio padrão.

c- n de 10 animais por grupo

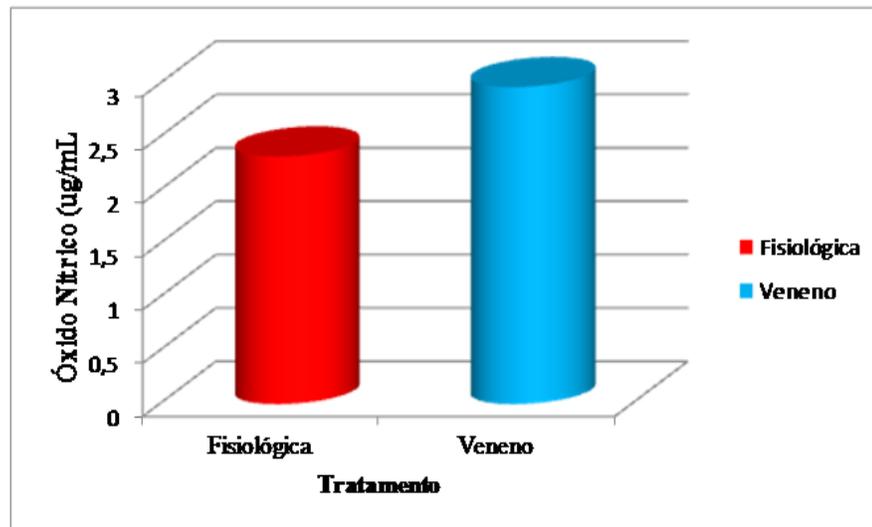


Figura 8. Efeito do tratamento com o veneno do *T. serrulatus* sobre óxido nítrico.

Com o objetivo de investigar o envolvimento de células mononucleares assim como o seu estado de ativação, realizamos a análise quantitativa de macrófagos não espreiados e macrófagos espreiados frente ao tratamento com veneno do escorpião amarelo. Observamos que o tratamento aumentou significativamente o influxo de macrófagos, porém com relação ao espreiamento constatamos que o tratamento com o veneno produziu um efeito inverso, reduzindo consideravelmente este parâmetro. Estes resultados estão demonstrados na tabela 3 e figura 9.

Tabela 3. Efeito do tratamento com veneno do escorpião amarelo – *Tityus serrulatus* sobre o espreiamento de macrófagos.

Tratamento ^a	Macrófagos não espreiados	Macrófagos espreiados
Fisiológica	33,9±39,91 ^{b,c}	25,70±16,45
Veneno	171,43±126,68#	2,14±2,19#

a – os animais foram tratados com solução fisiológica, 1x/dia, 0,2mL, ip ou com veneno do escorpião amarelo na dose de 1:100 1x/dia, 0,2mL, ip.

b- resultados expressos em média±desvio padrão, média de 5 campos microscópicos na objetiva de 40x

c- n de 8 a 10 animais por grupo

#- P<0,05 na comparação do número de macrófagos espreiados com o número de macrófagos não espreiados, em função do mesmo tratamento.

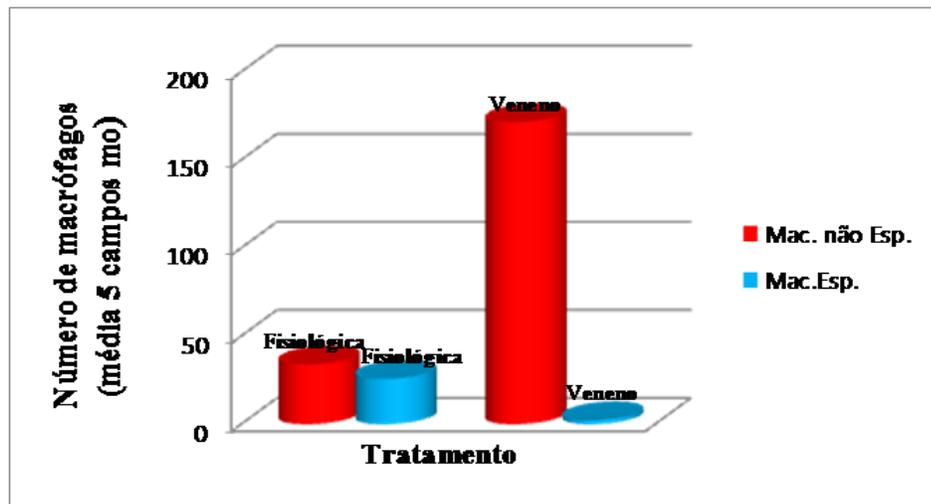


Figura 9. Efeito do tratamento com o veneno do *T. serrulatus* sobre macrófago.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo visou investigar o efeito do veneno do escorpião amarelo sobre o desenvolvimento tumoral. Na atualidade há uma tendência no meio científico em avaliar a ação de bioprodutos com possibilidade de emprego na terapia de doenças crônicas como o câncer. Com o tratamento de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, constatamos que o veneno de escorpião reduziu significativamente o número de células tumorais. Na literatura recente há relatos de componentes do veneno podem ser associados a este efeito.

A possível causa deste número reduzido de células tumorais no grupo teste se relaciona à grande toxicidade que há no veneno bruto do escorpião amarelo, agindo diretamente nas células tumorais e também células saudáveis.

Este fato pode ser resultado de componentes do veneno. Há relato de duas toxinas denominadas toxinas α (TsTx) e β (Ts Tx-I) (MENDES, 2007). Estas toxinas também são responsáveis por rápida ativação da resposta imunológica e, como são proteínas de baixo peso molecular, se difundem com facilidade através da circulação sanguínea. Porém, na constituição deste veneno também é encontrada uma proteína de alto peso molecular com atividade diferenciada: a hialuronidase. Esta proteína contribui para toxicidade do veneno, facilitando a distribuição das toxinas nos tecidos (DINIZ; GONÇALVES, 1960).

Com o intuito de esclarecer o papel do mediador químico óxido nítrico no modelo de estudo empregado, o mesmo foi quantificado no sobrenadante obtido do lavado peritoneal. Porém, não foi constatada estatisticamente há diferença entre os grupos tratados com solução fisiológica ou com o veneno de escorpião. Além disso, o NO é um mediador envolvido na resposta de defesa e que apresenta efeito dúbio. Seus efeitos podem ser pró ou antitumoral dependendo do tumor em questão e também da fase de desenvolvimento tumoral. O NO pode apresentar efeito tóxico às células tumorais ou inibitórias da resposta imunitária antitumoral.

Com base em nossos resultados pode-se sugerir que, neste modelo experimental, o NO não apresentou qualquer tipo de participação relacionada ao controle do crescimento tumoral, portanto há necessidade de maior investigação de outros mecanismos nesse evento.

A resposta imunológica contra o desenvolvimento neoplásico é baseada principalmente na ação de macrófagos e linfócitos natural killer (NK). Outro parâmetro investigado neste trabalho foi a avaliação do influxo de macrófagos e também a investigação da taxa de espraiamento dos mesmos, uma forma de associar estas células com seu estado de ativação. Constatou-se que o

veneno de escorpião é um potente agente quimiotático para os macrófagos, porém produziu significativa redução na taxa de espraiamento.

Macrófagos são células de altíssimo poder fagocitário, importantes na defesa contra tumores, porém embora não tenhamos constatado aumento na taxa de espraiamento paralelo à contenção do crescimento tumoral, pode-se sugerir que estes macrófagos possam estar liberando mediadores químicos como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) uma citocina potente na ativação de linfócitos NK e T citotóxicos (LISBÔA, 2008).

6 CONCLUSÃO

Constatou-se, através das análises realizadas, que:

- O veneno bruto do escorpião amarelo reduziu significativamente o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich;
- O efeito do veneno, neste modelo, não foi associado à alterações a produção do NO;
- O veneno do *T. serrulatus* é um potente quimiotático para macrófagos, porém não oi capaz de influenciar a taxa de espraiamento;
- Estudos futuros são necessários para esclarecer a contenção do crescimento tumoral resultante do tratamento com o veneno.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA – OLIVEIRA, Aline; DIAMOND, Hilda Rachel. Atividade antileucêmica das células natural killer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 54, n. 3, p.297-305, 2008. Disponível:< http://www.inca.gov.br/rbc/n_54/v03/pdf/revisao_4_pag_297a305.pdf>. Acesso em 11out.2011.

ALVIM, Jenifer do Espírito Santo; KWASNIEWSKI, Fábio Henrique Avaliação Do Efeito Do Veneno De Escorpiões Da Família Buthidae Sobre O Tumor Ascítico De Ehrlich In Vivo. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11, 2008, Mogi das Cruzes. **Anais...** Mogi das Cruzes: UMC, 2008. Disponível em <http://www.umc.br/XI_congresso/projetos/avaliacao_efeito_veneno.pdf> Acesso em: 11 nov.2011.

BEGNAMI, Maria Dirlei F. S. et al. Análise imuno-histoquímica das sintases do óxido nítrico em adenocarcinomas gástricos. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 5, p. 351-357, out. 2004. Disponível em :< <http://www.scielo.br/pdf/jbpmL/v40n5/a11v40n5.pdf>> Acesso em : 04 out. 2011.

BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Boglio Patologia Geral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.226; 239.

COTRAN, ROBBINS. **Patologia estrutural e funcional**. 5.ed Rio Janeiro Guanabara koogan, p. 240, 259; 2010.

DINIZ, C. R; GONCALVES, J. M. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.41, n. 15, p.470-477, jul. 1960.

FLORA FILHO, R; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 265-71, 2000. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/ramb/v46n3/3086.pdf>> .Acesso em: 03 nov.2011.

GUERRA, GALO e MENDONÇA. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005. Disponível em: < http://www.eteavare.com.br/arquivos/81_392.pdf>.2005. Acesso em: 27set .2011.

HERING, S.E. et al. Reversible cardiomyopathy in patients with severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*: evolution of enzymatic, electrocardiographic and echocardiographic alterations. **Annals of tropical paediatrics**, London ; New York, v.13, n. 2, p. 173-182, 1993.

LAWAL, Malaine de Almeida. **Estudos retrospectivo de tumores odontogênicos em dois centros de estudos no Brasil e três no México**. 2009. 161 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade de São Paulo, Bauru, 2009. Disponível em <<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?metodo=apresentar&id=K4792860E0&tipo=completo&idiomaExibicao=1>>. Acesso em 08 nov. 2011.

LISBÔA, Ana Carolina Campos Vale. **Ilhotas pancreáticas para o transplante através do aumento da massa de células e imunisolamento com microcapsulas biocompatíveis**. 2008. 121 f. Tese (Mestrado em ciências biológicas bioquímica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.teses.usp.br%2Fteses%2Fdisponiveis%2F46%2F46131%2Ftde-17062009-110527%2F>. Acesso em: 18 nov.2011.

MENDES, Thais Melo. **Antígenos para produção de soro contra o veneno do escorpião *tityus serrulatus***. 2007. 242 f. Tese (Doutorado em ciências biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/MCSC-78VQVJ/1/thais_final_6.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2011.

MILIOLI, Heloisa Helena Zaccaron. **Avaliação citogenética de tumores mamários**. 2008. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008. Disponível em: <<http://www.ccb.ufsc.br/biologia/TCC-BIOLOGIA-UFSC/TCCHeloisahzMilioliBioUFSC-08-1.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2011.

PERES, Ana Claudia Paneque. **Análise das propriedades mecânicas e migração celular em modelo experimental de injúria pulmonar aguda induzida pelo veneno de escorpião *Tityus serrulatus***. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomedica) – Universidade do Vale do Paraíba, São Jose dos Campos, 2006. Disponível em : <<http://biblioteca.univap.br/dados/000001/000001EC.pdf>>. Acesso em : 11 nov. 2011.

PINTO, Longuinhos Mariana C. ***Tityus fasciolatus* e *Tityus serrulatus*: Caracterização eletrocardiográfica e laboratorial do envenenamento em ratos**. 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpmL/v40n5/a11v40n5.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2011.

POSSANI, et.al. Purification and properties of mammalian toxins from the Brazilian scorpion *tityus serrulatus* lutz and Mello. **Arch. Biochem. Biophys**, New York, v.180, p. 394-403, 1977.

RIEDER et.al. Nitric oxide-dependent apoptosis in ovarian carcinoma cell lines. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 82, n. 1, p. 172-6, July 2001.

RUBIN, FARBER, John. **Patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.153,209.

SAAD-HOSSNE, Rogério; SAAD-HOSSNE, Willian; PRADO, Renê Gamberini. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. Estudo experimental in vitro. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n.1, p. 54-58, jan.-fev. 2004. Disponível:< http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502004000100009&script=sci_arttext> Acesso em: 18 nov. 2011.

S A L T S M A;k i r s t i e. **Dentro da Célula** , livro on line; pag 46 - 50 , 2009. Disponível: <http://bg10esc.files.wordpress.com/2010/08/dentro_da_celula.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2011

SILVA, A.E. ; SANTOS, F.G.A. ; CASSALI, G.D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 658-661, 2006 . Disponível: <www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352006000400030>. Acesso em :18 nov.2011

WIESINGER, H. Arginin metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system.**Progress in Neurobiology**, New York, v.64, n. 4, p.365-391, 2001. Disponível em :<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11275358>>. Acesso em : 18 nov. 2011.