DIEGO DE CARVALHO

Peçonha da cascavel *Crotalus durissus terrificus* prejudica a memória espacial e induz a morte neuronal no hipocampo, em ratos: estudos “*in vivo*” e “*in vitro*”

Crotalus durissus terrificus venom impairs spatial memory and induces neuronal death in rat hippocampus: “*in vivo*” and “*in vitro*” studies

São Paulo

2015

DIEGO DE CARVALHO

Peçonha da cascavel *Crotalus durissus terrificus* prejudica a memória espacial e induz a morte neuronal no hipocampo, em ratos: estudos “*in vivo*” e “*in vitro*”

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências na Área de Fisiologia Geral.

Orientador(a): Gilberto Fernando Xavier

Co-Orientadora: Prof. Dra. Ida Siqueiro Sano-Martins

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

De Carvalho, Diego

Peçonha da cascavel *Crotalus durissus terrificus* prejudica a memória espacial e induz a morte neuronal no hipocampo, em ratos: estudos “*in vivo*” e “*in vitro*”.

138p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Peçonha 2. *Crotalus durissus terrificus* 3. Hipocampo. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora

Prof. Dr(a).

Prof. Dr(a).

Prof. Dr(a).

Prof. Dr(a).

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Prof. Gilberto Fernando Xavier, pelas precisas análises, discussões e sugestões que enriqueceram não somente este trabalho, mas também me ajudaram a crescer do ponto de vista científico/acadêmico.

Agradeço a minha co-orientadora, Prof^a. Ida Sigueko Sano-Martins, que sempre esteve presente e à disposição quando precisei. Seja conseguindo os venenos e as toxinas para os experimentos, seja para um agradável bate-papo. Certamente sua forma de orientação e, por que não dizer, de vida é um grande exemplo.

Agradeço também ao terceiro orientador com quem tive oportunidade de trabalhar durante o doutorado, meu supervisor de doutorado-sanduíche, *Professore* Domenico Pellegrini-Giampietro. Sou grato não apenas por ter me aceitado prontamente em seu laboratório e executado parte importante deste trabalho, mas também, pela amizade e por ter, indiretamente, permitido que eu tivesse uma experiência extremamente enriquecedora morando na belíssima cidade de Florença.

Agradeço aos amigos de departamento e de laboratório angariados ao longo dessa jornada: Marcão, Marceles, Toninho, Popetar, Aline, Kadu, Elisa, Bárbara, Pavão, Renata Brandt e Plim, Ananda, Físico e outros que certamente esqueci de citar aqui pelas risadas, churrascos, cervejadas e filosofias de bandeirão.

Agradeço aos grandes amigos italianos, Elisabetta e Francesco, que tive o prazer de conhecer e que além de me ensinarem as técnicas e me ajudarem com os experimentos, me trataram como membro da *Famiglia*.

Agradeço aos amigos-irmãos que eu tive a honra de compartilhar as alegrias e os sofrimentos da pós-graduação:

- Brunão, que apesar de agora distante, está sempre disponível pra uma conversinha online. As clássicas e profundas conversas no “goleta” a caminho do depto geraram bons frutos e boas risadas!

- Poldera, meu amigo, sócio e parceiro nas idéias mirabolantes que saem das nossas desvairadas cabeças. Companheiro pra qualquer hora! Sempre disposto a trocar uma idéia e tecer um jocoso comentário, nem que seja um simples, porém funcional “pode crê”.

- Cyrão, amigo, sócio de experimento e de intermináveis risadas; sujeito de coração bom que está sempre disposto a ajudar. Companheiro de conversas sobre a vida, o universo e tudo mais além de intermináveis *Hadoukens*, *Senkugoshohas*.

Agradeço aos grandes amigos Edson e Claudia, pessoas sempre solícitas com quem se pode tranquilamente conversar e desabafar sobre tudo. Além de terem sido os grandes responsáveis pelo início de toda essa história.

Agradeço a minha família que me deu apoio, suporte e estabilidade durante todo o período da pós-graduação e com quem eu sempre posso contar.

Agradeço em especial a Marina, que aguentou firme e sempre me deu apoio, até mesmo quando nem eu aguentava o meu estresse. Também aproveito pra agradecer à sua família pelas inúmeras hospedagens, ajudas e idas e vindas.

Agradeço ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro ao projeto.

Índice

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução Geral.....	3
Cascavéis brasileiras.....	5
Alguns aspectos clínicos do envenenamento crotálico.....	6
Componentes da peçonhas de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	7
Aspectos comportamentais do envenenamento crotálico.....	8
Uso de tências de cultura organotípica para avaliação neurotoxicológica.....	12
Neurobiologia da memória e navegação espaciais.....	16
Avaliação da memória espacial no labirinto aquático de Morris.....	19
A peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e memória espacial em ratos.....	21
Justificativa para a abordagem proposta.....	22
 Capítulo I.....	 25
Objetivos específicos do capítulo.....	27
Materiais e métodos.....	28
Resultados.....	35
Discussão.....	47
Conclusão.....	57
 Capítulo II.....	 58
O hipocampo.....	60
Soro antocrotálico.....	63
Materiais e Métodos.....	65
Resultados.....	72
Discussão.....	84

Conclusão.....	90
Capítulo III.....	92
Receptores AMPA, NBQX e hipocampo.....	93
Justificativa.....	94
Materiais e Métodos.....	96
Resultados.....	98
Discussão.....	101
Conclusão.....	105
 Discussão e conclusão geral.....	 106
Considerações finais.....	112
Referências.....	114
Apêndice I.....	126
Apêndice II.....	128

Resumo

A administração sistêmica da peçonha bruta da cascavel Sul-Americana (*Crotalus durissus terrificus*, Cdt) induz prejuízos de memória espacial em ratos, sugerindo a ocorrência de dano hipocampal. No presente estudo, foram utilizadas técnicas *In vivo* e *In vitro*, a fim de testar os potenciais efeitos centrais do veneno de Cdt e da crotoxina (CTX), principal neurotoxina componente da peçonha bruta da serpente. Foram investigados (1) efeitos comportamentais da administração sistêmica e intrahipocampal do veneno de Cdt e da CTX envolvendo diferentes versões do labirinto aquático de Morris; (2) a morte neuronal, o curso temporal e a ação protetora do soro anticrotálico à exposição de culturas organotípicas de hipocampo a doses crescentes (0,05-1 µg/mL) do veneno bruto de Cdt e de CTX, por meio da coloração fluorescente por Iodeto de propídeo (PI) (que reflete a morte neuronal); e (3) alguns dos possíveis mecanismos fisiopatológicos do envenenamento experimental em culturas de hipocampo utilizando o antagonista de receptores AMPA de glutamato, NBQX, à administração de 0,05 µg/mL do veneno bruto de Cdt, para avaliar a possível participação do glutamato e seus receptores na morte neuronal. A administração sistêmica e intrahipocampal do veneno bruto de cascavel em ratos promoveu marcados prejuízos de memória espacial de referência e operacional. Diferentemente, a CTX promoveu prejuízos comportamentais apenas quando a administração foi intrahipocampal. As culturas expostas ao veneno bruto apresentaram dano sobretudo nas células piramidais de CA1, enquanto as culturas incubadas com CTX não apresentaram danos. Essa seletividade em relação ao CA1 foi mais proeminente nas doses baixas. O soro anticrotálico preveniu a morte neuronal quando administrado até uma hora após a exposição do veneno. O NBQX preveniu parcialmente o dano em CA1 indicando a participação de receptores AMPA de glutamato na cascata de eventos que subjazem os danos a estas células causados pela peçonha bruta de Cdt. Estes achados podem contribuir para a tanto para elucidação dos mecanismos quanto para a conduta utilizada durante o envenenamento crotálico.

Abstract

Systemic administration of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, Cdt) venom in rats permanently disrupts performance in hippocampus-dependent spatial memory tasks, thus indicating the occurrence of damage to this brain area. *In vivo* and *In vitro* approaches were employed in the present study to investigate the effects of the venom and its main compound, crotoxin (CTX). We investigated (1) behavioral effects after both systemic and intrahippocampal administration of either venom or CTX in rats on performance in different versions of the Morris' water maze task; (2) neuronal death, evaluated by the intensity of propidium iodide (PI) fluorescence (neurotoxicity of the venom and of CTX, and the protection by the antivenom, on organotypic hippocampal slice cultures, were evaluated by comparing slices exposed to venom and (1) slices treated only with vehicle - negative control - and (2) slices incubated with 1 mM glutamate - positive control for maximal neuronal death), and the time course of neurotoxic effects of 0.05-1 µg/mL of crude Cdt venom and CTX, and the Brazilian anticrotalid serum on organotypic hippocampal slice cultures; and (3) provide an initial screening of the mechanisms underlying the venom action on cultured hippocampal slices, using the AMPA receptor antagonist NBQX and the crude venom at 0.5 µg/mL dose, to test whether the neuronal damage is mediated by glutamate following the experimental envenomation. Both systemic and intrahippocampal administration of Cdt venom induces permanent disruption of spatial reference memory and spatial working memory in rats. In contrast, CTX only promoted behavioral effects when administered intrahippocampally. Slices exposed to Cdt venom, but not to CTX, exhibited substantial neuronal damage. This effect was particularly prominent in the CA1 sub-field at lower concentrations of the venom. The antivenom prevented damage when applied until 1 hour after the exposure of the venom. The NBQX partially prevented damage to CA1, thus indicating that AMPA receptors play a role in the damage caused by the Cdt venom. These findings may be helpful in the elucidation and management of rattlesnake envenomation.

INTRODUÇÃO GERAL

Acidentes envolvendo animais peçonhentos e venenosos no Brasil constituem um problema de saúde pública. Essa modalidade de envenenamento é menor apenas em relação à intoxicação por fármacos. De todas as modalidades de intoxicação, os acidentes com animais peçonhentos representam 24,75% do total de casos (Sinitox, 2007). Ressalte-se ainda que muitos casos não são registrados, ou seja, embora tratados em centros de saúde, não são notificados ao ministério da saúde.

Dentre os envenenamentos por animais peçonhentos, os acidentes ofídicos, além dos envolvendo escorpiões e aranhas, se destacam. Em relação ao ofidismo, entre 2003 e 2013 foram registrados uma média anual de 27.564 acidentes envolvendo serpentes (Ministério da saúde, 2014). Esses dados são distribuídos pelas macro-regiões brasileiras segundo a Figura 1. Note que a maioria dos casos ocorre nas regiões norte, nordeste e sudeste. Isto deve-se em grande parte a ocorrência de serpentes peçonhentas no Brasil e a existência de atividades econômicas humanas que se sobrepõe ao habitat destas serpentes, por exemplo, plantações de cana, cacau e outras culturas.

Figura 1 – Número absoluto dos acidentes ofídicos entre 2000 e 2013 em cada macro-região brasileira. Os números abaixo na coluna cinza denotam o total de casos nos mesmos anos em todo o Brasil. Dados retirados do Ministério da Saúde do Brasil: Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/10/Tabela-06---CASOS---serpente---2000-a-2013---21-05-2014.pdf>.

A maioria destes acidentes é ocasionada por serpentes do gênero *Bothrops* (jararacas) e, em segundo lugar, por serpentes do gênero *Crotalus* (Cascavéis) (Ministério da Saúde do Brasil, 2014).

Os acidentes com cascavéis representam 9,2% do total de casos, com uma incidência de 1,4 casos para cada 100 mil habitantes. Apesar de não ser o

tipo de acidente ofídico com maior número de registros, é o que apresenta maior letalidade, i.e., 1,87% do total de casos, taxa cerca de seis vezes superior aos acidentes botrópicos que correspondem a 0,31% do total de casos (Ministério da Saúde, 2007). Esta última modalidade de acidente é mais conhecida por gerar sequelas severas, como lacerações e necroses, na região do corpo atingida. Entre 2004 a 2013, em todo o Brasil, foram registradas em média 112 mortes por ano decorrentes de complicações de acidentes ofídicos (Ministério da Saúde, 2014). A maior letalidade do acidente crotálico deve-se, sobretudo, às características da peçonha destes animais (ver adiante).

Cascavéis brasileiras

A quantidade de acidentes envolvendo cada espécie varia, obviamente, de acordo com seus hábitos e habitats. O gênero *Crotalus* inclui como representante as serpentes da espécie *Crotalus durissus* que habita os cerrados do Brasil central, as regiões áridas e semi-áridas do Nordeste, os campos e áreas abertas do sul, sudeste e norte.

Existem cinco subespécies reconhecidas que variam de acordo com a região que ocupam. A mais conhecida delas é a *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*), que habita quase todo o Brasil, ocupando o sul, sudeste, centro-oeste e algumas áreas abertas do norte. A cascavel que ocupa as caatingas do nordeste é denominada *Crotalus durissus cascavella*, sendo a maior das cascavéis, pois atinge até 1,6 metros. A *Crotalus durissus collineatus* habita a

região sudeste e centro-oeste. As outras duas sub-espécies habitam ambientes específicos, como os campos de Roraima, habitado pela peculiar *Crotalus durissus ruruima*, e a ilha de Marajó, habitada pela *Crotalus durissus marajoensis* (para revisão taxonômica do gênero *Crotalus* ver Vanzolini e Callefo, 2002).

Alguns aspectos clínicos do envenenamento crotálico

A fisiopatologia do envenenamento crotálico foi inicialmente descrita como sendo principalmente hemolítica e neurotóxica (Rosenfeld, 1971). Contudo, após diversos estudos, a característica hemolítica da peçonha foi descartada. Hoje se sabe que a ação do veneno crotálico é neurotóxica, miotóxica e coagulante (Azevedo-Marques *et al.*, 2009).

As primeiras manifestações sistêmicas do acidente por cascavéis são ataxia seguido de intensa depressão do sistema nervoso central, com sedação moderada, midríase, ptose palpebral, tremores, mialgia generalizada, paralisia facial flácida, boca aberta, sialorréia, dificuldade de deglutição, além de vômitos e alterações da pressão arterial, que são normalmente relacionadas ao estado emocional do paciente envenenado (Cupo *et al.*, 1997). Além disso, é efeito desta peçonha produzir atonia vesical com consequente retenção urinária e escurecimento da urina devido à mioglobínúria (Amaral *et al.*, 1991; Nogueira, 2001). Em animais frequentemente são observados convulsões, salivação, tremores e rotação do corpo no eixo longitudinal (Nogueira, 2001).

Os efeitos miotóxicos foram observados em biópsias de tecido muscular esquelético de humanos submetido à análise ultra-estrutural das fibras musculares, as quais demonstraram intensidade variável de lesão mesmo em locais distantes da picada (Rossi *et al.*, 1989).

Apesar da ação hemolítica ter sido descartada, a peçonha de *Crotalus* tem atividade que interfere nos processos hemostáticos (Santoro *et al.*, 1999). Cerca de 40% dos pacientes vitimados apresentam distúrbios de coagulação sanguínea. O veneno crotálico induz transformação de fibrinogênio em fibrina podendo gerar afibrinogenemia (Azevedo-Marques *et al.*, 2009, Sano-Martins *et al.*, 2001).

As manifestações clínicas decorrentes da ação neurotóxica do envenenamento crotálico surge em humanos nas primeiras 6 horas após o acidente. O efeito mais evidente é a “fácies miastênica”, ou seja, a flacidez facial por consequência da ação bloqueadora da neurotransmissão de acetilcolina na placa motora. Além disso, pode haver queixas de visão turva, diplopia e oftalmoplegia (Azevedo-Marques *et al.*, 2009).

A despeito destes efeitos, sabe-se hoje que uma das principais causas de morte de pacientes envolvidos nestes acidentes é a insuficiência renal aguda que acomete pacientes tratados tardiamente ou de forma inadequada (Amaral *et al.*, 1986).

Componentes da peçonha de Crotalus durissus

A composição do veneno crotálico inclui enzimas, toxinas e peptídios, sendo os componentes mais abundantes as fosfolipases, hialuronidases e as neurotoxinas (Nogueira e Sakate, 2004).

A ação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é neurotóxica, miotóxica e coagulante. As responsáveis por tais ações são os quatro diferentes grupos de toxinas que compõe o veneno. Entre elas, crotoxina, crotamina, giroxina e convulxina.

Crotoxina

A crotoxina é o componente em maior abundância do veneno de *Crotalus*. Trata-se de um composto neurotóxico, formado por duas subunidades, uma composta por fosfolipases A2 (PLA₂) denominada Crotoxina B, com ação pouco tóxica, e outra subunidade conhecida como Crotoxina A, formada por um complexo chamado crotapotina. A interação entre estas duas subunidades confere a alta toxicidade desta substância (Banher et al., 1973).

As PLA₂ são bem estudadas, pois são responsáveis pelas atividades miotóxica, citotóxica e neurotóxica. Elas são enzimas do tipo II que clivam os fosfolipídios da membrana na posição *sn*-2, liberando ácidos graxos livres, principalmente o ácido araquidônico, e lisofosfolipídios. O ácido araquidônico livre e as prostaglandinas são importantes mediadores na transmissão e no processamento de sinais neuronais (Bennett *et al.*, 1994; Schaeffer e Gattaz, 2005).

A PLA₂ bloqueia a neurotransmissão pré- e pós-sináptica (Lago *et al.*, 2004). Segundo Bennett *et al.* (1994) níveis elevados de PLA₂ causam excessiva hidrólise da membrana lipídica danificando as células. Sendo assim, alterações na atividade enzimática podem ser relevantes para o surgimento e para o curso de diferentes desordens neuropsiquiátricas.

Crotamina

A crotamina, outro componente da peçonha de *Crotalus*, é um polipeptídeo composto por 42 aminoácidos ligados por três pontes dissulfídicas, sendo considerada uma miotoxina por diversos autores (e.g., Maeda *et al.*, 1978; Santos *et al.*, 1993; Boni-Mitake *et al.*, 2006; Rizzi *et al.*, 2007). Essa substância foi descrita pela primeira vez em serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus* por Gonçalves e Polson (1947 *apud* Ogiura *et al.*, 2005). Esta toxina tem sido apontada como indutora da despolarização da membrana muscular esquelética, pelo aumento da permeabilidade ao Na⁺, provocando estado de fibrilação com contrações musculares curtas e relaxamento demorado. Alguns autores explicam esses efeitos como decorrentes de sua atuação por meio de canais de sódio nas fibras musculares (Matavel *et al.*, 1998; Ogiura *et al.*, 2005).

Quando inoculado isoladamente em ratos, este composto produz efeitos de paralisia espástica, espasmos musculares (Matavel *et al.*, 1998) e, quando injetada diretamente no cérebro de camundongos, produz estados convulsivos

e espasticidade (Habermann e Cheng-Raude, 1975 *apud* Boni-Mitake et al., 2006).

Giroxina

A giroxina, um componente pouco estudado do veneno de cascavéis, vem sendo descrita como uma glicoproteína similar trombina (“*trombin-like*”) e com atividades esterásicas (Alexander et al., 1988). Este componente foi primeiramente isolado por Raw et al. (1986), também da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. Quando injetada intravenosamente (e mesmo por outras vias, como a intraperitoneal) em ratos induz episódios de rotação do corpo no eixo longitudinal, com períodos intercalados de prostração, fenômeno denominado síndrome da giroxina (“*Gyroxin Syndrome*”). Outros efeitos comportamentais decorrentes da ação desta toxina incluem hipoatividade seguida de arreflexia, opistotonia e imobilidade (Torrent et al., 2007). A enzima tipo-trombina é responsável pela ação coagulante do veneno, transformando diretamente fibrinogênio em fibrina (Kini, 2006; Sano-Martins, 2001; Thomazini-Santos et al., 1998; Faili et al., 1994; Alexander et al., 1988).

Convulxina

A convulxina, encontrada no veneno de algumas espécies de cascavel, recebeu essa denominação, pois se acreditava ser a responsável pelas convulsões e distúrbios respiratórios observadas em humanos vítimas de acidentes com estas serpentes. Entretanto, Mello et al. (1989) demonstraram

que a toxina não exibe atividade convulsiva. Este componente do veneno de *Crotalus* é um potente ativador de plaquetas no sangue. Em experimentos *in vitro*, causou agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas, em diferentes espécies de mamíferos (Prado-Franceschi e Brazil, 1981).

Aspectos comportamentais do envenenamento crotálico

Moreira et al. (1996; 1997; 2000) realizaram testes de interação social e testes para avaliar ansiedade em ratos inoculados por via intraperitoneal com crotoxina. Os resultados mostraram que esta substância reduz a atividade exploratória dos animais no teste do campo aberto e diminui o tempo de atividade nos testes de interação social; em conjunto com outros resultados, se revelou ação ansiogênica desta toxina. Portanto, é possível que o veneno atue no sistema nervoso central, mesmo quando inoculado sistemicamente.

Em um estudo preliminar, Torrent et al. (2007) verificaram que a inoculação sistêmica da giroxina em ratos neonatos provocou alterações citoestruturais e bioquímicas no hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal. Os mesmos autores relataram que estes animais apresentaram desenvolvimento motor lentificado. Estes achados sugerem que alguns dos componentes do veneno crotálico podem gerar lesões no sistema nervoso central e, com isso, desencadear efeitos comportamentais usualmente atribuídos ao funcionamento da estrutura lesada.

Ademais, quando o veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi injetado diretamente no hipocampo de ratos, foram observadas crises epiléticas nos animais e, posteriormente, lesões no hipocampo bem como em outras regiões neurais, como hipotálamo (Mello e Cavalheiro, 1989).

É importante ressaltar que alguns autores defendem que o veneno bruto não passaria pela barreira hematoencefálica (BHE) (e.g., Barravieira et. al., 1996). No entanto, essa questão não parece bem estabelecida. Estudos de biodistribuição de toxinas integrantes do veneno de *Cdt* mostraram que apesar da pequena quantidade, essas toxinas se fixam no tecido cerebral após inoculação sistêmica (Cardi et al., 1998). Ainda em relação a este aspecto, Maruyama et al. (2005) observaram que o veneno dessa serpente pode induzir apoptose em células endoteliais que compõem a BHE reduzindo sua competência.

Um forte indicativo da habilidade da peçonha de *Cdt* ou um de seus componentes cruzar a BHE foi encontrado quando se inoculou o veneno bruto sistemicamente em ratos e se observou que os animais apresentavam prejuízos persistentes de memória operacional e de referência. A histologia dos encéfalos destes animais revelou perda de células no hipocampo (de Carvalho, 2010 - ver adiante para detalhes).

Uso de técnicas de cultura organotípica para avaliação neurotoxicológica

Técnicas de cultura de tecido nervoso “*in vitro*” têm sido particularmente úteis para análises neurotoxicológicas. A cultura de tecido neural emergiu de tentativas iniciais bem sucedidas envolvendo culturas de diferentes tecidos (ver Crain, 1976, para revisão e histórico). Entretanto, as técnicas de cultura tecido neural de secções organotípicas só foram realizadas com sucesso após o desenvolvimento de técnicas de interface, que utilizam uma membrana semiporosa entre o meio de cultura e a secção de tecido neural, realizadas por Stoppini (1991).

Culturas organotípicas de diferentes estruturas encefálicas podem manter suas características morfológicas por semanas e, portanto, são ferramentas valiosas em avaliações fisiopatológicas, análise de circuitos neurais e eletrofisiologia (Bahr, 1995; Gähwiler *et al.*, 1997; Norberg *et al.*, 2005). Entre as avaliações mais utilizadas neste tipo de cultura destacam-se modelos de acidentes vasculares cerebrais (Vornov *et al.*, 1994; Bonde *et al.*, 2002; McManus *et al.*, 2004), epilepsia (Pomper *et al.*, 2004; Poulsen *et al.*, 2004), lesões excitotóxicas mediadas por glutamato (Kristensen *et al.*, 2001; Gerace *et al.*, 2012), além de modelos de patologias como Alzheimer (Bell *et al.*, 2004). Frente a este variado rol de possibilidades, vem se intensificando o uso das culturas organotípicas na avaliação de neuroproteção e neuroreparo (ver Norberg *et al.*, 2005 para revisão).

Culturas organotípicas de tecido neural são usualmente preparadas a partir do encéfalo (ou parte dele) de ratos e camundongos. Entretanto, existem descrições bem sucedidas de culturas organotípicas de regiões encefálicas de

porcos, coelhos e fetos humanos (Meyer *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2001; Olsson *et al.*, 2004).

Dentre as diferentes regiões neurais capazes de crescer e sobreviver adequadamente em culturas organotípicas, certamente o hipocampo merece destaque (Norberg *et al.*, 2005). Isso se deve, em grande parte, a organização neuronal do hipocampo e sua hodologia (ver adiante). Dada facilidade de obtenção de culturas organotípicas de hipocampo de ratos e camundongos, existe uma vasta quantidade de dados disponíveis na literatura utilizando esta técnica para o estudo “*in vitro*” de longo prazo da circuitaria hipocampal em condições fisiológicas e patológicas (ver Gerace *et al.*, 2012).

O modelo de avaliação neurotoxicológica mais frequentemente relatado na literatura é privação de oxigênio e glicose (OGD – *Oxygen Glucose Deprivation*), que mimetiza os insultos decorrentes de acidentes vasculares isquêmicos (Norberg, *et al.*, 2005). Frente ao dano neuronal promovido pela OGD em culturas organotípicas de hipocampo, usualmente são testados fármacos com potencial neuroprotetor.

No modelo de OGD as células piramidais de CA1 do hipocampo são as mais suscetíveis ao dano, sugerindo que os receptores de NMDA medeiam o mecanismo de morte neuronal em eventos isquêmicos (Hatfield *et al.*, 1992; Bonde *et al.*, 2005).

A análise de toxicidade é aferida usualmente através de colorações fluorescentes que marcam apenas células já mortas, como é o caso do iodeto de propídeo (*Propidium Iodide*, em inglês, ou PI) que permite uma análise

relativamente fiel da extensão do dano às células hipocâmpais por diferentes drogas ou venenos animais.

Por se constituir num insulto relacionado a eventos isquêmicos que induzem morte celular, a lesão excitotóxica mediada por glutamato é um dos modelos de danos celulares mais bem estudados envolvendo culturas organotípicas de hipocampo. A utilização de doses distintas de glutamato permite que se avalie a função de diferentes receptores deste neurotransmissor individualmente (Noraberg *et al.*, 2005). Normalmente, na administração de agonistas de receptores NMDA e de AMPA em culturas de hipocampo, as células piramidais de CA1 tendem a ser mais suscetíveis (Hunt *et al.*, 2004; Kristensen *et al.*, 2001). Por outro lado, as células de CA3 são mais vulneráveis ao cainato e ao ácido domoico (Ananth *et al.*, 2003; Holopainen *et al.*, 2004; Schawrz *et al.*, 2014).

Apesar de representar uma valiosa ferramenta de avaliação neurotoxicológica e ser muito utilizada pela indústria farmacêutica para validação e ensaios basais de neurofármacos, existem poucos trabalhos disponíveis na literatura envolvendo culturas organotípicas e neurotoxinas provenientes de venenos animais. O primeiro trabalho dessa natureza a utilizar neurotoxinas de venenos animais foi realizado por Pringle *et al.* (1996) que testaram a Ω conotoxina (MVIIA – toxina do molusco marinho *Conus*) frente a ação neurodegenerativa induzida por hipóxia em culturas organotípicas de hipocampo. Este estudo avaliou a possível ação neuroprotetora desta conotoxina que, posteriormente, teve uma de suas isoformas comercializada como potente analgésico. Decorrido certo tempo deste estudo, vislumbrou-se a

possibilidade de avaliação toxinológica de venenos animais utilizando culturas organotípicas, primeiramente com o veneno de abelhas (Tanabe *et al.*, 1999) e em seguida com veneno de um escorpião - *Centruroides margaritatus* – (Saria *et al.*, 2000). O único relato de utilização de toxinas provenientes de serpentes envolve a administração de uma toxina muscarínica presente no veneno de serpentes do gênero *Dendroaspis* a fim de avaliar, em culturas organotípicas de hipocampo, o papel de receptores muscarínicos nas sinapses da via colateral de Schaffer sobre as células CA1 (Sánchez *et al.*, 2009).

Então, o uso destas técnicas *in vitro* representa uma alternativa promissora na avaliação do dano hipocampal decorrente da administração sistêmica da peçonha de *Cdt* relatado em de Carvalho (2010) (ver adiante para detalhes).

Neurobiologia da memória e navegação espaciais

Aprender a se deslocar eficientemente em um ambiente é de grande importância para muitos animais. Muitas espécies de vertebrados realizam essa tarefa de forma eficaz e flexível (Xavier, 1986).

Para se orientarem em um ambiente os animais se utilizam de diferentes estratégias que permitem alcançar o destino almejado. O'Keefe e Nadel (1978), em sua obra intitulada "The Hippocampus as a cognitive map", distinguiram essas estratégias e sugeriram que animais podem empregar mais de uma delas simultaneamente. Resumidamente, os autores propuseram a teoria do

mapa cognitivo, isto é, a idéia segundo a qual através do conhecimento prévio do ambiente os animais conseguem configurar relações entre o posicionamento de objetos independentemente de sua própria posição no meio, tal qual um mapa cartográfico propriamente dito. Através da exploração prévia do ambiente, o animal pode, então, guiar-se utilizando essas relações ambientais conhecidas, valendo-se de múltiplas triangulações entre estímulos ambientais e ele próprio, possibilitando a realização de cálculos de posicionamento cada vez que se desloca. Os autores teorizaram que as informações acerca do conteúdo espacial ficariam armazenadas em algum sistema de memória adaptado para reter e codificar informações espaciais, o “mapa cognitivo”. E propuseram que a formação hipocampal corresponderia a essa estrutura. O’Keefe e Nadel (1978) ressaltaram que outras estratégias de navegação espacial, denominadas estratégias de guiamento, seriam independentes da integridade hipocampal. Entre elas, por exemplo, quando a orientação é realizada em direção a uma pista proeminente, denominado sistema de *Taxon*, e quando a estratégia consiste em se deslocar através de um padrão de movimentos do próprio corpo, denominado orientação egocêntrica.

Em suma, a formação hipocampal é necessária quando a estratégia utilizada requer a aprendizagem das relações ambientais que permitem a configuração do “mapa cognitivo”, ou seja, o uso de estratégias de navegação espacial. Por outro lado, quando o animal se desloca seguindo apenas um estímulo visual que indica a localidade almejada ou quando se utiliza apenas de seu eixo egocêntrico para alcançar aquela localização, a formação hipocampal não participa da orientação espacial.

A formação hipocampal compreende o giro denteado, o hipocampo propriamente dito, incluindo seus sub-campos CA4; CA3; CA2 e CA1, o complexo subicular e a área entorrinal (Swanson, 1983).

O'Keefe e Dostrovsky (1971) descreveram a existência de células hipocâmpais cuja taxa de disparo aumenta dependendo da posição do animal no ambiente. Com efeito, essas células foram denominadas “*place cells*”, e possibilitariam ao animal estabelecer as relações entre as pistas presentes no espaço e usá-las para a navegação. Não surpreende que vários autores descreveram prejuízos de memória espacial em decorrência de lesões em diferentes componentes da formação hipocampal (e.g., Morris, 1981; Xavier *et al.*, 1999; Sallai, 2005; Tanhoffer, 2006).

Morris (1981; 1983) desenvolveu o labirinto aquático, uma tarefa poderosa para se avaliar a memória espacial de roedores e concluiu que animais submetidos a extensa lesão hipocampal exibiam prejuízos não somente quando necessitavam reter informações de natureza espacial mas também quando havia um contexto espacial e temporal específicos, ou seja, a retenção temporária da informação espacial estaria prejudicada nos animais lesados. Nessa ocasião, Olton (1979) havia proposto que a formação hipocampal participaria da codificação e retenção temporária da informação espacial, isto é, a memória operacional espacial seria dependente do hipocampo.

Diversos fatores podem ocasionar lesões nas células hipocâmpais. Entre eles, isquemia neonatal (Dell’anna *et al.*, 1991; Netto *et al.*, 1993), isquemia focal e global em fase adulta (Nunn *et al.*, 1994; Hartman *et al.*, 2005;

Tanhoffer, 2006), agentes quimioterápicos (Heacock et al., 1986; Rzeski et al., 2004; Tanhoffer, 2005; Seigers et al., 2010), radiação ionizante (Minamizwa et al., 1967; Sallai, 2005), entre outros.

Xavier et al. (1999) mostraram que ratos com lesões seletivas do giro denteado exibem prejuízos de desempenho no labirinto aquático tanto em teste de memória de referência como em teste de memória operacional, quando são instados a basearem sua busca em estratégias espaciais (ver adiante). Não obstante esses prejuízos, os animais exibem alguma melhora no desempenho da tarefa, provavelmente baseados em estratégias de guiamento que são independentes da formação hipocampal.

A perda celular em outras regiões hipocampais, como CA1 e CA3, também resulta em prejuízos na memória espacial (Dell'anna et al., 1991; Renault, 2004). Isto é, cada porção da formação hipocampal é necessária para as funções de memória espacial.

Avaliação da memória espacial no labirinto aquático de Morris

A avaliação da memória espacial em ambiente natural é particularmente difícil, pois existe um sem número de estímulos disponíveis no ambiente, o que dificulta seu controle (Xavier, 1986). Talvez seja por isso que o labirinto aquático tornou-se uma ferramenta muito popular em testes de memória espacial em roedores.

Nesta tarefa, o animal deve navegar por uma piscina para encontrar uma plataforma submersa invisível e não passível de ser encontrada pelo cheiro, ou qualquer outra pista local, para sair da água. Como não existem estímulos proximais indicando a localização da plataforma, o animal deve utilizar pistas distais dispostas no ambiente experimental. O uso de pistas distais associado ao treinamento em que o animal parte de diferentes pontos da borda da piscina a cada tentativa para encontrar a plataforma, promove o engajamento de estratégias de mapeamento espacial ou “estratégias de lugar”. Ou seja, para otimizar seu desempenho na tarefa, o animal deve conhecer as posições espaciais relativas dos objetos dispostos no ambiente, utilizando orientação aloccêntrica. É possível aprender a tarefa por meio de estratégias de guiamento em relação a uma pista proeminente. Porém, a variação do ponto de partida do animal a cada tentativa o estimula a usar orientação aloccêntrica e restringe o uso de estratégias de guiamento, incluindo as egocêntricas (Morris, 1983; Wishaw e Mittleman, 1986, Santos, 2001; Xavier et al., 1999).

Se a plataforma é mantida na mesma localização ao longo dos dias de treino é possível avaliar a memória de referência espacial, isto é, um tipo de memória aplicável a diferentes contextos, não estando sujeita a contextos temporais específicos. Diferentemente, se a localização da plataforma muda a cada dia, permanecendo constante nas tentativas de um mesmo dia, pode-se avaliar a manutenção temporária da informação, enquanto útil, na memória que neste caso está associada a um contexto temporal específico e válido para aquele dia. Isso permite a avaliação da memória operacional espacial. Em outras palavras, este teste permite avaliar se o animal se vale da informação adquirida na primeira tentativa para encontrar a plataforma mais rapidamente,

na segunda e demais tentativas do mesmo dia, permitindo ainda que se manipule o intervalo de tempo entre as tentativas. Note, porém, que essa informação deixa de ser útil nos dias subsequentes uma vez que a plataforma será apresentada em outros locais (Olton, 1979). Ademais, o intervalo de tempo entre as tentativas pode ser variado neste teste a fim de avaliar por quanto tempo o animal é capaz de reter a informação espacial na memória operacional.

A peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e memória espacial em ratos

Estudos anteriores (de Carvalho, 2010) envolvendo administração sistêmica de peçonha bruta de *Cdt* (1200 µg/kg) em ratos e subsequente avaliação da memória espacial no labirinto aquático de Morris mostraram a existência de prejuízos de desempenho. Os animais inoculados intraperitonealmente com a peçonha bruta de *Cdt* exibiram lentidão na aprendizagem da tarefa em relação a animais controle no teste de memória de referência do labirinto aquático de Morris. Por outro lado, no teste de memória operacional, o prejuízo se manifesta claramente quando existe um intervalo de tempo entre as tentativas (ITI), neste caso, 10 minutos. Resultados similares são usualmente observados após danos hipocampais, o que posteriormente foi confirmado por análises histológicas do encéfalo dos animais.

Esses resultados fornecem subsídios promissores para investigação do envenenamento experimental crotálico, uma vez que a injeção sistêmica da

peçonha de *Cdt* se mostrou capaz de produzir efeitos centrais, o que não havia sido descrito até o presente, e que estes efeitos atingem, sobretudo, a formação hipocampal.

Os objetivos do presente trabalho incluem (1) investigar os efeitos comportamentais produzidos pela inoculação **sistêmica** da crotoxina, neurotoxina que corresponde ao maior componente da peçonha bruta de *Cdt*, (2) avaliar os efeitos comportamentais produzidos pela inoculação **intrahipocampal** da peçonha bruta e da crotoxina, em grupos independentes de animais, (3) analisar os efeitos dose-resposta da incubação da peçonha bruta, da crotoxina e os possíveis efeitos protetores do soro anticrotálico em culturas organotípicas de hipocampo, a fim de investigar os efeitos destas toxinas sobre diferentes sub-campos da formação hipocampal e avaliar o curso temporal dos danos induzidos e, assim, hipotetizar sobre possíveis mecanismos fisiopatológicos adjacentes ao envenenamento crotálico.

Justificativa para a abordagem proposta

Os resultados comportamentais do envenenamento experimental, a ocorrência de estados convulsivos e demais efeitos neurológicos indicam que o veneno de *Cdt* tem ação neurotóxica no sistema nervoso central. Uma vez que a inoculação sistêmica da peçonha da cascavel sul-americana produz prejuízos permanentes na memória e danificam células hipocampais, pode-se adotar algumas estratégias de análise comportamental a fim de investigar e

correlacionar possíveis alterações do comportamento a eventos fisiopatológicos produzidos pelo envenenamento experimental.

As abordagens comportamentais utilizadas nestes experimentos são sensíveis a função hipocampal, portanto, as tarefas do labirinto aquático de Morris permitiram aferir o potencial dano promovido pela peçonha bruta de cascavel e pela crotoxina, o maior componente da peçonha, tanto por via intraperitoneal quanto por via intrahipocampal. A utilização da crotoxina purificada injetada sistemicamente em ratos permitiu analisar se a lesão hipocampal causada pela administração sistêmica da peçonha bruta é ocasionada, pelo menos em parte, por esta toxina. Caso o dano fosse confirmado e considerando as características bioquímicas da crotoxina, seria possível levantar hipóteses acerca da ação da peçonha bruta no sistema nervoso central. Ademais, estes resultados permitiriam considerar que a crotoxina, mesmo não tendo características biodinâmicas ideais, cruzaria a BHE. Outra estratégia experimental adotada neste trabalho, visou inocular tanto a peçonha bruta de *Cdt* quanto crotoxina por via intrahipocampal. Este experimento permitiu que fossem analisados os efeitos comportamentais desta inoculação sem a influência protetora da BHE.

Frente aos resultados expostos anteriormente, as técnicas *in vitro* utilizadas permitem analisar a seletividade e curso temporal do dano causado tanto pelo veneno quanto por suas toxinas, bem como permite alta flexibilidade e viabilidade na avaliação de diferentes doses e concentrações das drogas utilizadas. Em outras palavras, as culturas organotípicas de hipocampo e seus métodos de avaliação neurotoxicológica, permitiram avaliar quais células do

hipocampo são mais ou menos sensíveis aos efeitos tóxicos do envenenamento, qual seria o curso temporal da toxicidade e qual seria a dose-efetiva para que o dano neuronal fosse instaurado. Ademais, este método permitiu a análise da possível neuroproteção do soro anticrotálico frente aos insultos da peçonha bruta de *Cdt*. Ainda utilizando as culturas organotípicas e considerando os resultados obtidos nos experimentos preliminares *in vitro*, foi possível realizar experimentos que visaram analisar a cascata de eventos que decorrem da incubação da peçonha da cascavel sul-americana.

CAPÍTULO I

Administração sistêmica ou intrahipocampal de crotoxina em ratos prejudica a memória espacial?

A crotoxina (CTX), uma β -neurotoxina, é o maior e mais abundante componente da peçonha da cascavel sul-americana, *Crotalus durissus terrificus*. Sua principal atividade durante o envenenamento é o bloqueio da transmissão neuromuscular (Bon *et al.*, 1989; Sampaio *et al.*, 2010).

Essa toxina é um complexo heterodimérico, formado por uma porção básica de fosfolipase A₂ (PLA₂) e uma porção ácida. Além da clássica ação neurotóxica, a crotoxina possui atividade miotóxica (Cardi *et al.*, 1992; Salviniet *al.*, 2001), nefrotóxica (Monteiro *et al.*, 2001) e cardiotoxica (Santos *et al.*, 1990).

A CTX foi inicialmente purificada em 1938 utilizando técnicas de cristalografia, sendo o primeiro subcomponente de venenos animais a ser purificado (Slotta, 1938; Slotta e Fraenkel-Conrat, 1938).

Somente na década de 1950 os primeiros estudos acerca da estrutura e da função da CTX se iniciaram. Logo, foi descoberto que a estrutura era composta por duas subunidades (Frankel-Conrat e Singer, 1955) e, posteriormente, Hendon e Fraenkel-Conrat (1971) obtiveram sucesso em purificar estas duas subunidades, chamando-as de CA e CB. Por fim, concluiu-se que uma das estruturas era composta por PLA₂, cuja ação isolada era pouco tóxica quando inoculada em animais experimentais ou incubada em diferentes culturas de tecidos animais; e a outra subunidade, ácida, denominada crotapotina, cuja ação isolada não apresenta toxicidade (Hendon e Fraenkel-Conrat, 1971; Marlas e Bon, 1982; Radvanyi e Bon, 1982). Entretanto, a inoculação experimental das duas subunidades da CTX em animais experimentais e cultura de tecidos tem se mostrado altamente tóxica,

produzindo lesões em diferentes estruturas. Portanto, o mecanismo bioquímico de ação da CTX decorre de uma sinergia entre as duas frações da toxina.

Os efeitos neurotóxicos normalmente relatados decorrem do bloqueio da liberação de acetilcolina na junção neuromuscular (Chang e Lee, 1977). Além disso, a CTX tem conhecida ação citotóxica provocada por desacoplamento mitocondrial (Valente *et al.* 1998). No entanto, os efeitos neurotóxicos no sistema nervoso central são pouco estudados.

A administração intracerebroventricular de CTX gera crises convulsivas (Vital Brazil, 1966) e, por essa ação, a toxina foi usada posteriormente como agente farmacológico capaz de mimetizar epilepsia (Mello e Cavalheiro, 1988).

Congruentemente, a administração sistêmica de veneno bruto da cascavel sul-americana em ratos induz prejuízos de memória espacial no labirinto aquático de Morris, particularmente da memória operacional. A CTX, por ser uma neurotoxina clássica e possuir características bioquímicas que permitem relacioná-la aos danos neuronais do envenenamento experimental crotálico descritos por de-Carvalho (2010), a avaliação dos efeitos comportamentais seguidos à inoculação de CTX por via sistêmica e intrahipocampal em ratos parece pertinente.

Objetivos específicos do capítulo

O presente conjunto de experimentos almejou avaliar se a administração sistêmica ou intrahipocampal de crotoxina em ratos induz prejuízos de memória espacial similares aos descritos por de-Carvalho (2010) após administração sistêmica de veneno bruto. Visto que a administração intrahipocampal de CTX gera crises convulsivas em animais experimentais (Mello e Cavalheiro, 1989) e a administração sistêmica de CTX aumenta os níveis de ansiedade em ratos (Moreira *et al.*, 1996), espera-se que esta neurotoxina seja a responsável pelos efeitos comportamentais e os danos observados na inoculação sistêmica do veneno bruto de *Cdt*.

Materiais e Métodos

Obtenção do Veneno

O *pool* de veneno liofilizado de *Cdt* e a crotoxina já purificada, obtida por gel-filtração, foram fornecidos pelo Instituto Butantan de São Paulo.

Formação dos grupos experimentais

Foram utilizados 60 ratos Wistar, machos, pesando entre 300 e 350 g no início dos experimentos, mantidos com água e ração *ad libitum* em ciclo de claro-escuro de 12/12 horas, com luzes acendendo às 07:00h.

Os ratos foram organizados em seis grupos distintos, três deles submetidos a injeção intraperitoneal (SIS) e outros três submetidos à injeção intrahipocampal (IH), conforme descrito a seguir:

1. injeção SIS de 1 mL de solução de NaCl a 0,9% (grupo SIS-Salina, n=11);
2. injeção SIS de 1 mL de solução de “Crotoxina” (800 µg/kg) purificada a partir da peçonha de *Cdt*, dissolvida em salina (grupo SIS-Crotoxina, n=9);
3. injeção SIS de 1 mL de solução de peçonha bruta (1200 µg/kg) dissolvida em salina (SIS-Veneno, n=10)
4. injeção IH (ver adiante) de 0,8 µL de salina 0,9% por hemisfério (grupo IH-Salina, n=10);
5. injeção IH (ver adiante) 0,0035 µg de crotoxina por hemisfério veiculizada no volume de 0,8 µL de salina. Essa dose foi escolhida levando em consideração os experimentos de Mello e Cavalheiro (1989). (grupo CTX-IH, n=10); e
6. injeção IH (ver adiante) de 0,05 µg de peçonha bruta de *Cdt* por hemisfério veiculizada em 0,8 µL de salina (grupo Veneno IH, n=10). A dose foi escolhida baseando-se num teste piloto envolvendo 12 animais

organizados em 3 grupos de 4 animais cada que receberam injeções IH nas doses 0,3 µg/kg, 0,5 µg/kg e 0,8 µg/kg (ver apêndice I para resultados do teste piloto).

Sete dias após as injeções tiveram início os testes comportamentais.

Neurocirurgia

A administração IH das substâncias descritas acima foi realizada por meio de neurocirurgia estereotáxica. Os animais foram submetidos à anestesia por ketamina (1,7mL/kg) e xilazina (0,6mL/kg) por via IP. Assim que anestesiados os animais eram posicionados no aparelho estereotáxico. Após exposição do crânio, foram feitos orifícios de 0,5 mm de diâmetro no crânio do animal utilizando broca odontológica, nas coordenadas AP =4.2 mm e ML ± 3.0 mm (Paxinos e Watson, 1986). Com auxílio de uma micropipeta de vidro estirado com diâmetro externo da ordem de 150 µm acoplada a uma microseringa de 5 µL, foi injetado 0.8 µL em um sítio em cada um dos hemisférios cerebrais.

Após 7 dias da cirurgia os testes comportamentais tinham início.

Labirinto Aquático de Morris (1981)

Aparelho

Foi utilizada uma piscina circular de 200 cm de diâmetro e 50 cm de altura, preenchida até 25 cm com água tornada opaca pela adição de leite, cujas paredes foram pintadas com tinta preta (Morris, 1981). Uma plataforma móvel de acrílico transparente de 9 cm de diâmetro, colocada a 2 cm abaixo da superfície, possibilitava sair da água, servindo de escape para os animais. A localização da plataforma variava de acordo com o teste efetuado (ver adiante). Todo o experimento foi registrado por uma câmera de vídeo (Ethovision) conectada a um computador programado para analisar pares de coordenadas que definem a posição do animal coletadas a cada 0,1s.

Treino na tarefa de memória de referência espacial

A primeira avaliação dos animais, iniciada 7 dias após as injeções, envolveu o teste de memória de referência. A plataforma foi mantida sempre na mesma localização da piscina e o animal era solto a cada tentativa de um ponto diferente da borda. Se o animal não encontrasse a plataforma dentro dos dois minutos da tentativa ele era levado até a mesma pelo experimentador. Uma vez sobre a plataforma os animais dispunham de 15 segundos para investigar o ambiente. Uma sessão envolveu 2 tentativas por dia de teste, com intervalo entre tentativas (ITI) de 10 minutos. Esta etapa envolveu 12 sessões consecutivas. Os parâmetros analisados em cada tentativa deste teste foram latência, comprimento do trajeto, tempo de permanência no anel externo,

intermediário e central da piscina, e o ângulo de divergência entre a posição inicial do animal e a plataforma.

A latência, i.e., o tempo que o animal despende desde sua liberação na piscina até alcançar a plataforma juntamente com o comprimento do trajeto que o animal percorre até o escape são medidas comumente adotadas para mostrar a aprendizagem sobre a localização da plataforma.

Probe test

A seguir avaliou-se a lembrança sobre a localização da plataforma e a extinção da resposta adquirida no teste de memória de referência por meio de um “*Probe Test*”. A plataforma foi retirada da piscina e os animais dispunham de 3 minutos para nadar livremente. Os dados foram analisados minuto a minuto (Time Bins) permitindo avaliar o tempo gasto por cada animal na região onde se encontrava a plataforma anteriormente e a velocidade de natação de modo a se avaliar eventuais prejuízos motores. Os parâmetros mensurados neste teste foram comprimento do trajeto, porcentagem de tempo que o animal permanece no quadrante crítico e velocidade média de natação. A porcentagem de tempo que o animal permanece no quadrante crítico permite inferir quanto o animal se lembra da localização da plataforma treinada durante o teste de memória de referência. Além disso, esse parâmetro permite avaliar, ao longo dos time bins, a extinção da resposta de busca pela plataforma, já que a mesma não está disponível. A velocidade média de natação envolvendo a

divisão do comprimento do trajeto pelo tempo total de permanência dos animais na piscina durante o Probe Test fornece uma medida da motivação e do desempenho motor dos animais.

Treino no teste de memória operacional espacial

O teste de memória operacional iniciou-se 3 dias após o Probe test. A cada dia de teste a localização da plataforma era alterada. O animal realizou três tentativas por dia. Neste teste foram analisados, para cada tentativa e condição de intervalo (ver a seguir), os parâmetros: latência, comprimento do trajeto, porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior.

Os parâmetros de análise que permitem avaliar os locais onde se encontrava a plataforma no dia anterior refletem a memória adquirida nos dias anteriores e pode refletir persistência na busca, o que, em outras palavras, significa baixa flexibilidade comportamental.

Foram realizadas duas fases no teste de memória operacional em que se variou o ITI. A primeira fase consistiu de 4 sessões com ITI igual a 10 minutos. A segunda fase envolveu 3 dias com ITI virtualmente zero. Para expressar o desempenho dos animais em cada uma dessas fases, calculou-se a média por tentativa, incluindo as sessões de cada fase.

Análise estatística

Os parâmetros mensurados no labirinto aquático de Morris foram analisados por meio de análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). No teste de memória de referência incluiu-se “grupo” como fator entre-sujeitos e “sessão” e “tentativa” como fatores intra-sujeitos. O fator “sessão” neste caso afere a melhora do desempenho do animal ao longo do treinamento; admite-se que ao longo das sessões o animal carrega consigo informações dos dias anteriores, que reflete em sua melhora de desempenho. O fator “tentativa” afere a melhora de desempenho ao longo das tentativas de uma mesma sessão. Os parâmetros mensurados no Probe Test foram submetidos a ANOVA tendo “grupo” como fator entre-sujeitos e “time bin” como fator intra-sujeitos. No teste de memória operacional a ANOVA envolveu “grupo” como fator entre-sujeitos e “tentativa” e ITI como fatores intra-sujeitos.

Quando necessário, foi realizado o teste “post-hoc” de Tukey HSD.

Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico Statistica 7.0.

Processamento histológico dos encéfalos

Ao término das avaliações comportamentais os animais foram sacrificados utilizando perfusão intracardíaca de formalina 40%. Para

realização do procedimento, os animais foram inicialmente anestesiados profundamente com cloral hidratado 50%.

Resumidamente, após a perfusão, os encéfalos dos animais foram removidos e submetidos ao processamento de fixação e inclusão em parafina para realização de cortes coronais de 7µm de espessura em micrótomo da região da formação hipocampal. Posteriormente os cortes foram corados utilizando o protocolo de Nissl para violeta de cresila. Os detalhes do protocolo de histologia utilizados neste trabalho estão disponíveis em Onishi, 2004.

Resultados

Para facilitar a compreensão dos resultados, os mesmos serão apresentados separando-se as vias de inoculação, isto é, primeiramente os referentes à inoculação sistêmica tanto do veneno bruto quanto da crotoxina e em seguida os dados referentes à inoculação intrahipocampal.

Resultados da Inoculação sistêmica de veneno, crotoxina ou salina

Memória de referência

A Figura 2 mostra a latência e o comprimento do trajeto ao longo das sessões de treinamento na versão envolvendo memória de referência no

labirinto aquático de Morris; as curvas refletem a aprendizagem espacial dos animais ao longo do treinamento na tarefa.

A ANOVA revelou a existência de efeitos significantes em relação aos fatores Grupo [**Latência**: ($F(2,21)=3,27$; $p<0,0158$) (Figura 2A); **Comprimento do trajeto**: ($F(2,21)=4,35$; $p<0,0092$) (Figura 2B)]; Sessão [**Latência**: ($F(11,242)=16,74$; $p<0,0001$); **Comprimento do trajeto**: ($F(11,242)=12,45$; $p<0,0001$)], Tentativa [**Latência**: ($F(1,22)=2,80$; $p<0,0191$) **Comprimento do trajeto**: ($F(1,22)=6,11$; $p<0,0031$)]. Igualmente, a ANOVA revelou diferenças significantes em relação às interações entre os fatores Grupo e Sessão [**Latência**: ($F(11,242)=1,20$; $p<0,0412$); **Comprimento do trajeto**: ($F(11,242)=1,82$; $p<0,0295$)]; Grupo e Tentativa [**Comprimento do trajeto**: ($F(2,21)=2,25$; $p<0,0318$)] e Grupo, Sessão e Tentativa [**Comprimento do trajeto**: ($F(11,242)=1,98$; $p<0,0312$)], denotando que houve diferenças nas taxas de aquisição da tarefa por ambos os grupos ao longo do treinamento, assim como os grupos diferiram ao longo das tentativas, dependendo da sessão.

O teste post-hoc de Tukey HSD revelou que essas diferenças decorrem da comparação dos grupos Crotoxina e Controle em relação ao grupo “veneno”, não diferindo entre si. De fato, como ilustra a Figura 2, os escores exibidos pelos animais do grupo Veneno são maiores que os exibidos pelos outros dois grupos.

Figura 2– Média ($\pm$ SEM) das latências (s) (A) e dos comprimentos de trajeto (cm) (B) dos animais dos grupos Controle, Veneno e Crotoxina no teste de memória de referência no labirinto aquático de Morris. Note que os grupos “controle” e “crotoxina” exibem escores semelhantes em ambos os parâmetros; em contraste, o grupo “veneno” exhibe escores maiores ao longo de todo o teste, exceto nas primeiras sessões, quando nenhum dos grupos sabia a localização da plataforma.

Vale ressaltar que ao início do teste todos os animais eram ingênuos em relação ao conhecimento sobre a localização da plataforma; isso explica o desempenho semelhante de todos os grupos nas primeiras duas sessões. No entanto, conforme o animal adquire informações de natureza espacial acerca da localização da plataforma, seu desempenho melhora gradualmente. É possível notar que mesmo estando prejudicados em relação aos demais grupos, o grupo “veneno” também exhibe menor melhora de desempenho ao longo das sessões de treino. Em contraste, os grupos controle e crotoxina apresentam curvas de aprendizado semelhantes. Em conjunto, esses resultados indicam que os animais do grupo Veneno exibiram prejuízo de desempenho em relação ao grupo Controle, ao passo que os animais do grupo Crotoxina não exibem qualquer prejuízo.

Extinção da resposta adquirida (Probe test)

Os resultados do *probe test* são apresentados na Figura 3.

A ANOVA revelou ausência de efeitos significantes em relação ao fator Grupo [**Comprimento do trajeto** (Figura 3A) ($F(2,21)=0,99$; $p<0,3615$); **Porcentagem de permanência no quadrante crítico** (Figura 3B) ($F(2,21)=0,44$; $p<0,5819$); e **Velocidade média de natação** (Figura 3C) ($F(2,21)=0,27$; $p<0,4214$)]. Além disso, conforme esperado, a ANOVA revelou diferenças significativas em relação ao fator “TIME BIN” [**Comprimento do trajeto** ($F(2,44)=10,09$, $p<0,0001$); **Porcentagem de permanência no quadrante crítico** ($F(2,44)=8,68$, $p<0,0021$); e **Velocidade média de natação** ($F(2,44)=19,06$, $p<0,0001$) indicando a ocorrência de extinção ao longo do Probe Teste, e ausência de efeitos significantes nas interações entre Grupo e TIME BIN [**Comprimento do trajeto**: ($F(2,44)=0,19$; $p<0,6317$); **Porcentagem de permanência no quadrante crítico**: ($F(2,44)=0,81$; $p<0,4909$); e **Velocidade média de natação**: ($F(2,44)=0,22$; $p<0,7021$)], indicando que a taxa de extinção dos diferentes grupos ao longo dos Time Bins não diferiu.

Figura 3 – Médias (-SEM) do (a) comprimento do trajeto, (b) porcentagem de permanência no quadrante crítico e (c) velocidade de natação no Probe Test no labirinto aquático de Morris.

No conjunto, esses resultados indicam que não houve qualquer tipo de comprometimento sensório-motor nos animais que receberam injeções de veneno ou crotoxina exibiram velocidades de nado semelhantes aos controle e percorreram, em média, trajetos semelhantes.

Memória operacional

Os resultados do teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris são apresentados na Figura 4.

A ANOVA revelou a existência de efeitos significantes em relação aos fatores Grupo [**Latência** (Figura 4A) ($F(2,21)=1,69; p<0,0391$) e **Comprimento**

do trajeto (Figura 4B) ($F(2,21)=1,14;p<0,0457$)], e efeito próximo de significativo em relação ao fator Grupo em relação a **Porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior** (Figura 4C) ($F(2,21)=2,29; p<0,0558$). A ANOVA revelou ainda efeito significativo em relação ao fator ITI [**Latência**: $F(1,22)=18,90;p<0,0001$); e **Comprimento do trajeto**: $F(1,22)=9,56;p<0,0237$)], ao fator Tentativa [**Latência**: ($F(2,44)=4,25;p<0,0165$); **Comprimento do trajeto**: ($F(2,44)=3,89;p<0,0209$); **Porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior**: ($F(2,44)=2,66; p<0,0311$)] e em relação a interação entre Grupo e ITI [**Latência**: ($F(1,22)=10,39;p<0,0002$); **Comprimento do trajeto**: ($F(1,22)=5,96;p<0,0224$); **Porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior**: ($F(1,22)=3,29; p<0,0354$). Não existiram efeitos significantes na interação entre Grupo, ITI e tentativa; no entanto, o post-hoc de Tukey HSD revelou que as segundas e terceiras tentativas ($p<0,05$) do grupo Veneno na condição de ITI=10 minutos diferiram entre as demais tentativas do mesmo e dos outros grupos e ITI, para latência e comprimento do trajeto. Para o parâmetro de porcentagem de permanência no quadrante crítico do dia anterior, esta diferença residiu nas segundas e terceiras tentativas do grupo veneno para ITI = 0.

Figura 4 –Média (-SEM) das (a) latências, (b) comprimento do trajeto e (c) porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior na tarefa de memória operacional do labirinto aquático de Morris. Ao lado esquerdo de cada gráfico são representados os resultados do teste quando o Intervalo entre as tentativas (ITI) foi 10 minutos e ao lado direitos resultados quando o ITI foi virtualmente zero.

O teste pós-hoc de Tukey HSD revelou que as diferenças no teste de memória operacional envolvendo o fator grupo e suas interações devem-se basicamente ao grupo veneno, que exibiu ao longo do teste latências e comprimentos de trajeto significativamente maiores que os demais grupos, refletindo prejuízo, ao longo das tentativas, da retenção sobre a localização da plataforma, particularmente quando o ITI é 10 minutos mas não quando o ITI é virtualmente zero.

Análise descritiva dos achados histológicos

As figuras relativas a histologia são encontradas no Apêndice II deste trabalho.

A análise das secções coradas com violeta de cresila indicou que a peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, quando inoculada sistemicamente, promoveu perda notória de células do sub-campo CA3 do hipocampo quando comparadas ao grupo controle. Embora menos evidente, ainda foi possível notar perda de neurônios da camada CA1. Não houve dano aparente no giro denteado. O hipocampo dos animais inoculados sistemicamente com CTX não aparentaram apresentar danos.

Resultados da inoculação intrahipocampal de peçonha bruta, crotoxina ou salina

A despeito da realização de testes-piloto para a escolha da dose, ocorreu razoável número de perdas de animais injetados com veneno e crotoxina. Isto é, no grupo veneno IH houve 4 mortes, e portanto o número final de animais incluídos nos testes comportamentais foi 6. Em relação ao grupo CTX IH houve 6 mortes, e portanto o número final de animais incluídos nos testes comportamentais foi 4. Não houve perda de animais no grupo Controle (n=10).

Memória de referência

Os resultados dos animais que receberam injeções intrahipocâmpais de veneno, crotoxina ou salina no teste de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris são apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Média (- SEM) das latências (s) (A) e comprimento do trajeto (cm) (B) dos animais dos grupos IH Controle, IH Veneno e IH CTX ao longo das sessões de treino no teste de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris.

A ANOVA revelou a existência de efeitos significantes em relação aos fatores Grupo [**Latência**: ($F(2,21)=8,53$; $p<0,0001$) (Figura 5a); **Comprimento do trajeto**: ($F(2,21)=7,65$; $p<0,0001$) (Figura 5b)]; Sessão [**Latência**: ($F(11,242)=4,49$; $p<0,0281$); **Comprimento do trajeto**: ($F(11,242)=6,45$; $p<0,0199$)], Tentativa [**Latência**: ($F(1,22)=1,91$; $p<0,0476$); **Comprimento do trajeto**: ($F(1,22)=2,16$; $p<0,0389$)]. A ANOVA revelou ainda diferenças significantes nas interações entre os fatores Grupo e Sessão [**Latência**: ($F(11,242)=5,94$; $p<0,0012$); **Comprimento do trajeto**: ($F(11,242)=3,92$;

$p < 0,0029$); Grupo e Tentativa [**Latência:** ($F(2,21)=2,97$; $p < 0,0321$); **Comprimento do trajeto:** ($F(2,21)=3,02$; $p < 0,0288$)] e Grupo, Sessão e Tentativa [**Latência:** ($F(11,242)=2,06$; $p < 0,0202$); **Comprimento do trajeto:** ($F(11,242)=1,98$; $p < 0,0312$), denotando, como mostra a Figura 5, que houve substancial prejuízo de desempenho nos animais injetados por via intrahipocampal com veneno ou CTX em relação aos animais Controle injetados com veículo.

Note que os animais dos grupos Veneno IH e CTX IH pouco melhoraram seu desempenho ao longo das sessões. A análise post-hoc de Tukey HSD revelou ausência de melhora significativa nesses grupos ao longo das sessões de treino (latência: $p = 0,3769$ para o grupo Veneno IH e $p = 0,4512$ para o grupo CTX IH; comprimento do trajeto: $p = 0,2994$ para veneno IH e $p = 0,3812$ para CTX IH), diferindo dos animais controle que exibiram substancial melhora de desempenho ($p = 0,0011$). Em outras palavras, os animais injetados via intrahipocampal com a peçonha ou com a crotoxina não exibiram qualquer aprendizagem da tarefa. Diferentemente, conforme esperado, o grupo Sham não exibiu qualquer prejuízo de aquisição no teste de memória de referência espacial.

Uma vez que os animais tratados com a peçonha bruta de *Cdt* ou com a crotoxina não aprenderam a tarefa de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris, a comparação dos resultados do Probe test não foi informativa e, portanto, não são apresentados.

Memória operacional

Os resultados do teste de memória operacional são apresentados na Figura 6.

A ANOVA revelou a existência de efeitos significantes em relação aos fatores Grupo [**Latência** (Figura 6a) ($F(2,21)=16,14;p<0,0001$); **Comprimento do trajeto** (Figura 6b) ($F(2,21)=15,94;p<0,0001$)], ITI [**Latência**: $F(1,22)=8,55;p<0,0018$); **Comprimento do trajeto**: $F(1,22)=6,29;p<0,0237$] e Tentativa [**Latência**: ($F(2,44)=1,25;p<0,0491$); **Comprimento do trajeto**: ($F(2,44)=1,89;p<0,0570$)]. A ANOVA revelou ainda efeitos significantes na interação entre Grupo e ITI [**Latência**: ($F(1,22)=22,09;p<0,0001$); **Comprimento do trajeto**: ($F(1,22)=15,63;p<0,0001$)]; Grupo e Tentativa [**Latência**: ($F(2,44)=3,32;p<0,0276$); **Comprimento do trajeto**: ($F(2,44)=2,90;p<0,0408$) e Grupo, ITI e Tentativa [**Latência**: ($F(2,44)=1,97;p<0,0459$); **Comprimento do trajeto**: ($F(2,44)=1,44;p<0,0518$)].

Figura 6 -Média (-SEM) das (a) latências, (b) comprimento do trajeto na tarefa de memória operacional do labirinto aquático de Morris. Ao lado esquerdo de cada painel de gráfico estão representados os resultados do teste com Intervalo entre as tentativas (ITI) de 10 minutos. Ao lado direito de cada painel o ITI era virtualmente zero.

A pequena redução da latência ao longo das tentativas quando o ITI é 10 minutos (Figura 6A, painel esquerdo) nos animais dos grupos veneno IH e CTX IH indica que esses animais não retêm informações espaciais quando o intervalo é da ordem de 10 minutos. Diferentemente, quando o ITI é reduzido para virtualmente zero, esses animais, embora prejudicados no desempenho global da tarefa em relação aos animais controle, exibem melhora de desempenho ao longo das tentativas, indicando que são capazes de adquirir informações de natureza espacial e utilizá-la para localizarem a plataforma posteriormente, desde que o intervalo de tempo desde a aquisição até o uso dessa informação seja relativamente pequeno. O teste post-hoc de Tukey HSD confirmou a existência dessas diferenças geradas pela variação do ITI tanto em

relação a latência ($p < 0,0340$ para o grupo Veneno IH e $p < 0,0412$ para o CTX IH) quando em relação ao comprimento do trajeto ($p < 0,0398$ para o grupo veneno IH e $p < 0,0496$ para o grupo CTX IH).

Discussão

Resumidamente, tanto a inoculação sistêmica quanto a intrahipocampal da peçonha bruta promoveram prejuízos de memória espacial nos animais. A análise histológica revelou pouca perda de células da camada de neurônios em CA1 e de forma mais proeminente em CA3 quando a injeção foi sistêmica; e, quando a inoculação foi por via intrahipocampal o dano atingiu todas as porções da estrutura e promoveu marcada retração do tecido. A inoculação de CTX promoveu prejuízos e danos observáveis apenas quando a inoculação foi intrahipocampal.

A ação neurotóxica do veneno de *Crotalus* sempre foi relacionada ao bloqueio da neurotransmissão na junção neuromuscular, causando paralisia. Esta ação periférica foi discutida desde a descoberta da neurotoxicidade desta peçonha (Slotta e Fraenkel-Conrat, 1938). No entanto, dados preliminares indicavam que componentes do veneno poderiam ter ação central, face a ocorrência de convulsões após o acidente crotálico.

Mello e Cavalheiro (1989) inocularam o veneno de *Cdt* diretamente no hipocampo de ratos e observaram alterações eletrofisiológicas epileptiformes no hipocampo, além de crises tonico-clônicas severas e corrida selvagem.

Esses autores observaram ainda lesões no hipocampo, o sítio de injeção, e em regiões distantes, como o hipotálamo. Curiosamente, a injeção de convulxina nas mesmas condições experimentais não geraram o mesmo padrão de resultados, indicando que esta toxina não era responsável pelos eventos epileptiformes e convulsões observadas após a administração da peçonha bruta (Mello et al., 1989).

A administração da peçonha bruta sistemicamente em animais experimentais geram estados convulsivos e síndromes neurológicas, como a rotação do corpo no eixo longitudinal e movimentos conhecidos como “wetshake dog” (agitação do corpo semelhante a de cães molhados) (Barrio, 1961; Alexander *et al.*, 1988; Torrent *et al.*, 2007). De fato, conforme relatado nos resultados do teste-piloto (apêndice I) para definições da dose deste experimento, a grande maioria dos animais apresentou crises convulsivas severas após a administração tanto da crotoxina como da peçonha bruta.

Os resultados do presente experimento confirmaram a ocorrência de ação central do veneno quando injetado sistemicamente (de Carvalho, 2010) e evidenciam que o dano é ainda exacerbado quando a inoculação se dá por via intrahipocampal.

No teste de memória de referência do labirinto aquático de Morris, inicialmente todos os animais exibem escores semelhantes, pois, todos são ingênuos. Ao longo das sessões de treino os animais adquirem a informação sobre a localização da plataforma e melhoram gradualmente seu desempenho. Os animais do grupo veneno injetado sistemicamente, primeiramente, não adquirem essa informação tão bem como os controles e, por fim, não atingem o

desempenho equivalente ao dos controles ao final das sessões de treino. Note nos parâmetros de latência (Figura 2A) e comprimento do trajeto (Figura 2B) que o desempenho do grupo veneno é evidentemente inferior aos controles a partir da terceira sessão até a sessão final. Esses dados são consistentes com a enorme variedade de dados disponíveis na literatura que relatam prejuízos de memória espacial no labirinto aquático de Morris após danos hipocampais (e.g. Morris, 1981; Morris, 1983; Conrad e Roy, 1993; Jeon *et al.*, 2010). Note que apesar dos animais do grupo veneno apresentarem aquisição mais lenta e desempenho significativamente inferior, esses animais exibem melhora gradual, ou seja, eles podem aprender e usar algumas informações na navegação espacial. Uma vez que a peçonha promoveu danos em populações de células hipocampais, esses dados são concordantes a achados que envolvem a aprendizagem da tarefa de memória de referência no labirinto aquático em modelos animais de lesão hipocampal (Jarrard, 1993). Os prejuízos de memória de referência espacial são ainda mais evidentes quando a inoculação da peçonha ou da CTX se deu por via intrahipocampal (Figura 5). Note que os animais tratados destas maneiras, exibem pouca ou nenhuma melhora em seus desempenhos.

Interessantemente, a crotoxina, injetada sistemicamente, não induziu prejuízos na memória espacial. Muito embora a inoculação de CTX por via intraperitoneal em ratos induza aumento dos níveis de ansiedade, supostamente modificando a dinâmica do sistema gabaérgico/benzodiazepínico; uma vez que administração de drogas inibitórias deste sistema (diazepam e flumonazil) reverte os efeitos ansiogênicos (Moreira

et al., 1996, 1997 e 2000), esta alteração comportamental parece não se estender a memória espacial.

Por outro lado, a inoculação intrahipocampal da CTX promoveu marcados prejuízos de memória espacial. Então, parece plausível que a CTX por si não possua a habilidade de cruzar a barreira hematoencefálica e mesmo que alcance o sistema nervoso central, o dano provocado parece dependente da quantidade de toxina que atinja as estruturas neurais (vide capítulo 2).

Não existem, ainda, dados que permitam tecer discussões aprofundadas acerca da habilidade da peçonha ou de suas toxinas cruzar a BHE. Esta ausência de resultados deveu-se, sobretudo a ausência de relatos de ação central por parte da peçonha crotálica. Entretanto, mais recentemente, foi apontado que uma das frações do veneno, a giroxina, aumenta temporariamente a permeabilidade da BHE (Alves-da-Silva, 2012). Isto explicaria os resultados diferentes da inoculação sistêmica da peçonha bruta e da CTX. Isto é, alguns componentes, que não a crotoxina, são aptos a transpor a BHE e gerar os danos centrais. Ademais, frente a este aumento de permeabilidade gerado pela giroxina, existe a possibilidade de que moléculas maiores da peçonha bruta, como a crotoxina, cruzem a BHE e promova morte neuronal, como observado na inoculação intrahipocampal da CTX.

Os prejuízos observados no teste de memória operacional do labirinto aquático de Morris também são congruentes com danos a porções da formação hipocampal e reafirmam os resultados do estudo anterior (de Carvalho, 2010).

O teste de memória operacional espacial permite avaliar a duração da manutenção da informação espacial na memória, enquanto essa informação é útil. No presente estudo, a localização da plataforma é alterada a cada dia de teste; assim, a manutenção da informação espacial sobre a localização da plataforma é válida apenas para as tentativas daquele dia. Uma vez que o ITI pode ser variado, pode-se avaliar por quanto tempo a informação espacial é mantida na memória operacional. Os resultados da inoculação sistêmica da peçonha bruta deste estudo mostraram a existência de prejuízo na memória operacional espacial apenas quando há um intervalo de tempo de 10 minutos entre as tentativas. Esses resultados são interessantes, pois permitem descartar a interpretação de que esses animais teriam prejuízos sensoriais ou motores, ou mesmo prejuízos na aquisição da informação. Isto é, uma vez que o desempenho dos animais injetados com veneno intraperitoneal não difere do controle quando o intervalo entre as tentativas é igual a zero, isso permite afirmar que esses animais adquiriram a informação espacial crítica sobre a localização da plataforma, sendo capazes de utilizá-la desde que o intervalo de tempo entre a aquisição e o uso seja pequeno. Consoante aos dados do teste de memória de referência espacial, a CTX não gerou prejuízos quando inoculada sistemicamente e tanto a peçonha bruta quanto a CTX promoveram prejuízo dramático de memória operacional quando foram injetadas intrahipocampalmente.

Segundo Olton et al. (1979) a formação hipocampal seria preponderante para o arquivamento temporário da informação espacial. No teste de memória de referência o contexto temporal perde sua relevância ao longo das sessões, pois, a plataforma permaneceu no mesmo local. Em contrapartida, o tempo se

torna relevante quando somente as tentativas do dia fornecerão as informações necessárias para o desempenho da tarefa.

A análise dos parâmetros de latência (Figura 4A e 6A) e comprimento do trajeto (Figura 4B e 6B) está de acordo com diversos achados que demonstram prejuízos de memória operacional seguido de alguma intervenção que afeta a formação hipocampal (e.g. Lindner et al., 1992; Xavier et al., 1999; Santos, 2001; Sallai, 2005; Frielingsdorf et al., 2006; Tanhoffer, 2006; Zhou et al., 2009). De fato, a histologia dos encéfalos dos animais inoculados sistemicamente com a peçonha bruta de Cdt revelou que houve perda de células em menor número CA1 e de forma mais evidente em CA3. Cada uma das diferentes populações da formação hipocampal prepondera funcionalidades diferentes.

Xavier et al. (1999) relataram que após danos seletivos nas células granulares do giro denteado de ratos, apesar do marcado prejuízo no desempenho de tarefas espaciais, os animais exibiram alguma melhora de desempenho durante o treino. Os autores propuseram que essa melhora estaria relacionada a utilização de outras estratégias de navegação que não a espacial, permitindo aos animais alcancem a plataforma mais rapidamente. De fato, diversos estudos envolvendo o teste de memória de referência no labirinto aquático mostram que diferentes lesões hipocampais resultam em prejuízo espacial, mas alguma melhora ao longo do treino (e.g.. Shohan *et al.*, 2003; Sallai, 2005; Tanhoffer, 2006). Essas observações não conflitam com a interpretação de que os animais lesados empregam estratégias de guiamento,

o que torna a busca menos eficiente e isso se reflete em desempenho pior que o de animais sadios.

De acordo com O'Keefe e Nadel (1978), as células granulares informam outras estruturas da formação hipocampal sobre os ângulos de incidência dos estímulos distais.

Além do giro denteado, as outras células que formam a formação hipocampal desempenham igualmente função importante na aquisição de memórias espaciais. A perda de células piramidais de CA1 e CA3 do hipocampo gera marcado prejuízo sobre a memória de referência (Rogers *et al.*, 1989; Conrad e Roy, 1993; Scheff *et al.*, 2005).

Existem relatos de que lesões seletivas em porções do hipocampo, sobretudo CA1, levam a persistência de busca a um local previamente aprendido. Milani *et al.* (1998), ao observarem ratos com lesões no subcampo CA1 do hipocampo, relataram persistência da busca em uma área inicial onde havia uma recompensa após a mudança desta para outra área, em teste que envolve avaliação de memória espacial.

No teste de avaliação da memória e de extinção da resposta adquirida, o "Probe test", não houve diferenças significativas entre os animais injetados com veneno e CTX sistemicamente em relação aos animais controle, indicando que esses animais, embora exibindo prejuízo na aquisição da resposta, foram capazes de extingui-la da mesma forma que os animais controle. O que é congruente com os dados histológicos que mostraram discreto dano em CA1.

Ademais, a Figura 3A mostra que os grupos inoculados sistemicamente não diferem em relação ao comprimento do trajeto, o que se reflete numa

velocidade média de natação indistinta entre os grupos, sugerindo, novamente, que o veneno não causa prejuízos motores crônicos que poderiam influir nos resultados dos testes no labirinto aquático de Morris.

A perda de células de diferentes subcampos hipocampais e, consequente perda das suas conexões, é apontada por diversos autores como causa da diminuição da flexibilidade comportamental (Xavier *et al.*, 1999; Morice *et al.*, 2007; Diba e Buzsáki, 2008). Neste mérito, de-Carvalho (2010) mostrou que ratos inoculados sistemicamente com a peçonha bruta de *Cdt* expostos a uma tarefa em que a localização da plataforma é indicada por meio de uma pista proximal, possibilitando aos animais a adoção de estratégias de guiamento ao invés da estratégia espacial, exibem dificuldade em alterar seu comportamento para realização da nova tarefa, sugerindo baixa flexibilidade comportamental por parte desses animais.

Relevante notar que a crotoxina injetada sistemicamente não induziu qualquer dos efeitos produzidos pelo veneno bruto. Pelo menos duas hipóteses podem ser aventadas para explicar esses resultados. A primeira admite uma inabilidade da crotoxina isolada em cruzar a barreira hematoencefálica, distintamente da peçonha bruta. Ou seja, outros componentes da peçonha bruta podem contribuir para a transposição da barreira hematoencefálica. da-Silva *et al.*, (2011 e 2012) relataram que a gioxina aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica por meio da degradação de componentes endoteliais. A segunda hipótese admite que a crotoxina não promoveria **diretamente** danos hipocampais.

A análise dos resultados comportamentais, aqui descritos, em conjunto com dados disponíveis na literatura permite que se aponte que a injeção

sistêmica de peçonha bruta promove lesões em estruturas do sistema nervoso que contribuem para a manutenção, mas não para a aquisição, da informação espacial. Note que no teste de memória espacial operacional, os animais do grupo veneno possuem desempenho idêntico ao controle com a condição de $ITI = 0$. Isto é, a passagem do tempo fez com que os animais perdessem parte da informação acerca da localização da plataforma. Isto também explica o prejuízo destes animais no teste de memória de referência, que tinha como ITI 10 minutos; ou seja, este tempo prejudicava o desempenho dos animais ao longo das sessões, entretanto, os animais eram capazes de melhorar parcialmente seu desempenho em função do treino repetitivo e adoção de estratégias de deslocamento espacial independentes do funcionamento do hipocampo.

Por outro lado, o prejuízo causado pela inoculação intrahipocampal de peçonha bruta de Cdt e de crotoxina foi de tamanha extensão que até mesmo uma passagem de tempo mínima, como na condição de ITI zero no teste de memória operacional prejudicou o desempenho dos animais.

O experimento envolvendo inoculações intrahipocampais teve alguns problemas. O primeiro deles foi encontrar uma dose satisfatória para a inoculação intrahipocampal. Isso foi implementado pelo uso de experimentos-piloto. Entretanto, o número de animais perdidos após as injeções das toxinas mostrou que a dose escolhida foi potencialmente alta.

Muito embora alguns autores já tenham feito experimentos com inoculação intrahipocampal (Mello e Cavalheiro, 1989; Mello *et al.*, 1989) tanto da crotoxina quanto com a peçonha bruta que inspiraram a manutenção da

dose aqui utilizada; os objetivos dos autores eram diferentes do almejado neste trabalho. Os trabalhos supracitados almejavam avaliar se a crotoxina e a peçonha bruta da cascavel Sul-Americana tinham potencial para ser usado como ferramenta farmacológica para o estudo de epilepsia. Isto é, gerariam eventos epileptiformes. O que de fato ocorreu na grande maioria dos animais (apêndice I).

Estudos anteriores correlacionam toxinas isoladas da peçonha de *Crotalus* com alterações morfofuncionais no sistema nervoso central. Por exemplo, Ruiz de Torrent *et al.* (2007) avaliaram alterações citoarquitetônicas da inoculação intracerebroventricular de giroxina em ratos neonatos. Os autores concluíram que regiões como o hipocampo e hipotálamo sofriam danos severos relacionados a má formação neural. Por outro lado, tem havido relatos de que a crotamina injetada no hipocampo de ratos promove efeitos que potencializaram a persistência de memórias de contextos aversivos (Vargas *et al.*, 2014). Esta mesma toxina já havia sido apontada como promotora de aumento de Ca^{2+} no citosol de neurônios colinérgicos, promovendo aumento dos níveis de acetilcolina no sistema nervoso central de ratos (Camillo *et al.*, 2001).

Muito embora os efeitos comportamentais produzidos pela inoculação intrahipocampal tanto do veneno bruto como da crotoxina tenham produzido substanciais prejuízos de memória, os mecanismos que levam a este comprometimento não são claros. O dano pode ser produzido por efeitos indiretos, tais como crises convulsivas e epilepsia, quanto pelos poucos animais que restaram em cada grupo. Um controle maior de dose far-se-á

necessário para elucidar mais sobre o efeito, sobretudo, da crotoxina inoculada diretamente no hipocampo de ratos.

Conclusão

O presente conjunto de resultados permite concluir e que o veneno bruto de *Cdt*, quando injetado intraperitonealmente induz prejuízos de memória espacial, porém a injeção de crotoxina pela mesma via de administração não produz os mesmos efeitos. Estas diferenças de ações podem ser explicadas pelo não cruzamento da BHE pela crotoxina ou por esta toxina não promover danos ao hipocampo na quantidade/dose que atingiu o sistema nervoso central. Diferentemente, a administração intrahipocampal de veneno bruto e de crotoxina levam a marcados prejuízos na retenção de informações na memória operacional espacial.

No conjunto, os resultados do presente estudo permitem concluir que a peçonha bruta e a crotoxina levam a marcados prejuízos na retenção, mas não na aquisição, de informações de natureza espacial, possivelmente em decorrência de atividade epileptiforme que se instala nessa região nervosa após a administração dessas substâncias, particularmente na dose utilizada quando a mesma se dá por via intrahipocampal.

CAPÍTULO II

Morte neuronal induzida pela peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* e pela crotoxina em culturas organotípicas de hipocampo de ratos, e efeito protetor do soro anticrotálico

Culturas organotípicas de secções hipocampais vêm sendo utilizadas com sucesso em estudos sobre os efeitos de privação de oxigênio e gliocose, manipulação que mimetiza um evento isquêmico (Vornov, e et al 1994), de neurotoxinas (Zimmer e Noraberg, 1998) e de substâncias neuroprotetoras (Shim e col., 2003).

As secções de hipocampo obtidas a partir de tecido neonatal de ratos podem ser mantidas em cultura por semanas, mantendo a organização histológica básica. Além disso, podem ser facilmente manipuladas e inspecionadas em microscópio de luz.

Numa variante deste método, o hipocampo é seccionado e mantido em uma interface constituída de uma membrana porosa, mergulhada em meio de cultura próprio, em condições específicas de mistura gasosa e temperatura (Stoppini, 1991). A principal vantagem desta técnica é a manutenção da viabilidade das culturas por várias semanas bem como a facilidade da inspeção visual das mesmas. Porém, sua maior vantagem está na preservação, por semanas, da organização celular e das conexões intrínsecas da estrutura (Gutierrez e Heinemann, 1999), bem como de seus parâmetros fisiológicos e biofísicos (Zimmer e Gahwiler, 1984; Buchs et al., 1993; Hartel e Matus, 1997).

Ensaio de neurotoxicidade em culturas organotípicas empregam o iodeto de propídeo como marcador de dano celular. Essa substância transpõe a membrana celular somente quando a integridade desta última está comprometida, emitindo fluorescência vermelha ao reagir com o ácido nucleico. Assim, sua adição às culturas permite realizar uma análise quantitativa dos

danos celulares (Noraberg et al., 1999; Blaabjerg et al., 2001; Pederesen, 2003).

As culturas organotípicas de hipocampo são ferramentas valiosas nos ensaios neurotoxicológicos, pois permitem manipulações específicas de dose, concentração e temperatura do meio (que mimetizariam condições de hiper ou hipotermia) de forma direta, mais controlada, e mais facilmente do que em ensaios *In vivo*.

O hipocampo

O hipocampo é uma das estruturas encefálicas melhor estudadas. O resultado disso é o vasto conhecimento sobre o desenvolvimento, conexões neurais, canais iônicos, neurotransmissores e conhecimento da maquinaria biológica que molda a formação hipocampal (Andersen *et al.*, 2007). Possivelmente por isso, a formação hipocampal atrai o estudo de diferentes áreas das neurociências, desde análises de comportamento até ensaios de neurotoxicologia.

O hipocampo propriamente dito é composto de diferentes subcampos, CA1-CA4. Estas regiões recebem e enviam conexões a porções que compõe a formação hipocampal, como o córtex entorrinal, o subículo (pré e para subículo) e o giro denteado (Andersen *et al.*, 2007). As diferentes regiões da formação hipocampal formam uma rede neural bem definida e a integridade desta rede como um todo é preponderante para vários sistemas de memória,

sobretudo espacial. A Figura 7 mostra uma representação esquemática das conexões intrínsecas da formação hipocampal.

Figura 7 –Organização unidirecional do fluxo de informações na formação hipocampal consideradas as conexões intrínsecas da estrutura (A). É possível identificar o circuito trisináptico nas conexões hipocâmpais. Os neurônios da camada II do córtex entorrinal (EC) emitem projeções para o giro denteado (DG) e para o CA3 através da via perforante. As células da camada III do EC emitem projeções para o CA1. As células granulares do DG se projetam para o CA3 por meio das fibras musgosas. Os neurônios piramidais do CA3 projetam-se para CA1 através da via

colateral de Schaffer. E as células piramidais de CA1 emitem projeções para o subículo. Em (B) apresenta-se, esquematicamente, as projeções representadas através do eixo transversal do hipocampo (retirado de Andersen *et al.*, 2007).

Além deste circuito bem definido, a formação hipocampal é organizada em lamelas paralelas (Andersen *et al.*, 1970). Essa organização lamelar favorece que o hipocampo se desenvolva em culturas organotípicas mantendo sua organização interna típica (Gerace *et al.*, 2012).

Os tipos celulares predominantes no hipocampo são células piramidais. Os neurônios piramidais formam a camada de células piramidais que se estendem de CA1, onde são mais compactadas, ao CA3, onde possuem menor empacotamento (Amaral e Lavinex, 2007).

As células piramidais têm tamanhos variados ao longo dos subcampos do hipocampo e diferem substancialmente em relação a conexões, expressão de canais e receptores entre CA1 e CA3.

Enquanto a organização dendrítica de CA3 é extremamente variável (Ishizuka *et al.*, 1995) a organização dendrítica das células piramidais de CA1 apresenta organização marcadamente homogênea (Pyapali *et al.*, 1998). Além disso, a expressão de receptores de glutamato, por exemplo, apresentam diferenças substanciais entre as diferentes sub-regiões da formação hipocampal (ver adiante).

Por outro lado, o giro denteado é, na sua maioria, composto por células granulares. As células granulares desta região possuem corpo celular elíptico com espinhos dendríticos característicos em forma de cone (Claiborne *et al.*, 1990; Amaral e Levinex, 2007).

Soro anticrotálico

O primeiro relato de uma imunização contra um veneno animal data de 1887. Henry Sewall (1887) imunizou, com sucesso, uma pomba contra o veneno glicerinado de uma espécie de cascavel (*Sistrurus caetenatus*). Apesar de não deixar claro como era o protocolo, a premissa, hoje bem evidenciada, era a de que algum componente no sangue de um animal previamente envenenado podia imunizar um animal não-imunizado. Isso ficou ainda mais evidente posteriormente, quando Roux e Yerssin (1888 *apud* Chipaux e Goyffon, 1998) e Von Behring e Kitasato (1890 *apud* Chipaux e Goyffon, 1998) imunizaram outros animais utilizando sangue de cobaias contaminadas com difteria e tétano, respectivamente.

Ainda hoje, o principal procedimento para neutralizar a ação de venenos animais é a administração de anti-venenos (soros) específicos para cada espécie venenosa ou peçonhenta. Além de ser a forma mais eficiente de tratar casos de envenenamento por animais, esse tratamento reduz drasticamente a letalidade e as seqüelas resultantes do acidente (Chipaux e Goyffon, 1998).

No Brasil diferentes instituições trabalham na formulação de soros, como a Fundação Ezequiel Dias, o Instituto Butantan e o Instituto Vital-Brazil (Ministério da Saúde, 2001). Normalmente, o soro obtido no Brasil é uma preparação líquida contendo anticorpos eqüinos purificados (Fab`2) (Araújo et al., 2008).

Dentre os soros antiofídicos, destacam-se o anti-botrópico (usado contra o veneno de *Bothrops spp.*), o anti-crotálico (contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus*), o anti-botrópico-crotálico, o anti-laquéutico (contra o veneno de *Lachesismuta*) e o anti-elapídico (contra o veneno de *Micrurusfrontalis*). Não por acaso, estes soros são utilizados nos tipos mais comuns de acidentes ofídicos.

É importante ressaltar que soros são fármacos que previnem a ação dos venenos, ou seja, eles atuam como neutralizadores do envenenamento *a posteriori*. Por isso, é recomendável a administração do soro (o anti-veneno) o mais rapidamente possível após o acidente.

Resultados anteriores do nosso laboratório (de Carvalho, 2010) mostraram que o soro anticrotálico é eficaz em prevenir os prejuízos comportamentais observados após o envenenamento experimental sistêmico pelo veneno de Cdt em ratos, quando administrado até 24 horas após o envenenamento.

A presente série de experimentos visou avaliar o efeito da incubação de doses crescentes da peçonha bruta de Cdt e de crotoxina e o efeito do soro anticrotálico em culturas organotípicas de hipocampo de ratos, a fim de avaliar a seletividade do dano neuronal e eventual proteção, em diferentes subcampos da formação hipocampal.

Todos os experimentos envolvendo culturas organotípicas de hipocampo (Capítulos 2 e 3) foram conduzidos no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia da Universidade de Florença, na Itália.

Material e Métodos

Obtenção do veneno, crotoxina e soro anticrotálico

O veneno liofilizado de *Cdt* e a crotoxina já purificada por meio de técnicas de gelfiltração, foram fornecidos pelo Instituto Butantan de São Paulo. Da mesma forma, o soro anticrotálico foi produzido e cedido pelo Instituto Butantan de São Paulo.

Preparação das culturas organotípicas de hipocampo de ratos

Utilizando técnicas de dissecação, hipocampus foram isolados a partir de encéfalos de filhotes ratos Wistar com 5 dias de idade. Secções transversais de hipocampo com 420 µm de espessura foram obtidas usando um “tissuechopper” McIlwain. Após o seccionamento, as secções foram transferidas para uma membrana semiporosa de 30 mm de diâmetro (Millicell-CM PICM03050; Millipore, Italy) as quais estavam dispostas em uma placa de cultura contendo 6 poços. Cada poço era preenchido com 1,2 mL de meio de cultura. O meio de cultura era composto de 50% de meio mínimo essencial de Eagle, 25% de soro equino estéril e inativado, 25% de solução balanceada de “hank”, 5 mg/ml de glucose, 2 mM L-glutamina, e 3,75 mg/ml de fungicida

amphotrecin B. As secções permaneceram, por 14 dias, a 37°C em uma incubadora de CO₂ com uma mistura de ar atmosférico umidificado e 5% de CO₂, antes do início dos experimentos.

Avaliação de toxicidade e do curso temporal do dano celular

Para fins explanatórios, a presente série de experimentos foi dividida em Experimentos 1, 2 e 3. Em todos eles tanto a peçonha bruta quanto a crotoxina adicionados aos meios foram diluídas em solução estéril de PBS de modo que a concentração final desejada (ver adiante) fosse adequada para o volume máximo do meio de cultura por poço, ou seja, 1,2 mL.

A avaliação do dano neuronal em cada experimento foi realizada pela adição de Iodeto de propídeo (IP) (5 µg/ml) às amostras e posterior avaliação da intensidade de fluorescência oriunda de cada sub-campo da secção hipocampal, sob microscópio de fluorescência (Olympus IX-50; SolentScientific, Segensworth, UK) equipado com lâmpada de xênon, lente objetiva de 4x e filtro de rodamina. O iodeto de propídeo foi adicionado 90 minutos após a incubação das toxinas e a mensuração da fluorescência ao microscópio foi realizada em períodos variáveis de tempo, dependendo do experimento. Em cada avaliação as imagens foram digitalizadas através de uma câmera anexada ao microscópio (DiagnosticInstruments Inc., Sterling Heights, MI, USA) controlada por software (InCyt Im1TM; IntracellularImaging Inc., Cincinnati, OH, USA). As imagens foram subsequentemente analisadas utilizando o software de análises

morfométricas Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Para a quantificação da morte neuronal, foram selecionados isoladamente subcampos CA1, CA3 e giro denteado, utilizando a “função de desenho” do software ImageJ (ImageJ; NIH, Bethesda, USA) e a densidade ótica de fluorescência do IP de cada campo foi aferida.

Todos os experimentos foram realizados em tréplica e 8 foi o número mínimo de secções de hipocampo expostas a cada concentração de qualquer dos tratamentos, por arranjo experimental.

*Experimento 1 – Avaliação da neurotoxicidade da peçonha bruta de *Cdt**

Em 4 culturas independentes foram adicionadas doses distintas da peçonha bruta de *Cdt* (i.e., 0,05, 0,1, 0,5 e 1 µg/mL). Os resultados de fluorescência mensuradas em secções tratadas com essas concentrações foram comparados com resultados correspondentes oriundos de culturas controle, isto é, não expostas a qualquer droga ou toxina, e com culturas expostas a 1 mM de glutamato (que funcionou como controle positivo de morte neuronal no hipocampo de forma não seletiva).

Imagens e análises de fluorescência foram obtidas em intervalos pré-estabelecidos conforme esquematizado na Figura 8. Foram realizadas medidas de fluorescência em cada região investigada 2, 4, 6 e 24 horas após a adição do veneno.

Figura 8 - Esquema representando os intervalos de obtenção de imagens ao microscópio de fluorescência das culturas do Experimento 1. Da preparação e isolamento das secções de hipocampo se seguiram 14 dias em incubadora. Subsequentemente, foram adicionados os tratamentos farmacológicos. Noventa minutos depois era adicionado Iodeto de propídeo e as imagens foram coletadas 2, 4, 6 e 24 horas após a exposição das fatias à peçonha bruta.

Experimento 2 – Avaliação da neurotoxicidade da Crotoxina

A condução geral deste experimento foi igual ao anterior, porém as culturas foram incubadas com diferentes doses de crotoxina (0,05, 0,1, 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$). Para fins de comparação, o controle positivo foi um grupo de culturas incubado com 1 $\mu\text{g/mL}$ da peçonha bruta.

A aquisição das imagens foi realizada nos mesmos intervalos de tempo descritos no Experimento 1.

Experimento 3 – Avaliação da neuroproteção pelo soro anticrotálico

Neste experimento foi avaliado o efeito do soro anticrotálico em culturas expostas a diferentes concentrações da peçonha bruta de *Cdt* (0,05 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$). As doses foram escolhidas com base nos resultados dos experimentos

anteriores, em que a dose menor produziu dano seletivo no CA1 e a dose maior promoveu lesão em todos os campos da formação hipocampal. O soro foi adicionado a cultura em quantidade recomendada para neutralização total da peçonha (admite-se que 1 mL de soro é suficiente para neutralizar pelo menos 1,5 mg do veneno).

A incubação da peçonha seguiu o mesmo procedimento descrito nos experimentos anteriores. Para cada uma das concentrações do veneno, o soro anticrotálico foi administrado em dois intervalos de tempo diferentes, em secções independentes, depois da incubação com peçonha (ver Figura 9). Num grupo de secções a aplicação do soro ocorreu 1 hora após a incubação com a peçonha. Num outro grupo, a aplicação do soro ocorreu 4 horas após a administração da peçonha. Os resultados foram comparados com medidas correspondentes de secções incubadas com solução pré-neutralizada da peçonha. Ou seja, nesse caso, antes da incubação das secções a peçonha era exposta a quantidade necessária de soro anticrotálico em tubo de ensaio e mantida a 37°C por 1 hora para garantir sua inativação. Após este período, seguia-se com o procedimento de incubação usual das culturas organotípicas de hipocampo. Além disso, como controle positivo para cada grupo, houve um grupo de secções que não recebeu tratamento com soro, sendo apenas incubado com a peçonha.

A Tabela 1 resume a constituição dos grupos do Experimento 3. As imagens e as análises de fluorescência foram obtidas 24 horas após a administração da peçonha. Para fins de análise estatística, os dados envolvendo diferentes tratamentos submetidos a uma mesma concentração de

peçonha foram separados e, portanto, o parâmetro “dose” não foi considerado. Logo, somente o parâmetro tempo de adição do soro anticrotático e suas interações com os diferentes grupos foram consideradas.

Figura 9 - Esquema representando os intervalos de obtenção de imagens ao microscópio de fluorescência das secções incluídas no Experimento 3. Da preparação e isolamento dos cortes de hipocampo seguiu-se 14 dias em incubadora. Subsequentemente, foram adicionados os tratamentos farmacológicos do experimento. Após 1 hora um grupo incubado com cada uma das concentrações da peçonha bruta recebeu o tratamento com soro anticrotático. Após 4 horas da apresentação da peçonha bruta, outros dois grupos receberam tratamento com soro anticrotático. As imagens de fluorescência foram obtidas 24 horas após a apresentação da peçonha.

Tabela 1 – Constituição dos grupos do Experimento 3.

GRUPO	TRATAMENTO
Pré-neutralizado	Incubação com solução pré-neutralizada de soro e peçonha bruta.
0,05 µg/mL	Incubação com 0,05µg/mL de peçonha bruta.
0,05 µg/mL + Soro 1hr	Incubação com 0,05 µg/mL de peçonha bruta e posterior tratamento com soro anticrotálico após 1 hora.
0,05 µg/mL + Soro 4hr	Incubação com 0,05 µg/mL de peçonha bruta e posterior tratamento com soro anticrotálico após 4 horas.
0,5 µg/mL	Incubação com 0,5 µg/mL de peçonha bruta.
0,5 µg/mL + Soro 1hr	Incubação com 0,5 µg/mL de peçonha bruta e posterior tratamento com soro anticrotálico após 1 hora.
0,5 µg/mL + Soro 4hr	Incubação com 0,5 µg/mL de peçonha bruta e posterior tratamento com soro anticrotálico após 4 horas.

Análise Estatística

Os dados apresentados neste capítulo se referem as médias e erro padrão ($\pm$ SEM) para cada um dos 3 experimentos. Para efeitos de comparação, os dados de intensidade de fluorescência de cada um dos subcampos do hipocampo são representados graficamente em termos de porcentagem dos controles positivo ou negativo. Foram utilizadas análises de variância (ANOVA) seguidas do teste de Tukey HSD (Statistica 7.0), para cada um dos experimentos independentes. Para a análise de curso temporal foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas. Como fatores “entre-sujeitos” foram incluídos Grupo e subcampo (CA1, CA3 e giro denteado). Para efeitos de análise, os dados foram tratados em função da **variação** da intensidade de fluorescência para cada um dos subcampos individualmente. Como fator “intra-sujeitos” foi incluído o curso temporal, uma vez que a fluorescência foi mensurada 2, 4, 6 e 24 horas após a incubação com veneno.

Resultados

Experimento 1 – Avaliação da neurotoxicidade da peçonha bruta de *Cdt*

Fotomicrografias representativas de secções organotípicas do hipocampo submetidas aos diferentes tratamentos e marcadas com iodeto de propílio são apresentadas na Figura 10. A Figura 11 mostra a intensidade média de fluorescência no giro denteado, CA3 e CA1, em função dos diferentes tratamentos aplicados no Experimento 1, em imagens obtidas 24 horas após a incubação com peçonha bruta, em porcentagem do grupo controle negativo que foi utilizado como referência.

Figura 10 –Fotomicrografias de culturas organotípicas de hipocampo obtidas 24 horas após a incubação com diferentes doses de peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* e glutamato 1mM. Note que nas concentrações menores há marcada fluorescência do PI, sobretudo na região CA1, enquanto nas concentrações maiores a fluorescência aparece também no CA3 e giro dentado.

Figura 11 – Percentagem relativa(+ E.P.M.) de fluorescência (em relação ao controle negativo) gerada por PI no CA1, CA3 e giro denteado (DG) após a exposição das culturas organotípicas do hipocampo a diferentes concentrações do veneno ou a 1mM de glutamato. A linha apresentada acima das barras representa os grupos que diferiram significativamente do grupo controle de forma global ($p<0,05$); isto é, todos os grupos exceto o 0,05µg/mL diferiram estatisticamente do grupo controle.

* indica diferença significativa ($P<0,05$) na intensidade de fluorescência do subcampo CA1 em relação aos demais subcampos do mesmo grupo.

De maneira geral, a peçonha aumentou significativamente a morte celular em culturas organotípicas de hipocampo de ratos. Todos os grupos, exceto 0,05 µg/mL, são estatisticamente diferentes do grupo controle ($p<0,05$). A ANOVA revelou efeito significativo em relação ao fator Grupo ($F(5, 312)=7,1229$, $p=0,0001$). De fato, a análise da Figura 11 sugere a ocorrência de um efeito dose-resposta, isto é, quanto maior a dose da peçonha, maior a quantidade de fluorescência emitida pela secção. Além disso, a ANOVA revelou efeito significativo para subcampo ($F(2, 624)=20,763$, $p=0,0001$).

Ademais, este aumento da intensidade de fluorescência pelas diferentes concentrações da peçonha bruta de *Cdt* ocorre diferentemente em cada um dos três subcampos do hipocampo, demonstrada pela interação significativa entre Grupo e subcampo ($F(10,624)=2.9323$, $p=0,0013$). Além disso, é possível notar nas fotomicrografias que o aumento da intensidade de fluorescência, isto é, a morte celular, ocorre principalmente nos neurônios hipocampais.

A Figura 12 mostra o curso temporal da intensidade de fluorescência por pixel das imagens obtidas ao microscópio de fluorescência 2, 4, 6 e 24 horas após a incubação com peçonha, no sub-campos CA1 (Figura 11A) e CA3 (Figura 11B), e no giro denteado (Figura 11C).

Figura 12 – Intensidade de fluorescência no CA1 (A), CA3 (B) e giro denteado (C) em função de mensurações realizadas 2, 4, 6 e 24 horas após a incubação com a peçonha. Os dados estão expressos em intensidade absoluta de fluorescência por pixel da imagem (- SEM). A) representa o curso temporal apenas da sub-região CA1; B) de CA3 e C) do giro denteado (DG).

A análise do curso temporal da incubação da peçonha bruta de *Cdt* sugere que além de existir uma curva de dose-resposta significativa também há efeito do tempo de incubação, conforme esperado. A ANOVA retornou efeito significativo do parâmetro curso temporal ($F(3, 312)=4,8483$, $p=0,0026$) e na interação estatística entre curso temporal e subcampo ($F(6, 624)=2.5899$, $p=0,0173$). A análise da Figura 12 permite a observação novamente do efeito dose-resposta; note que os padrões dos grupos apresentam-se sempre um patamar acima intensidade de fluorescência para cada um dos subcampos. Depreende-se ainda que a evolução da intensidade de fluorescência ocorre de forma semelhante entre os grupos; isto é, cada um dos grupos tem o curso temporal da evolução de morte celular análogo, porém obedecendo o patamar de dano da concentração da peçonha incubada.

Experimento 2 – Avaliação da neurotoxicidade da Crotoxina

Fotomicrografias representativas de secções organotípicas do hipocampo submetidas aos diferentes tratamentos do Experimento 2 e marcadas com iodeto de propílio são apresentadas na Figura 13. A Figura 14 mostra a intensidade média de fluorescência no giro denteado, CA3 e CA1, em função dos diferentes tratamentos aplicados no Experimento 2, em imagens obtidas 24 horas após a incubação com Crotoxina, em porcentagem do grupo controle positivo que foi utilizado como referência.

Figura 13 - Fotomicrografias de culturas organotípicas de hipocampo obtidas 24 horas após a incubação com diferentes doses de crotoxina e dos controles negativos e positivos. Note que nenhuma das concentrações de CTX levou a grandes intensidades de fluorescência. Muito embora a maior concentração de CTX apresente certo aumento na intensidade de fluorescência

Figura 14 - Percentagem relativa(+ E.P.M.) de fluorescência (em relação ao controle negativo) gerada por PI no CA1, CA3 e giro denteado (DG) após a exposição das culturas organotípicas do hipocampo a diferentes concentrações de crotoxina ou a 1µg/mL de peçonha bruta de *Cdt*.

A ANOVA revelou efeito global de Grupo ($F(5,312)=6,275;p<0,001$). A análise do Pós-hoc de Tukey revelou diferença significativa entre o grupo incubado com a peçonha bruta de *Cdt* (o controle positivo) e os demais grupos ($p<0,05$). Note que nenhum dos grupos incubados com CTX difere do **controle negativo**.

A análise do curso temporal do efeito das diferentes doses de CTX também não revelou quaisquer diferenças significantes. Assim, apenas o grupo controle positivo, que exibiu aumento na intensidade de fluorescência da mesma forma como foi observado no Experimento 1 exibiu aumento de fluorescência no presente experimento.

Experimento 3. Avaliação da neuroproteção pelo soro anticrotálico

O presente experimento teve por objetivo avaliar o efeito do soro anticrotálico na morte celular induzida por veneno de Cdt em diferentes subcampos do hipocampo. Como a análise de interesse era a ação do soro anticrotálico, e foram utilizadas duas concentrações diferentes de veneno, os resultados de cada uma dessas concentrações são apresentados em figuras independentes.

As Figuras 15 e 16 mostram a percentagem média de fluorescência no giro denteado, CA3 e CA1, em função dos diferentes tratamentos aplicados no Experimento 3 envolvendo as doses de 0,05 ug/mL e de 0,5 ug/mL, respectivamente, de veneno, em imagens obtidas 24 horas após a incubação com Crotoxina, em relação ao grupo controle negativo que foi utilizado como referência.

Figura 15 - Percentagem relativa(+ E.P.M.) de fluorescência (em relação ao controle negativo) gerada em das culturas incubadas com 0,05µg/mL do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* e tratados com soro anticrotálico após 1 ou 4 horas. A linha observada acima representa os grupos que diferiram significativamente do grupo controle de forma global ($p < 0,05$);

* próximo às colunas dos grupos representam a diferença entre a intensidade de fluorescência dos subcampos dentro de um mesmo grupo.

Para fins de análise as comparações foram realizada independentemente entre as condições de doses utilizadas.

A ANOVA revelou efeito significativo de grupo ($F(3,28)=4,648$; $p < 0,001$), subcampo ($F(2,56)=1,32785$; $p < 0,0465$) e tendência de diferença estatística para a interação dose subcampo ($F(6,56)= 1, 9741$; $p < 0,0713$). A análise do post-hoc de Tukey revelou que no grupo tratado com soro anticrotálico após 4 horas e o grupo que só recebeu a peçonha bruta, a intensidade de

fluorescência dos subcampos dentro dos próprios grupos diferiu significativamente ($p < 0,05$).

Figura 16 - Percentagem relativa(+ E.P.M.) de fluorescência (em relação ao controle negativo) gerada em das culturas incubadas com 0,5µg/mL do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* e tratados com soro anticrotálico após 1 ou 4 horas. A linha observada acima representa os grupos que diferiram significativamente do grupo controle de forma global ($p < 0,05$);

próximo às colunas dos grupos representam a diferença entre a intensidade de fluorescência dos subcampos dentro de um mesmo grupo.

Para fins de análise as comparações foram realizada independentemente entre as condições de doses utilizadas.

A ANOVA deste experimento mostrou que houve efeito de grupo ($F(3,28)=8,198$; $p<0,001$) e tendência de diferença para subcampo ($F(2,56)=0,9341$; $p<0,0662$). A análise do post-hoc de Tukey revelou que no grupo tratado com soro anticrotálico após 4 horas ($0.05 \mu\text{g/mL} + \text{Serum 4hrs}$) e o grupo que só recebeu a peçonha bruta ($0.05 \mu\text{g/mL}$), a intensidade de fluorescência do subcampo CA3 diferiu dos demais dentro dos próprios grupos ($p<0,05$). No grupo tratado com soro após 4 horas ($0.05 \mu\text{g/mL} + \text{Serum 4hrs}$), neste caso, o subcampo CA1 apresentou resultados próximos à significância.

A Figura 17 mostra as fotomicrografias dos hipocampus deste experimento.

Figura 17 - Fotomicrografias de culturas organotípicas de hipocampo obtidas após 24 horas da incubação de 0.05 e 0.5 µg/mL de peçonha bruta de Cdt e tratadas com soro anticrotálico 1 horas ou 4 horas após a administração da peçonha. Os dados foram comparados entre um grupo controle positivo e um grupo chamado pré-neutralizado, que foi tratado com a peçonha bruta de Cdt pré-neutralizada pelo soro anticrotálico.

A fotomicrografias apresentadas na Figura 15 exemplificam os padrões de imagens observadas após cada um dos tratamentos. É possível observar que nos grupos tratado com soro anticrotálico, sobretudo na dose 0,05 µg/mL, quando o tratamento se dá após 1 hora de incubação da peçonha, o subcampo

que apresenta maiores danos neuronais é o CA1 ao passo que quando o tratamento é após 4 horas o dano mais extenso ocorre em CA3. Em outras palavras, enquanto CA1 tem o dano estabilizado após o tratamento com o soro anticrotálico após 4 horas, o dano em CA3 já está instaurado após este período. Note, na Figura 16, que a intensidade de fluorescência para CA3 pouco varia do grupo 0,05 μ /mL + Serum 4 hrs para o grupo controle positivo.

Discussão

Em suma, os resultados obtidos nesta presente série de experimentos foram: 1) a peçonha bruta de Cdt promoveu aumento de morte celular nas culturas organotípicas de hipocampo; 2) em baixas concentrações, a peçonha bruta de Cdt aumentou a perda celular preferencialmente da camada de neurônios de CA1; 3) a crotoxina não promove danos análogos a peçonha bruta nas doses utilizadas em culturas organotípicas de hipocampo e 4) o soro antincrotálico é eficiente em prevenir os danos neuronais causados pela peçonha de Cdt se administrado até uma hora após a incubação da peçonha; e quando ele foi administrado 4 horas após a incubação da peçonha o dano foi parcialmente prevenido em CA1 mas não em CA3.

Dado os resultados comportamentais do capítulo 1 e de experimentos anteriores (de Carvalho, 2010) os efeitos neurotóxicos produzidos, isto é, o dano neuronal em culturas de hipocampo, pela peçonha de *Cdt* eram esperados. No entanto, as técnicas *In vitro*, permitiram uma análise mais

acurada da extensão dos danos, dos tipos das células afetadas e os efeitos da variação de dose.

Muito embora os dados *in vivo* e *in vitro* não sejam diretamente comparáveis. O uso de culturas organotípicas de hipocampo foi de grande valia e complementar aos achados comportamentais; ainda que existam questões conflitantes, como a ausência de dano causado pela CTX, que serão discutidos especificamente adiante.

Experimentos 1 e 2

Há poucos estudos na literatura correlacionando o envenenamento crotálico com danos no sistema nervoso central, entre eles os que envolvem toxinas purificadas da peçonha bruta, como a crotoxina. Inicialmente atribuiu-se a esta toxina alterações morfológicas na junção neuromuscular, apenas (Gopalakrishnakone e Hawgood, 1979).

Os resultados do Experimento 1 mostraram que a peçonha de *Cdt* aumenta a morte neuronal em culturas organotípicas de hipocampo de ratos. Por outro lado, no Experimento 2, a crotoxina não promoveu marcado aumento do dano neuronal. Em outras palavras, nas doses utilizadas nestes experimentos, a peçonha bruta de *Cdt* promoveu morte de neurônios, mas a responsável direta por isso não parece ser a crotoxina.

Nas concentrações mais altas, a peçonha bruta induziu marcado aumento da fluorescência do PI em todas as áreas do hipocampo, entretanto, nas concentrações mais baixas as fotomicrografias evidenciaram maior morte neuronal na camada CA1. Estes dados são informativos de que há certa seletividade do veneno por tipo particular de célula.

As diferentes áreas do hipocampo possuem papéis diferentes (Amaral *et al.*, 1991). As células piramidais dos sub-campos CA3 e CA1 expressam diferentes tipos de canais iônicos (e também metabotrópicos) e receptores para diferentes neurotransmissores. Então, possivelmente as diferenças entre os tipos celulares estão ligados às diferenças no perfil de morte neuronal de forma seletiva induzida pela peçonha bruta da cascavel sul-americana.

Receptores do tipo AMPA ocorrem em praticamente todas as sinapses excitatórias do hipocampo (Ozawa *et al.*, 1998). O subcampo CA1 expressa quase a totalidade dos subtipos de receptores AMPA, ao passo que a camada CA3 expressa somente poucos subtipos deste receptor. Por outro lado, os outros tipos de receptores ionotrópicos não-NMDA de glutamato, os receptores de cainato, são expressos em sua maioria nas fibras musgosas das células piramidais de CA3 (Huettnner, 2001; Schimitz *et al.*, 2001; Contractor *et al.*, 2003).

Muito embora a CTX não tenha promovido morte neuronal nestes experimentos, Lomeo *et al.* (2014) apontaram que esta toxina promove liberação de L-glutamato nas fendas sinápticas de culturas de células corticais e esta liberação é dependente da atividade de PLA₂ da CTX. Além do mais, os autores demonstraram que a fração CB da CTX é internalizada nos neurônios

de forma independente da fração CA e de canais de Cálcio. Então, é possível que de certa forma a CTX atue como um coadjuvante nos mecanismos que levam a morte celular no hipocampo, alterando o balanço de neurotransmissores na região afetada levando, por exemplo, às crises epileptiformes seguidas da administração de CTX intrahipocampal descritas por Mello e Cavalheiro (1989) e relatadas no apêndice I deste trabalho.

Neste sentido é intrigante a ausência de danos neuronais frente a incubação de CTX em culturas organotípicas de hipocampo e quando a administração da CTX foi sistêmica (capítulo 1). É interessante notar que diferentemente de quando a CTX foi inoculada sistemicamente nos ratos, neste experimento a toxina foi incubada diretamente à cultura; portanto, exclui-se possíveis ações protetoras da barreira hematoencefálica. Parece mais pertinente que o dano só seja causado pela CTX quando a quantidade que desta toxina que atinge o sistema nervoso central ultrapasse certa dose. Para esta finalidade, um experimento envolvendo incubação de doses ainda maiores de CTX em culturas organotípicas de hipocampo seria necessário. Além disso, outra hipótese pode ser aventada frente ausência de dano neuronal no Experimento 2: os outros grupos de toxinas da peçonha de *Cdt* além da CTX podem atuar de forma sinérgica no dano aos neurônios das culturas organotípicas de hipocampo de ratos

Ademais, é importante ter em mente as características bioquímicas da crotoxina. A CTX é um complexo heterodimérico não-covalente composta por uma fração CA com atividade fosfolipídica, que quando isolada tem ação pouco tóxica, e uma fração CB ácida, que não é tóxica quando isolada. A interação

entre estas duas frações confere alta toxicidade à CTX, promovendo danos à junção neuromuscular e outras culturas que não de neurônios (Hendon e Fraenkel-Conrat, 1971; Marlas e Bon, 1982; Radvanyi e Bon, 1982).

Experimento 3

O soro anticrotático foi eficiente em prevenir os danos neuronais induzidos pelo veneno nas culturas de hipocampo. Os resultados mostraram que em ambas as concentrações de veneno utilizadas neste experimento, o soro anticrotático promoveu redução, ainda que parcial, da intensidade de fluorescência de PI, sugestiva de morte neuronal, mesmo quando aplicado 4 horas após o veneno.

Num estudo *In vivo* realizado anteriormente por de-Carvalho (2010) os resultados mostraram que mesmo quando aplicado 24h após a peçonha, o soro preveniu prejuízos de memória espacial em ratos. Respeitadas as diferenças em relação ao presente conjunto de experimentos desenvolvidos *in vitro*, os resultados são congruentes e confirmam que o soro anticrotático previne danos ao sistema nervoso central, mesmo quando aplicado certo tempo após o envenenamento.

No Experimento 1 observou-se marcado aumento de fluorescência no sub-campo CA1 já nas quatro primeiras horas depois da incubação da peçonha. Diferentemente, o sub-campo CA3 e o giro denteado exibem aumento contínuo da intensidade de fluorescência a partir das duas primeiras

horas de incubação. Esta diferença do perfil de morte neuronal nos diferentes subcampos pode ter origem nas características das células de cada um dos subcampos do hipocampo, mas também nos mecanismos fisiopatológicos da peçonha de cascavel. Isto é, a ação durante um envenenamento parece gerar um efeito cascata e de retroalimentação, provavelmente envolvendo liberação do glutamato ao meio extracelular.

Tanto os resultados comportamentais, da avaliação da neurotoxicidade da peçonha bruta em culturas de hipocampo e avaliação da neuroproteção do soro permitem apontar que haja um período crítico para a produção de efeitos centrais por esta peçonha, o que já podia ser inferido pelos testes de biodistribuição da crotoxina de Cardi et al. (1998). Esses autores demonstraram que havia fixação do veneno no cérebro de animais somente após 10 horas do envenenamento.

Neste sentido, os resultados do experimento 3 envolvendo a incubação do soro anticrotálico demonstra que a “prevenção” da morte celular pelo soro parece seguir uma seletividade em relação ao CA1. Parece ter havido um aumento de dano seletivo no CA3 quando o soro anticrotálico foi incubado 4 horas após o veneno. Em 2010, de-Carvalho mostrou que a administração intraperitoneal de veneno levou a dano preferencial no sub-campo CA3.

Outras hipóteses possíveis sobre a seletividade da proteção do soro em relação ao CA1 incluem (1) o próprio curso temporal do envenenamento; isto é, o tempo necessário para que a cascata de eventos que seguem o envenenamento leve a lesão nas estruturas citadas ou (2) pelo processo de neutralização da peçonha degradar o sítio ativo das toxinas que se ligam nas

células de CA1 Apesar deste conjunto de experimentos não ter fornecido subsídios para que os mecanismos adjacentes ao dano neuronal no hipocampo pela peçonha bruta de *Cdt* fossem revelados; o perfil de dano sugere que as diferenças entre as sensibilidades dos diferentes subcampos do hipocampo estejam relacionados com a participação de alguns receptores específicos que se distribuem diferentemente entre os neurônios hipocampais. Haja visto que existem relatos que a peçonha de *Cdt* e suas toxinas promovem liberações excessivas de L-glutamato nas fendas sinápticas que potencialmente podem gerar lesões excitotóxicas aliado ao conjunto de resultados aqui expostos; o capítulo 3 é uma tentativa de iniciar a resolução dos mecanismos fisiopatológicos adjacentes a ação da peçonha de *Cdt*.

Conclusão

Os resultados do presente conjunto de experimentos permitem concluir que a peçonha bruta da cascavel Sul-Americana induz a morte de neurônios em culturas organotípicas de hipocampo. Ademais, em doses pequenas (0,05ug/mL) a peçonha mostrou seletividade para o subcampo CA1 do hipocampo. Estes mesmos efeitos não foram produzidos pela crotoxina. O soro anticrotálico foi capaz de neutralizar a ação tóxica da peçonha sobre os neurônios de diferentes regiões do hipocampo quando administrado até uma hora após a incubação do veneno e foi capaz de prevenir, ainda que parcialmente, a morte neuronal no sub-campo CA1 quando administrado 4

horas após a incubação com peçonha. Estes resultados mostram que envenenamento crotálico leva a perdas neuronais no sistema nervoso central e que o soro minimiza essas perdas de forma dependente do tempo de sua aplicação após o envenenamento.

Além disso, este estudo fornece dados experimentais que permitem tecer algumas hipóteses sobre os mecanismos adjacentes aos danos neuronais produzidos pela peçonha de *Cdt* as quais levaram ao desenho experimental do capítulo 3.

CAPÍTULO III

**A morte neuronal em culturas organotípicas de hipocampo de ratos pela
peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* envolve receptores de L-
glutamato? Um estudo preliminar**

O capítulo que se segue tenta reunir elementos para avaliar, preliminarmente os mecanismos que levam a perda de neurônios frente ao envenenamento crotálico experimental. Culturas organotípicas de hipocampo foram expostas ao veneno de Cdt concomitantemente a aplicação de 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzoquinoxalina-2,3-diona (NBQX), um antagonista seletivo para receptores AMPA, a fim de avaliar se a perda neuronal tem relação com a estimulação desse receptor. Uma vez que o NBQX previna, ainda que parcialmente, a perda de neurônios nas culturas organotípicas de hipocampo isto seria indicativo da participação do L-glutamato na cascata de eventos que culminam na morte destes neurônios.

Receptores AMPA, NBQX e hipocampo

A maioria das sinapses excitatórias no cérebro é mediada por receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropinóico) (Dingledine *et al.*, 1999; Traynelis *et al.*, 2010; Nakagawa, 2010). Os receptores AMPA são subtipos de canais iônicos para glutamato cuja função tem sido amplamente relacionada a plasticidade sináptica. Os receptores AMPA estão afetados numa série de patologias; seu mau funcionamento promove a morte neuronal em diferentes estruturas do sistema nervoso (ver Nakagawa, 2010 para revisão). Além disso, a desmielinização de neurônios do hipocampo está ligada a redução da expressão de receptores AMPA (Dutta *et al.*, 2013).

A distribuição de receptores AMPA no hipocampo é variada. Embora existam diferentes isoformas específicas nas sub-regiões do hipocampo, os receptores AMPA se distribuem tanto nas células piramidais do sub-campo CA1 quanto no sub-campo CA3. Além disso, grande parte dos interneurônios do hipocampo expressa algum subtipo de receptor AMPA (Andersen *et al.*, 2007).

Os receptores AMPA, sobretudo os do subtipo GluR1 e GluR2, participam ativamente do processo de LTP (Jensen *et al.*, 2003) e contribuem na formação da memória operacional espacial em ratos (Zamanillo *et al.*, 1999).

O glutamato parece desempenhar papéis críticos na cascada de eventos relacionados a insultos que levam a perda de células hipocampais. Danos causados por hipóxia (Kohmura *et al.*, 1991; Koku *et al.*, 1993), isquemia (Johansen *et al.*, 1994), e hipertermia e hipotermia (Mitani e Kataoka, 1991), envolvem mecanismos fisiopatológicos relacionados a liberação de glutamato. Não surpreende, portanto, que vários autores têm relatado neuroproteção, tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*, por antagonistas glutamatérgicos após esses tipos de insultos.

Klimaviciusa *et al.* (2008) testaram os efeitos de baixas doses de antagonistas glutamatérgicos, tanto de AMPA (NBQX) quanto de NMDA (ifenprodil e MK-801), sobre o desenvolvimento e sobrevivência de culturas de células granulares de cerebelo. Os autores concluíram que os receptores de glutamato têm papel fundamental no desenvolvimento e manutenção deste tipo celular.

Denes *et al.* (2006) relataram que o talampanel, um antagonista AMPA, atenua os efeitos da caspase-3, um sinalizador de apoptose, no cérebro de camundongos após isquemia focal.

Gerace *et al.* (2014) relataram a ocorrência de neuroproteção seletiva de neurônios do CA1 pelo NBQX, após insulto causado por MNNG (*N-Metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina*) em culturas organotípicas de hipocampo de ratos.

O NBQX foi inicialmente utilizado como droga anticonvulsivante experimental (Chapman *et al.*, 1991). Hoje, ele é utilizado com sucesso em diversos experimentos que avaliam o papel de receptores AMPA em mecanismos fisiopatológicos.

O presente experimento é uma tentativa preliminar de avaliar os mecanismos subjacentes a morte celular após a administração de doses baixas de veneno de *Cdt*, em culturas organotípicas de hipocampo.

Justificativa

Danos seletivos no sub-campo CA1, mas não no CA3, ocasionados pela incubação de culturas organotípicas de hipocampo com 0,05 µg/mL de veneno bruto de cascavel e a proteção específica do CA1 pelo soro anticrotálico administrado 4 horas após a incubação com a peçonha (Capítulo 2), sugerem que os mecanismos do dano neuronal estejam ligados a ativação de canais iônicos presentes nas células piramidais do sub-campo CA1, mas não nas células piramidais do sub-campo CA3.

A hipótese inicial do presente estudo é que os mecanismos que levam à morte celular após aplicação de veneno nas culturas organotípicas de hipocampo estejam relacionadas a ativação de uma cascata de eventos que envolve a ativação de receptores de AMPA, de glutamato. Essa hipótese foi avaliada por meio da aplicação de veneno em culturas organotípicas de hipocampo em dose que leva a morte celular no sub-campo CA1, e da aplicação de um antagonista de receptor do tipo AMPA, o NBQX. Se houver relação entre a ativação de receptores do tipo AMPA e a morte celular, espera-se que haja proteção da morte celular pelo NBQX.

Materiais e Métodos

A obtenção do veneno, a preparação das culturas organotípicas de hipocampo e a análise da toxicidade e morte neuronal envolveram exatamente os mesmos procedimentos descritos no capítulo anterior.

Constituição dos grupos experimentais e desenho experimental

Estes experimentos foram realizados em duplicata, sendo que em cada um dos grupos experimentais foram incluídas pelo menos 7 secções de hipocampo, para cada um dos sets experimentais.

Os grupos experimentais deste experimento foram formados por um grupo controle (Grupo Control), que não recebeu tratamento algum, um grupo incubado apenas com 0,5 µg/mL de peçonha bruta de *Cdt* (Grupo 0,5µg/mL - venom), que serviu de controle positivo, um grupo incubado com 0,5 µg/mL da peçonha bruta e 10 µM de NBQX (0,5 µg/mL + NBQX) e, para testar o papel dos receptores AMPA de glutamato no sub-campo CA3, um grupo foi incubado com 0,5 µg/mL de peçonha bruta e, 4 horas depois, foi incubado com soro anticrotálico e NBQX (0,5 µg/mL + NBQX + Soro), haja vista que os resultados do experimento 3 do capítulo 2, mostrou que a associação do soro após 4 horas da incubação da peçonha protege parcialmente CA1, porém não CA3. Como as imagens de fluorescência são obtidas após 24 horas esta relação de aplicação tanto do soro quanto do NBQX após 4 horas forneceria dados que permitiriam associar a não proteção de CA3 pelo soro pela ação do L-glutamato.

Um resumo do desenho experimental pode ser visualizado na Figura 18.

Figura 18- Esquema representando os intervalos de obtenção de imagens ao microscópio de fluorescência das culturas tratadas no experimento. Da preparação e isolamento dos cortes de hipocampo seguiu-se 14 dias em incubadora. Subsequentemente, foram incubados a peçonha ao controle positivo, a peçonha e o NBQX ao grupo

0,5 µg/mL + NBQX e somente a peçonha bruta ao grupo **0,5 µg/mL + NBQX + Soro**. Após 4 horas seguiu-se com a incubação tanto do NBQX quanto do soro ao grupo grupo **0,5 µg/mL + NBQX + Soro**. As imagens de fluorescência foram obtidas 24 horas após a apresentação da peçonha.

A análise estatística seguiu a mesma metodologia apresentada no capítulo 2.

Resultados

A figura 19 contém as fotomicrografias que exemplificam as imagens obtidas sob o microscópio de fluorescência para cada um dos grupos.

Figura 19 - Fotomicrografias de culturas organotípicas de hipocampo obtidas após 24 horas da incubação com peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*. Note que no grupo que recebeu apenas NBQX existe certa intensidade de fluorescência na região de CA3, ao passo que no grupo tratado com o soro anticrotálico e com o NBQX a marcação de CA3 está ainda mais evidente.

Note nas fotomicrografias que tanto no grupo que recebeu apenas a peçonha e o NBQX (0,5 µg/mL + NBQX), quanto no que recebeu o tratamento com o soro (0,5 µg/mL + NBQX + Soro) existe um aumento na intensidade de fluorescência do PI em CA3 em relação ao grupo controle; o que não ocorre em CA1.

A percentagem de fluorescência nos sub-campos CA1, CA3 e giro denteado relativa ao controle negativo, em função dos diferentes tratamentos, é apresentada na Figura 20.

Figura 20 – Percentagem relativa(+ E.P.M.) de fluorescência (em relação ao controle negativo) gerada em das culturas incubadas com 0,5µg/mL do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* e tratadas com NBQX imediatamente após aplicação da peçonha ou com NBQX e Soro anticrotálico após 4 horas da apresentação da peçonha. A linha observada acima representa os grupos que diferiram significativamente do grupo controle de forma global ($p < 0,05$);

A ANOVA revelou efeito significativo em relação ao fator grupo ($F(3,242) = 24,53$; $p < 0,0001$) e em relação ao fator subcampo ($F(2,113) = 5,29$; $p < 0,009$). Além disso, a ANOVA revelou diferenças significantes na interação entre Subcampo e Grupo ($F(2,113) = 2,51$; $p < 0,036$), indicando que a intensidade de fluorescência foi diferente para cada um dos subcampos do hipocampo e também após os diferentes tratamentos aplicados às culturas organotípicas.

A análise post-hoc de Tukey HSD relativa ao sub-campo CA3 mostrou que o grupo 0,5µg/mL + NBQX exibiu maior intensidade de fluorescência em relação ao grupo controle ($p < 0,045$), sugerindo que o NBQX não previne danos à esta região. Além disso, a intensidade de fluorescência do PI do subcampo CA3 do grupo 0,5µg/mL + NBQX diferiu do subcampo CA1 ($p < 0,0497$), indicando a proteção, por parte do NBQX, do subcampo CA1 (camada de células que contém na maioria receptores de L-glutamato para AMPA).

No grupo 0,5µg/mL + Soro 4 hrs + NBQX as intensidades de fluorescência tanto do subcampo CA3, quanto CA1 diferiram da exibidas pelo grupo controle, sugerindo o aumento do dano destas células. Entretanto, na análise intrasujeito verifica-se que os resultados do subcampo CA3 diferem do subcampo CA1 ($p < 0,0318$), o que denota que houve uma proteção, ainda que parcial, da camada de células de CA1.

Discussão

O resultado mais relevante neste experimento foi o fato do NBQX incubado concomitantemente com a peçonha de Cdt promover a proteção por completo do dano na camada de neurônios de CA1 e parcialmente na camada de CA3. Este dado é sugestivo da participação do L-glutamato na cascata de eventos que levam à morte neuronal subsequente a incubação da peçonha de Cdt. Ainda neste mérito, os resultados sugerem a participação **não exclusiva** de receptores AMPA neste processo. Isto é, apesar da inibição seletiva de receptores AMPA terem prevenido a lesão em CA1; o dano foi apenas

prevenido parcialmente em CA3, o que sugere o envolvimento de outros mecanismos de lesão e também não são excluídas a participação de outros receptores de glutamato, como os de cainato e NMDA.

Muito embora, os dados apresentados no capítulo 2 demonstrem a ausência de lesão provocada pela crotoxina, é possível que esta toxina desempenhe certo papel nos mecanismos que levam a lesão hipocampal pela peçonha bruta. Em estudo recente Lomeo *et al.* (2014) concluíram que a crotoxina do veneno de *Cdt* promovia a liberação de glutamato em sinaptosomos em culturas de células corticais de forma dependente de Ca^{2+} .

O mecanismo que Lomeo *et al.* (2014) propuseram para explicar o efeito da crotoxina em neurônios está resumido na Figura 21. Os autores concluíram que a porção CB, presumidamente atóxica, é internalizada no neurônio pré-sináptico de forma independente de Ca^{2+} e da porção CA da CTX. Esta internalização contribui de uma maneira ainda incerta para a liberação de L-glutamato na fenda sináptica.

Apesar da crotoxina não promover aumento no dano neuronal, conforme observado no capítulo 2, sua ação sinérgica com outros componentes da peçonha bruta não foi descartada. Logo, o envolvimento da crotoxina na liberação de glutamato na fenda sináptica é consoante aos dados encontrados nos experimentos aqui descritos. Isto é, de uma maneira que não está clara, a CTX ou uma de suas frações, quando internalizada, promoveria o aumento da liberação de L-glutamato no meio extracelular promovendo uma cascata de lesão excitotóxica. Note que segundo os experimento de Lomeo *et al.* (2014) é a fração CB que promove o aumento da liberação do glutamato na fenda

sináptica e esta fração CB isolada não tem ação tóxica sobre as células conforme conhecido desde os ensaios de purificação da CTX por Hendon e Fraenkel-Conrat em 1971.

A neuroproteção observada pela ação do NBQX no presente estudo favorece a hipótese da participação do glutamato na cascata de eventos que culminam em morte neuronal em culturas organotípicas de hipocampo incubadas com veneno bruto da cascavel sul-americana.

Figura 21 – A porção CB da crotoxina é internalizada pelo neurônio pré-sináptico, esta internalização não é dependente da porção CA. De uma maneira que ainda não está clara, a porção CB da crotoxina já dentro da célula sinaliza a abertura de canais N e P/Q de Ca^{2+} . Esta abertura destes canais culminaria na liberação de L-glutamato na fenda sináptica. Retirado de Lomeo et al. (2014).

Os resultados descritos no capítulo 2 mostraram que a peçonha bruta de *Cdt* em doses baixas resulta em dano seletivo no CA1, o que é coerente com a noção de que a seletividade esteja relacionada com o perfil de receptores predominantes em CA1, CA3 e DG. Conforme discutido no capítulo 2, a distribuição de receptores de NMDA e de cainato nessas regiões nervosas é distinta. De fato, acidentes vasculares e efeitos de diversas neurotoxinas envolvem lesão excitotóxica mediada por estes receptores (Nvue *et al.*, 2004).

Kristensen *et al.* (2001), utilizando culturas organotípicas de hipocampo, compararam o perfil de lesões promovidas por fármacos com atividade em receptores de glutamato. Enquanto o ácido caínico, em concentrações de 8 μ M, promoveu lesão seletiva no subcampo CA3, os agonistas de AMPA (ATPA, 30 μ M, e AMPA, 3 μ M) promoveram dano seletivo em CA1.

Como mostra a Figura 20, o NBQX previne completamente a lesão em CA1 quando incubado concomitantemente a peçonha bruta. Os dados referentes a incubação juntamente com o soro após 4 horas se mostraram extremamente semelhantes aos dados da incubação da peçonha e somente o soro anticrotático descrito no capítulo 2. Isto é, foi prevenido parcialmente o dano apenas em CA1.

Portanto, tanto os resultados descritos no capítulo 2 quanto os resultados apresentados pelo grupo 0,5 μ g/mL + NBQX, em comparação com o grupo 0,5 μ g/mL, no presente estudo, não conflitam com interpretações que favorecem o envolvimento de lesão excitotóxica mediada por glutamato para explicar os efeitos da incubação das culturas com peçonha bruta de *Cdt*. Em outras palavras, a cascata de eventos que culmina em lesão do CA1 parece, parcialmente, ser mediada por receptores AMPA. Por outro lado, a participação de receptores de cainato e de NMDA não podem ser descartadas pelo presente conjunto de experimentos.

Os resultados da administração do soro anticrotático e de NBQX 4 horas após o veneno reiteraram que a porção do veneno que promove dano a CA1 é neutralizada pelo soro mesmo após 4 horas da incubação da peçonha. Ou seja, o NBQX não promoveu alterações perceptíveis em tal condição quando

comparado com os resultados da avaliação da neuroproteção pelo soro no capítulo 2. Além disso, o dano ocasionado em CA3 não parece ser na totalidade mediado por receptores AMPA, pois mesmo quando o NBQX foi incubado concomitantemente a peçonha (0,5 µg/mL + NBQX) o subcampo CA3 exibiu aumento na intensidade de fluorescência. De fato, como o NBQX é uma droga antagonista específica para receptores AMPA e as células de CA3 expressam em sua maioria receptores de cainato, esse resultado era de certa forma esperado.

No conjunto, esses resultados indicam a ocorrência de uma ação sinérgica entre diferentes componentes da peçonha crotálica na indução de morte neuronal. Por outro lado, o efeito preventivo do soro, mesmo quando administrado tardiamente, associado a proteção seletiva do CA1 (ver Capítulo 2 e resultados do presente capítulo), carece de investigações futuras para se identificar seus mecanismos de ação.

Conclusão

Ainda que de forma preliminar, os resultados do presente capítulo permitem concluir que o L-glutamato parece exercer papel fundamental na cascata de eventos que sucedem o envenenamento crotálico. Muito embora os resultados não permitam afirmar com clareza quais os receptores participam do dano neuronal induzido por veneno crotálico, a proteção de CA1 pelo NBQX

favorece a interpretação de que os receptores AMPA participam desse processo. Os danos observados em CA3 em doses maiores do veneno e quando o soro é administrado tardiamente parecem refletir a participação de outros tipos de receptores, por exemplo, NMDA e de cainato.

A utilização de antagonistas específicos para receptores de NMDA e de cainato permitirá avaliar mais amiúde os mecanismos de indução de morte celular gerados pelo veneno de *Cdt* no hipocampo de rato.

Discussão e Conclusão geral

Os achados comportamentais do presente estudo e de experimentos anteriores apontam que os prejuízos de memória espacial ratos Wistar, quando da administração sistêmica do veneno de *Cdt*, decorre de sua ação sobre o sistema nervoso central, sobretudo, o hipocampo.

Assim, é possível admitir, pelo menos hipoteticamente, que uma ou mais toxinas ou compostos bioativos da peçonha de *Cdt* que cruzam a barreira hematoencefálica e ocasionam lesões.

Historicamente, havia dúvidas sobre a existência de componentes do veneno crotálico capazes de cruzar a barreira hematoencefálica. Recentemente, surgiram sugestões de que a gioxina aumenta a permeabilidade da BHE de ratos, facilitando a passagem de outras toxinas para

o sistema nervoso central, que atuariam de forma sinérgica e, assim, ocasionando lesões (Alves da Silva *et al.*, 2010).

No presente conjunto de experimentos a inoculação de veneno e de crotoxina *in vivo* foi realizada por via sistêmica e por via intrahipocampal, e a inoculação de veneno e de crotoxina *in vitro* foi realizada diretamente no meio de cultura. Os resultados mostraram que: 1) a peçonha induz prejuízos de memória espacial em tarefas dependentes da integridade hipocampal tanto nas inoculações sistêmicas e intrahipocampais; 2) a crotoxina só produz os mesmos prejuízos comportamentais quando inoculada intrahipocampalmente em ratos; 3) a peçonha bruta de Cdt promove dano às células do hipocampo em culturas organotípicas; 4) em baixas concentrações, a peçonha, tem ação seletiva para CA1; 5) a crotoxina não promove dano análogo em culturas organotípicas de hipocampo; 6) o soro anticrotálico brasileiro é eficaz em prevenir a perda de neurônios nas culturas organotípicas de hipocampo de forma dependente do tempo, isto é, quanto mais próximo do tempo de apresentação do soro maior é a proteção e, finalmente, 7) o mecanismo de ação da peçonha bruta no sistema nervoso central parece envolver a liberação exacerbada de L-glutamato no meio extracelular, promovendo lesões excitotóxicas.

A crotoxina e a giroxina são os grandes grupos de toxinas do veneno da cascavel Sul-Americana que possuem evidências descritas de ação comportamental e sobre o sistema nervoso central em decorrência de inoculação sistêmica (Moreira *et al.*, 1996, 1997 e 2000; Torrent *et al.*, 2007). Na hipótese de que a crotoxina cruze a BHE ou que pelo menos que as PLA2,

presentes em abundância nesta toxina, o faça, é possível que esta comprometa em maior ou menor grau as membranas de neurônios ocasionando, além da lesão da célula propriamente dita, o aumento do influxo de íons do ambiente extracelular para o interior da célula (Bennet *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2002).

As PLA2 do veneno de serpentes da espécie *Crotalus durissus* parecem ter ainda íntimo relacionamento com a presença de íons Ca^{2+} e seus receptores. Uma das PLA2 (Cdcum6) da serpente *Crotalus durissus cumanensis*, por exemplo, parece requerer a presença de Ca^{2+} para que sua atividade seja plena (Pereañez *et al.*, 2009). Algumas das PLA2 de *Cdt* parecem ter este tipo de relação com o íon (Toyama *et al.*, 2005)

Ademais, algumas propostas de ação da crotoxina permitem a inferência da ação desta sobre o sistema nervoso central. Em uma interessante revisão Sampaio *et al.* (2010) listam novas atividades descritas pelo efeito da crotoxina. Apesar da discussão dos autores não enfocar as ações centrais do envenenamento e sim periféricas, será utilizado um modelo retirado deste artigo para ilustrar a associação da crotoxina, PLA2 e íons Ca^{2+} .

A figura 22 demonstra um esquema simplificado da interação e dos processos subsequentes iniciados pela crotoxina em nível celular. Note que a via sinalizada em verde demonstra a internalização da crotoxina via endocitose ou a atuação das PLA2 hidrolisando os fosfolípedes de membrana; a via sinalizada em azul é consequência direta dessa hidrólise e representa a atuação dos íons Ca^{2+} ; e a via em vermelho é consequência da internalização da crotoxina e suas ações sobre a exocitose.

Figura 22 – Representação esquemática das ações da crotoxina em nível celular, adaptado de Sampaio e cols. (2010).

Note que há basicamente três mecanismos possíveis de ação da crotoxina. A primeira é a toxina ser internalizada pela célula, a partir daí a toxina degradaria as vesículas sinápticas pela própria característica de hidrólise de membranas deste componente. Nessa mesma via de ação a crotoxina poderia degradar proteínas que participam da exocitose e liberação das vesículas na sinapse. O segundo mecanismo seria a degradação dos fosfolípidos da membrana plasmática, por si essa alteração é capaz de provocar lesões; a terceira ação decorre da nova condição de incompetência na seletividade de íons por parte da membrana que sofreu lise em seus fosfolípidos. O aumento de permeabilidade aos íons presentes no meio extracelular, sobretudo íons Ca^{2+} , é altamente prejudicial à célula. O Ca^{2+} sinaliza grande parte de processos celulares, inclusive os que induzem apoptose. Além disso, este íon é mediador da liberação de ACh (e de outros

neurotransmissores) e mais, o processo de atuação das PLA2 que foram internalizadas é novamente alimentado, pois a ação tóxica desta substância depende de Ca^{2+} .

Entretanto, os experimentos do capítulo 1, utilizando a inoculação sistêmica de crotoxina, e os do capítulo 2 que se valeram da incubação de crotoxina purificada em culturas organotípicas de hipocampo permitem concluir que a crotoxina, isoladamente, não é a responsável primária pelos danos neuronais no hipocampo sejam eles provenientes da inoculação sistêmica do veneno ou de análise *in vitro*.

A giroxina poderia participar ativamente da lesão de células hipocampais e de outras células. No entanto, as lesões encontradas por Torrent et al. (2007) pela inoculação sistêmica desta toxina em ratos neonatos parece estar envolvidas com estágio de maturação de neurônios e formação da rede sináptica. A hipótese de que a giroxina seria responsável por danos neuronais do envenenamento crotálico não foi testada e, portanto, permanece sem conclusão.

Esta visão de separação das ações das toxinas em diferentes efeitos tóxicos para o sistema nervoso central parece não satisfazer os mecanismos fisiopatológicos envolvidos; isto é, aparentemente é a ação em conjunto das toxinas dos venenos animais que confere sua toxicidade. À luz da biologia evolutiva, a hipótese de integração bioquímica e tóxica dos componentes da peçonha de *Cdt* parece pertinente. Isto é, ao longo da escala evolutiva e adaptativa conferiu-se grande valor adaptativo manter 4 grupos bioquímicos distintos dentro de uma mesma peçonha.

Os testes *in vitro* permitiram alcançar avanços significativos acerca dos mecanismos fisiopatológicos do envenenamento crotálico. A utilização de culturas organotípicas para avaliação neurotoxicológica de venenos animais tem sido utilizada com sucesso. Isso se deve a facilidade e versatilidade da técnica.

Além disso, os venenos animais podem servir de ferramentas farmacológicas em diversos estudos. Por exemplo, as toxinas muscarínicas presentes no veneno das serpentes mamba (*Dendroaspis sp.*) tem sido utilizadas *in vitro* e *in vivo* como ferramenta para estudo da participação de receptores muscarínicos na formação de memória e LTP (Sánchez *et al.*, 2009).

Ademais, os venenos de diferentes escorpiões como o *Centruroides margaritatus* tem ação sobre canais específicos de potássio. A ação de uma das toxinas do veneno deste escorpião, a margatoxina, quando incubada em doses sub-tóxicas em culturas de estriado dorsal e de hipocampo, promoveu aumento da expressão de proteína c-fos e mRNA (Saria *et al.*, 2000).

Portanto, o completo entendimento das ações do veneno de *Cdt* em culturas organotípicas de hipocampo pode futuramente fornecer dados valiosos acerca do funcionamento e do papel das células piramidais de CA1, receptores AMPA e do glutamato na formação e manutenção de novas memórias.

Análises *in vivo* revelam que receptores de glutamato são cruciais para a formação manutenção e de memória espacial tanto operacional, como de referência (Sanderson *et al.*, 2010; Sanderson e Bannerman, 2012). Ademais,

a injeção sistêmica (Suárez *et al.*, 2012) ou intrahipocampal (Lu *et al.*, 2011) de ácido caínico geram alterações comportamentais importantes e prejuízos de memória espacial. Ambos os tipos de injeção (sistêmica ou intrahipocampal) de ácido cainico levam a morte neuronal (preferencialmente em CA3) e também a eventos epiléticos. Os prejuízos comportamentais ligados a tarefas dependentes da integridade do hipocampo são consistentes com os resultados *in vitro* do capítulo 3.

Outro ponto a ser considerado de forma geral é a importância para a saúde pública dos achados deste trabalho. Tanto por fomentar a discussão de efeitos não descritos do envenenamento crotálico, como sua ação central. Além disso, o soro se mostrou eficiente em prevenir e minimizar as lesões neuronais mesmo quando administrado de forma tardia em culturas organotípicas de hipocampo. Ressalte-se, porém, novamente a existência de eficiência dependente do tempo de administração após o envenenamento.

Tanto dos estudos comportamentais utilizando ratos Wistar, quanto dos testes utilizando técnicas de cultura organotípica provém dados que servem como modelo do envenenamento humano. Portanto, uma análise e acompanhamento das funções cognitivas de pacientes humanos que se envolveram em acidentes crotálicos poderiam fornecer novas perspectivas fisiopatológicas e de tratamento.

Considerações finais

Este trabalho permite uma série de desdobramentos e continuações. Talvez o mais evidente deles, neste momento, seria testar a incubação do veneno de *Cdt* em culturas organotípicas de hipocampo frente a antagonistas NMDA e de receptores de cainato. Além disso, testar a neurotoxicidade das outras toxinas presentes no veneno crotálico seria de extrema relevância.

Por outro lado, umas análises criteriosas dos aspectos cognitivos de pacientes humanos que sofreram acidentem crotálicos, forneceria dados úteis sobre a extensão do envenenamento. Isto é, se os pacientes humanos apresentassem déficits cognitivos, isto acarretaria em afirmar que a ação do veneno é análoga em animais de experimento e seres humanos. Tal achado seria de extrema importância para a saúde pública dos locais de ocorrência de *Crotalus durissus terrificus*.

Referências

- ALEXANDER G.; GROTHUSEN J.; ZEPEDA H.; SCHWARTZMAN R.J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v.26, n.10, p.953-960, 1988.
- AMARAL, C.F.S.; MAGALHÃES, R.A.; RESENDE, N.A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.33, p.251-255, 1991.
- AMARAL, D.G; DOLORFO, C; ALVAREZ-ROYO, P. Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. **Hippocampus**. v. 1. n.4. p. 415-35, 1991
- ANDERSEN, P; MORRIS, R; AMARAL, D; BLISS, T. The hippocampal formation. In. ANDERSEN, P; MORRIS, R; AMARAL, D; BLISS, T. O'KEEFE, J. (Eds), Oxford University. Oxford, 2007.
- ARAÚJO, H.P.; BOURGIGINO, S.C.; BOLLER, M.A.A.; DIAS, A.A.S.O.; LUCAS, E.P.R.; SANTOS I.C.; DELGADO, I.F. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: The national control laboratory experience between 2000 and 2006. **Toxicon**. v. 51, p. 502-514, 2008.
- ANANTH, C; GOPALAKRISHNAKONE, P; KAUR, C. Protective role of melatonin in domoic acid-induced neuronal damage in the hippocampus of adult rats. **Hippocampus**. v. 13. n. 3. p. 375-87, 2003.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M; HERING, S.E; CUPO, P. Acidente crotálico In: CARDOSO, J.L.C. FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H. MALAQUE, C.M.S. HADDAD-JÚNIOR, V. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier. São Paulo. 2ªed. 2009.
- BAHR, B.A. Long-term hippocampal slices: a model system for investigating synaptic mechanisms and pathologic processes. **J. Neurosc. Res**. v. 42.n.3. p. 294-305, 1995.
- BANCHER, W.; ROSA, R.R.; FURLANETO, R.S. Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervosos, renal, hepático e muscular de *Mus musculus* Linnaeus, 1758. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 37, p. 139-148, 1973.
- BARRAVIERA, B.; SARTORI, A.; SILVA, M. F. P. da; KANENO, R.; PERAÇOLI, M. T. S. Use of an ELISA assay to evaluate venom, antivenom, IgG and IgM human antibody levels in serum and cerebrospinal fluid from patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. v. 2, n. 1, p.14-27, 1996.

BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom, **Acta. Physiol. Latinoamer.** v. 11, p. 224, 1961.

BELL, K.A; O'RIORDAN, K.J; SWEATT, J.D; DINELEY, K.T. MAPK recruitment by beta-amyloid in organotypic hippocampal slice cultures depends on physical state and exposure time. **J. Neurochem.** v.91.n.2. p. 349-61, 2004.

BENNETT, C.F.; CHIANG,M.; LINGARDO, L.W.; WYATT,J.R. Sequence specific inhibition of human type II phospholipase A2 enzyme activity by phosphorothioate oligonucleotides. **Oxford Journals**, v.22, n.15, p.3202-3209, 1994.

BLAABJERG, M; KRISTENSEN, B.W; BONDE, C; ZIMMER, J. The metabotropic glutamate receptor agonist 1S,3R-ACPD stimulates and modulates NMDA receptor mediated excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. **Brain res.** v. 898. n. 1. p. 91-104. 2001.

BONI-MITAKE, M. COSTA, H. VASSILIEFF, V.S. ROGERO, J.R. Distribution of 125I-Labeled crotoxin in mice tissues. **Toxicon.** v, 48, p. 550-555, 2006.

BON, C; BOUCHIER, C; CHOUMET, V; FAURE, G; JIANG, M.S; LAMBEZAT, M.P; RADVANYI, F; SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.** v. 39. n. 4. p. 439-48, 1989.

BONDE, C; NORABERG, J; NOER, H; ZIMMER, J. Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slices. **Neuroscience.** v.136. n. 3. p. 779-94, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde .<http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao.pdf>. Acessado in 08/12/2014.

BUCHS, P.A; STOPPINI, L; MULLER, D. Structural modifications associated with synaptic development in area CA1 of rat hippocampal organotypic cultures. **Brain. Res. Dev. Brain res.** v. 71. n.1. p. 81-91, 1993.

CAMILLO, M.A; ARRUDA-PAES, P.C; TRONCONE, L.R; ROGERO, J.R. Gyroxin fails to modify in vitro release of labeled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. **Toxicon.** v.39. n. 6. p. 843-53, 2001

CARDI, B.A; ANDRADE, H.F; ROGERO, J.R; NASCIMENTO, N. Differential biodistribution of native and 2kgY 60Co irradiated crotoxin in tissues of CBA/J mice. **Nat. Toxins.** v. 6. n. 1, p. 19-25. 1998.

CHANG, C.C; LEE, J.D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom is a presynaptic toxin actin like a beta-bungarotoxin. **Naunym-Schmiedebergers Arch. Pharmacol.** v. 296. n. 2. p. 159-68, 1977.

CHIPAUX JP, GOYFFON M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**. V.36 n.6, p.823-846, 1998

CONRAD, C.D.; ROY, E.J. Selective loss of hippocampal granule cells following adrenalectomy: implications for spatial memory. **J Neurosci**. v.13. n.6. p.2582-90, 1993

CONTRACTOR, A; SAILER, A.W; DARSTEIN, M; MARON, C, XU J; SWANSON, G.T; HEINEMANN, S.F. Loss of kainite receptor-mediated heterosynaptic facilitation of mossy-fiber synapses in KA2-/- mice. **J Neurosci**. v.23. n.2. p. 422-9, 2003

CRAIN, S.M. Development of "organotypic" bioelectric activities in central nervous system tissues during maturation in culture. **Int. Rev. Neurobiol**. v.9. p. 1-43, 1966.

CUPO, P; AZEVEDO-MARQUES, M.M; HERING, S.E;. Acidente crotálico na infância: aspectos clínicos, laboratoriais, epidemiológicos e abordagem terapêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, n. 2, p. 87-96, 1991.

DA-SILVA, J.A.; OLIVEIRA, K.C.; CAMILLO, M.A.P.; Gyroxin increases blood-brain barrier permeability to Evans Blue dye mice. **Toxicon**. 2012.

DE CARVALHO, D. **Efeitos comportamentais do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e do soro antecrotálico em ratos Wistar**. São Paulo. 2010. 124p. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

DELL'ANNA E, CALZOLARI S, MOLINARI M, IUVONE L, CALIMICI R. Neonatal anoxia induced transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. **Behav Brain Res**. V.45.p. 125–134, 1991.

FAILI, A; RANDOM, J; FRANSISCHETTI, I.M; VARGAFITTING, B.B; HATMI, M. Convulxin-induced platelet aggregation is accompanied by a powerful activation of the phospholipase C pathway. **Biochem. J**. v. 298,p. 87-91, 1994.

FRAENKEL-CONRAT, H; SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys**. v.60. n.1. p. 64-73, 1956.

FRIELINGSDORF, H.; THAL, L.J.; PIZZO, D.P. The septohippocampal cholinergic system and spatial working memory in the Morris water maze. **Behav Brain Res**. v.168. n.1. p.37-46 2006

GÄHWILLER, B.H; CAPOGNA, M; DEBANNE, D; McKINGLEY, R.A; THOMPSON, S.M. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. **Trends Neurosci**. n. 20. v. 10. p. 471-7, 1997.

GERACE, E; MASI, A; RESTA, F; FELICI, R; LANDUCCI, E; MELLO, T; PELLEGRINI-GIAMPIETRO; MANAIONNI, G; MORONI, F. PARP-1 activation causes neuronal death in the hippocampal CA1 region by increasing the expression of Ca²⁺ permeable AMPA receptors. **Neurobiol. Dis.** v. 70. p. 43-52, 2014.

GERACE, E; SCARTABELLI, T; FORMENTINI, L; LANDUCCI, E; MORONI, F; CHIARUGI, A; PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E. Mild activation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is neuroprotective in rat hippocampal slice models of ischemic tolerance. **Eur J Neurosci.** v.36. n. 1. p. 1993-005, 2012.

GOPALAKRISHNAKRONE, P; HAWGOOD, B.J. Morphological changes in murine nerve, neuromuscular junction and skeletal muscle induced by the crotoxin complex (proceedings). **J. Physiol.** v.291. p.5-6, 1979.

GUTIERREZ, R; HEINEMANN, U. Synaptic reorganization in explanted cultures of rat hippocampus. **Brain res.** v. 815. n. 2. p. 304-16, 1999.

HARTMAN, R.E.T; LEE, J.M; ZIPFEL, G.J; WOZNIAK, D.F; Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. **Brain Research** v.1043. p. 48-56. 2005

HEACOCK, A.M; SCHONFELD, A.R; KATZMAN, R. Hippocampal neurotrophic factor: characterization and response to denervation. **Brain Res.** V.363. no.2. p. 299-306, 1986

HENDON, R.; FRANKEL-CONRAT, H. Biological Roles of the Two Components of Crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 7, p. 1560-1563,

HOLOPAINEN, I.E; JÄRVELÄ, J; LOPEZ-PICON, F.R; PELLINIEMI, L.J; KUKKO-LUKJANOV. Mechanisms of kainite-induced region-specific neuronal death in immature organotypic hippocampal slice cultures. **Neurochem Int.** v.45. n. 1. p. 1-10, 2004

HUETTNER, J.E. Kainate receptors: knocking out plasticity. **Trends Neurosci.** v. 24. n.7. p. 365-6, 2001

JARRARD, L.E. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. **Behavioral and Neural Biology**, 60, 9-26, 1993

JEON, H.; AI, J.; SABRI, M.; TARIQ, A.; MACDONALD, R.L. Learning deficits after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. **Neuroscience.** v.169. n.4. p. 1805-14, 2010

KINI, R.M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem. J.** v. 397, n.3, p.377-387, 2006.

KINI, R.M., 1997. Phospholipase A2—a complex multifunctional protein puzzle. In: Kini, R.M., (Ed.), **Enzymes: Structure, Function and Mechanism**, Wiley, Chichester, England, pp.1 –28.

KRISTENSEN, B.W; NORABERG, J; ZIMMER, J. Comparison of excitotoxic profiles of ATPA, AMPA, KA and NMDA in organotypic hippocampal slice cultures. **Brain Res.** v. 917. n. 1. p. 21-44, 2001.

LAGO, L.A., MARQUES JUNIOR, A.P., MELO, M.M. *et al.* Serological biochemical profile of bovines poisoned experimentally with free iodized crotoxic poison and iodized incorporated in liposomes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, no.5, p.653-657, 2004.

LINDNER, M.D.; BALCH, A.H.; VANDERMAELEN, C.P. Short forms of the "reference-" and "working-memory" Morris water maze for assessing age-related deficits. **Behav Neural Biol.** v.58. n.2. p.94-102. 1992

LOMEO, R.D.S; GONÇALVES, A.P; SILVA, C.N; DE-PAULA, A.T; COSTA-SANTOS, D.O; FORTES-DIAS, C.L; GOMES, D.A; DE-LIMA M.E. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. **Toxicon.** v. 85. p. 5-16, 2014

MAEDA, N; TAMIYA, N; PATTABHIRAMAN, T.R; RUSSEL F.E. Some chemical properties of the venom of the rattlesnake, *Crotalus viridis* h. **Toxicon.** v.16. n. 5, p. 431-41. 1978.

MARLAS G; BON, C. Relationship between the pharmacological action of crotoxin and its phospholipase activity. **Eur J Biochem.** v. 125. n.1 p. 157-65, 1982.

MARUYAMA, J; HAYASHI, H; MIAO, J; SAWADA, H; ARAKI, S. Severe cell fragmentation in the endothelial cell apoptosis induced by snake apoptosis toxin VAP1 is an apoptotic characteristic controlled by caspases. **Toxicon.** v. 46. n. 1, p.1-6, 2005.

MATAVEL, A.C; FERREIRA-ALVES, D.L; BEIRÃO, P.S; CRUZ, J.S. Tension generation and increase in voltage-activated Na⁺ current by crotamine. **Eur. J. Pharmacol.** v. 348. n. 2-3, p. 167-73. 1998.

MCMANUS, T; SADGROVE, M; PRONGLE, A.K; CHAD, J.E; SUNDSTROM, L.E. Intraischemic hypothermia reduces free radical production and protects against ischaemic insults in cultured hippocampal slices. **J. Neurochem.** v.91. n. 2. p. 327-336, 2004.

MELLO, L.E; CAVALHEIRO, E.A. Behavioural, electroencephalographic and neuropathological effects of the intrahippocampal injection of the venom of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon.** v. 27. n. 2, p. 189-99. 1989.

MELLO, L.E; PRADO-FRANCESCHI, J; GIGLIO, J.R; CAVALHEIRO, E.A. Convulxin does not induce convulsions when injected into the rat dorsal hippocampus. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.** v. 39. n. 4, p.353-8. 1989.

MEYER, M; JOHANSEN, J; GRAMSBERGEN, J.B; ZIMMER, J. Improved survival of embryonic porcine dopaminergic neurons in coculture with conditionally immortalized GDNF-producing hippocampal cell line. **Exp. Neurol.** v. 164. n. 1. p. 82-93, 2000.

MILANI, H.; UEMURA, U.U.; OLIVEIRA, R.M; LEPRI, E.R; XAVIER, G.F. Loss of CA1 cells following global ischaemia correlates with spatial deficits in the circular platform task. **J Neurosci Methods.** v.80. n.1. p.19-27, 1998

MINAMIZAWA, T; TSUCHIYA, T; ETO, H. The effects of ionizing radiation on the spontaneous and evoked brain electrical activity in rabbits. 2. The effects of x-rays on the hippocampal spontaneous electrical activity. **Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi.** v. 27. no. 9. p.1243-9, 1967

MONTEIRO, H.S; DA SILVA, I.M; MARTINS, A.M; FONTELES, M.C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 34. n. 10. p1347-52, 2001.

MOREIRA, E.G; NASCIMENTO, N; ROSA, G. J. M; ROGERO, J. R; VASSILIEF, V. F. Crotoxin-induced behavioral effects in rats. **Brazilian J. of med. and bio. Research.** v.29, n. 05, p. 629-632, 1996.

MOREIRA, E.G; NASCIMENTO, N; ROSA, G. J. M; ROGERO, J. R; VASSILIEF, V. F. Effect of gamma irradiation on the behavioral properties of crotoxin. **Brazilian J. med. bio. Research.** v.30, p. 245-249, 1997.

MOREIRA, E.G. NASCIMENTO N., ROSA G.J.M. ROGERO ., J.R; VASSILIEFF V.S., Gabaergic Benzodiazepine system is involved in the crotoxin-induced anxiogenic effect. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v65 , p. 7–13, 2000.

MORICE, E; BILLARD, J.M; DENIS, C; MATHIEU, F; BETANCUR, C; EPELBAUM, J; GIROS, B; NOSTEN-BERTRAND, M. Parallel loss of hippocampal LTD and cognitive flexibility in a genetic model of hypodopaminergia. **Neuropsychopharmacology.** v. 32. n. 10. p. 2108-16, 2007.

MORRIS, R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**, 12, 239-260, 1981.

MORRIS, R.G.M. **An attempt to dissociate "spatial-mapping" and "working-memory" theories of hippocampal function.** Em: W. Seifert (Ed), *Neurobiology of the Hippocampus.* Academic Press, London, p. 405-432, 1983.

NETTO C.A; HODGES, H; SINDEN J.D; LEPEILLET, E; KERSHAW, T; SOWINSKI, P; MELDRUM, B.S; GRAY, J.A; Effects of fetal hippocampal field grafts on ischemic-induced navigation in the water maze. **Neuroscience** V.54. p.69 –92. 1993

NOGUEIRA, R.M.B. **Aspecto clínico, hematológico, bioquímico e urinálise de cães intoxicados com veneno de “*Crotalus durissus terrificus*” família Crotalidae e tratados com soro antiofídico.** Botucatu, 2001, 174p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista.

NOGUEIRA, R. M. B.; SAKATE, M. Acidente crotálico em animais domésticos. **Revista Conselho federal de medicina veterinária** , v. 10, n. 31, 2004.

NORABERG, J; KRISTENSEN, B.W; ZIMMER, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. **Brain res. Protoc.** v. 3.n. 3. p 278-90, 1999.

NORABERG, J; POULSEN, F.R; BLAABJERG, M; KRISTENSEN, B.W; BONDE, C; MONTERO, M; MEYER, M. **Curr. Drug. Targets CNS Neurol. Disord.** v. 4. n. 4. p. 435-52, 2005.

NORABERG, J; ZIMMER, J. Ethanol induces MAP2 changes in organotypic hippocampal slice cultures. **Neuroreport.** v. 9. n. 14. p. 3177-82, 1998.

NUNN, J; HODGES, H; Cognitive deficits induced by global cerebral ischaemia: Relationship to brain damage and reversal by transplants. **Behav Brain Res.** V. 65. P. 1-3, 1994.

OGIURA, N. BONI-MITAKE, M. RÁDIS-BATISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide from south American rattlesnake. **Toxicon.** v, 43. p. 362-370, 2005.

O'KEEFE J.; NADEL, L. The Hippocampus as a Cognitive Map. **Oxford University Press**, 1978.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Research**, 34, 171-175, 1971.

OLIVEIRA, D.G., TOYAMA, M.H., NOVELLO, J.C, BERIAM, L.O., MARANGONI S. Structural and functional characterization of basic PLA2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **J Protein Chem.** v.21.n.3. p.161-8, 2002

OLSSON, T; CRONBERG, T; RYTTER, A; ASZTELY, F; FREDHOLM, B.B; SMITH, M.L; WIELOCH, T; Deletion of the adenosine A1 receptor gene does not alter neuronal damage following ischaemia in vivo or in vitro. **Eur. J. Neurosci.** v. 20. n. 5. p. 1197-204, 2004.

OLTON, D. S.; BECKER, J. T. AND HANDELMANN, G. E. Hippocampus, Space And Memory. **Behavioral and Brain Sciences**, 2, 313-365, 1979.

OZAWA, S; KAMIYA, H; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.** v.54. p.596-603, 1998

PEREAÑEZ, J.A.; NÚÑEZ, V.; HUANCAHUIRE-VEJA, S.; MARANGONI, S.; PONCE-SOTO, L.A. Biochemical and biological characterization of a PLA2 from crotoxin complex of *Crotalus durissus cumanensis*. **Toxicon**. v.53.n.5. p.534-42, 2009

PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E; PERUGINELLI, F; MELI, E; COZZI, A; ALBANI-TORREGROSSA, S; PELLICCIARI, R, MORONI, F. Protection with metabotropic glutamate 1 receptor antagonists in models of ischemic neuronal death: time-course and mechanisms. **Neuropharmacology**. v.38.n.10.p.1607-19, 1999

POMPER, J.K; HOFFMANN, U; KOVÁCS, R, GABRIEL, S; HEINEMANN, U. Hyperoxia is not an essential condition for status epilepticus cell death in organotypic hippocampal slice cultures. **Epilepsy Res.** v. 59. n. 1. p. 61-5, 2004.

POULSEN, C.F; SIMEONE, T.A; MAAR, T.E; SMITH-SWINTOSKY, V; WHITE, W.S; SCHOUSBOE, A. Modulation by topiramate of AMPA and kainate mediated calcium influx in cultured cerebral cortical, hippocampal and cerebellar neurons. **Neurochem res.** v. 29.n.1. p. 275-82, 2004.

PRADO-FRANCESCHI J.; BRAZIL, O. V. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v.19, n.6, p.875-887, 1981.

PRINGLE, A.K; BENHAM, C.D; SIM, L; KENNEDY, J; IANNOTI, F; SUNDSTROM, L.E. Selective N-type calcium channel antagonist omega conotoxin is neuroprotective against hypoxic neurodegeneration in organotypic hippocampal slice cultures. **Stroke**. v. 27. n. 11. p. 2124-30, 1996.

RAW, I.; ROCHA, M.C; ESTEVES, M.I.; KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 19, p. 333-338, 1986.

RADVANYI, F.R; BON, C. Catalytic activity and reactivity with p-bromophenacyl bromide of the phospholipase subunit of crotoxin. Influence of dimerization and association with the noncatalytic subunit. **J Biol Chem**. v. 257. n.10. p. 12616-23, 1982

RIZZI, C.T. CARVALHO-DE-SOUZA, J.L. SCHIAVON, E. CASSOLA, A.C. WANKE, E. TRONCONE, L.R.P. Crotonamine inhibits preferentially fast-twitching muscles but is inactive in sodium channels. **Toxicon**, v.50, p. 553-562, 2007.

ROGERS, B.C.; BARNES, M.I.; MITCHELL, C.L.; TILSON, H.A. Functional deficits after sustained stimulation of the perforant path. **Brain Res.** v.493. n.1. p.41-50, 1989

RUIZ-DE-TORRENT, R.M. BONGIOVANI, B. LEIVA, L. DUFFARD, A.M.E. RODRIGUEZ, J.P. PÉREZ, O.C.A DUFFARD, R. Neurotoxicological effects of trombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake. **Toxicon.** v. 50 p. 144-152, 2007.

ROSSI, M.A; PERES,L.C; DE PAOLA, F; CUPO, P; HERING, S.E; AZEVEDO-MARQUES, M.M. Electron-microscopic study of systemic myonecrosis due to poisoning by tropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) in humans. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v. 113. n.2, p.169-73, 1989.

RZESKI, W; KOCKI, T; DYBEL, A; WEJKSZA, K; ZDZISINSKA, B; KANDEFER-SZERSZEN, M; TURSKI, W.A; OKUNO, E; ALBRECHT, J. Demonstration of kynurenine aminotransferases I and II and characterization of kynurenic acid synthesis in cultured cerebral cortical neurons. **J Neurosci Res.** v.80. p.677–68, 2004

SALLAI, C. M. **Amifostine minimiza a perda celular hipocampal e previne os efeitos amnésicos induzidos pela radiação ionizante neonatal em ratos.** São Paulo, 2005. 109p. Tese (Doutorado). Instituto de biociências, departamento de fisiologia Universidade de São Paulo.

SAMPAIO, S.C.; HYSLOP, S.; FONTES, M.R; PRADO-FRANCESCHI, J., ZAMBELLI, V.O.; MAGRO, A.J; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V.P; CURY, Y; Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon.** v.55. n.6. p.1045-60, 2010

SÁNCHEZ, G; ALVARES, L.O; OBERHOLZER, M.V; GENRO, B; QUILLIFELDT, J; COSTA, J.C; CEREVEÑASKY, C; JERUSALINSKY, D; KORNISIUK, E. M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. **J. Neurosci. Res.** v. 87. n. 3. p. 691-700, 2009.

SANO-MARTINS, I.S. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **Oxford Journals**, v.94, n.10, p.551-559, 2001.

SANTORO, M L ; SILVA, M C C Sousa e ; GONÇALVES, L R C ; SANTOS, S. M. A. ; FERREIRA, I. L. L. ; SAIKI, M. ; PERES, C. A. ; SANO-MARTINS, I. S. . Comparison of the biological activities of three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, **Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, v. 122, n. C, p. 61-73, 1999.

SANTOS, A.M.G. **Envolvimento do giro denteado e córtex entorrinal medial, mas não do córtex entorrinal lateral, com o processamento de**

informações de natureza espacial. Tese (doutorado). Instituto de Biociências, departamento de fisiologia geral. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001

SANTOS, M.C; FERREIRA, L.C; DA SILVA, W.D; FURTADO, M.F. Characterization of the biological activities of the “yellow” and “white” venoms from the *Crotalus durissus terrificus* compared with the *Crotalus durissus ruruima* venom. Neutralizing activity of *Crotalus durissus ruruima* antivenins. **Toxicon**. v.31.n.11.p.1459-69, 1993.

SARIA, A; FISCHER, H.S; HUMPEL, C; PFATNNER, A; SCHATZ, D.S; SCHULIGOI, R. Margatoxin and iberiotoxin two selective potassium channel inhibitors, induce c-fos like protein and mRNA in rat organotypic dorsal striatal cells. **Amino Acids**. v. 19. n. 1. p. 23-31, 2000.

SCHAFFER, E.L; GATTAZ, W.F. Requirement of hippocampal phospholipase A2 for long-term memory. **J. Neural. Transm.** v.114. n. 3, p. 379-85. 2006.

SCHEFF, S.W; PRICE, D.A; HICKS, R.R; BALDWIN, S.A; ROBINSON, S.; BRACKNEY, C. Synaptogenesis in the hippocampal CA1 field following traumatic brain injury. **J Neurotrauma**. v.22. n.7. p.719-32, 2005

SCHMITZ, D; MELLOR, J; FRERKING, M; NICOLL, R.A. Presynaptic kainite receptors at hippocampal mossy fibers synapses. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.98. n. 20. p. 11003-8, 2001

SEIGERS, R; TIMMERMANS, J; DE VRIES, E. F.J.; DIERCKX, R.A; VISSER, L; SCHAGEN, S.B; VAN DAM, F.S.A.M.; KOOLHAAS, J;M; BUWALDA, B. Methotrexate reduces hippocampal blood vessel density and activates microglia in rats but does not elevate central cytokine release. **Behavioral Brain Res**. V.207. no.2. p.265-273, 2010.

SEWALL, H. Experiments on the preventive inoculation of rattlesnake venom. **J. Physiol**. V.8 n.3-4, p.203-210, 1887.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (2007) . http://www.fiocruz.br/Sinitox/2007/tab_brasil5.pdf. Acessado 12/10/2008.

SHOHAM, S.; BEJAR, C.; KOVALEV, E.; WEINSTOCK, M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. **Exp Neurol**. v.184. n.2. p.1043-52, 2003

STOPPINI, L; BUCHS, P.A; MULLER,D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. **J. Neurosc. Methods**. v. 37.n.2. p. 173-182, 1991.

SWANSON, L.W. The hippocampus and the concept of the limbic system. In: W. SIEFERT (Ed.), **Neurobiology of the Hippocampus**, Academic Press, New York, p. 3-19

TANABE, M. MORI, M; GÄHWILLER, B.H; GERBER, U. Apamin-sensitive conductance mediates the K(+) current response during chemical ischemia in CA3 pyramidal cells. **J. neurophysiol.** v. 82. n. 6. p. 2876-82, 1999.

TANHOFFER, E.A. **Perda celular hipocampal e efeitos amnésicos induzidos pelo metotrexate e isquemia cerebral: Estudos *in vivo* e em cultura organotípica de seções de hipocampo e efeitos do amifostine.** São Paulo, 2006. 133f. Tese (Doutorado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

THOMAZINI-SANTOS, I. A., GIANNINI, M. J. S. M., TOSCANO, E. *et al.* The evaluation of clotting time in bovine thrombin, reptilase®, and thrombin-like fraction of crotalus durissus terrificus venom using bovine, equine, ovine, bubaline and human cryoprecipitates. **J. Venom. Anim. Toxins**, v.4, no.2, p.120-136, 1998.

TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O; JOAZEIRO, P.P.; CARNEIRO, E.M; BERIAM, L.O.; MARANGONI, L.S.; BOSCHERO, A.C. Biological and structural characterization of a new PLA2 from the Crotalus durissus collilineatus venom. **Protein J.** v.24. n.2. p.103-12, 2005

VALENTE, R.H; NOVELLO, J.C; MARANGONI, S; OLIVEIRA, B; PAREIRA-DA-SILVA, L; MACEDO, D.V. Mitochondrial swelling and oxygen consumption during respiratory state 4 induced by phospholipase A2 isoforms isolated from the South American rattlesnake venom. **Toxicon.** v. 36. n. 6. p. 901-13, 1998.

VANZOLINI, P. E., CALLEFO, M. E. V. A taxonomic bibliography of the South American snakes of the Crotalus durissus complex (Serpentes, Viperidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** V.74. p.37-83, 2002.

VARGAS, L.S; LARA, M.V; GONÇALVES, R; MANDREDINI, V; PONCE-SOTO, L.A; MARANGONI, S; DAL BELO, C.A; MELLO-CARPES, P.B. The intrahippocampal infusion of crotamine from *Crotalus durissus terrificus* venom enhances memory persistence in rats. **Toxicon.** v. 85. p. 52-58, 2014.

VORNOV, J.J; TASKER, R.C; COYLE, J.T. Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. **Stroke.** v. 25. n.; 2. p. 464-5, 1994.

XAVIER, G.F.; OLIVEIRA-FILHO, J.B. AND SANTOS, A.M.G. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: Difficulties in "Place Strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? **Hippocampus**, v.9 n.6, p.668-681, 1999.

XAVIER, G.F; Memória espacial no rato. In: ADES, C. **Etologia de animais e de homens.** São Paulo. Edicon, 1986, p.61-74.

WANG, S.Y., WANG, G.K.. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. **Cell Signal.** V. 15. p.151-159, 2003

WHISHAW, I. Q; JARRARD, L. Similarities vs. differences in place learning and circadian activity in rats after fimbria-fornix section or ibotenate removal of hippocampal cells. **Hippocampus** 5, 595-604, 1995.

WHISHAW, I. Q; MITTLEMAN, G. Visits starts, routes and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. **J. comparat. Psych.** V. 100. P.422-431, 1986.

ZAMANILLO, D; SPRENGEL, R; HVALBY, O; JENSEN, V; BURNASHEV, N et al. Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. **Science.** v. 284. n. 5421. p. 1805-11, 1999.

ZHOU, S.J.; ZHU, M.E.; SHU, D.; DU, X.P.; SONG, X.H.; WANG, X.T.; ZHENG, R.Y.; CAI, X.H.; CHEN, J.F.; HE, J.C. Preferential enhancement of working memory in mice lacking adenosine A(2A) receptors. **Brain Res.** v.130. n.3. p.74-83, 2009

ZIMMER, J; GÄHWILLER, B.H. Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentate. **J. Comp. Neurol.** v. 228. n. 3. p. 432-446, 1984.

APÊNDICE I

Resultados do teste piloto para aferição da dose de inoculação intrahipocampal

Para determinar as doses da peçonha bruta que seriam utilizadas, foram realizadas cirurgias-piloto em 12 ratos Wistar, machos, pesando entre 300 e 350g mantidos com água e ração *ad libitum* em ciclo de claro-escuro de 12/12 horas. A cirurgia foi realizada seguindo o mesmo procedimento dos experimentos finais (ver adiante).

Foram escolhidas três doses da peçonha bruta diluídas em solução salina (NaCl 9%), injetadas intrahipocampalmente em quatro animais por dose para os testes-piloto: 0,3µg/kg, 0,5µg/kg e 0,8µg/kg. Cada uma das doses foi administrada bilateralmente, divididas em 3 sítios do hipocampo dorsal dos animais.

Após a cirurgia cada animal foi acondicionado em gaiolas individuais e os efeitos agudos da administração da peçonha foram acompanhados por 48 horas após a cirurgia. Os efeitos observados incluíam o movimento de *wetdogshake* (movimento de agitação, análogo ao que os cães fazem quando estão molhados), movimento de rotação no eixo longitudinal do corpo (*barrelroll*- efeito clássico da giroxina), convulsão tônico-clônica e corrida-selvagem (*wildrunning*- efeito convulsivo). Além disso, era avaliado o tempo da possível morte dos animais.

Os resultados do teste-piloto estão sintetizados no quadro a seguir expressos em porcentagem de animais que exibiram determinado comportamento.

Quadro1 – Resultados do teste-piloto que definiu as doses que seriam utilizadas neste experimento. Os resultados estão expressos em porcentagem de animais que exibiram cada um dos comportamentos.

Grupo (n=4)	Tempo médio para fim do efeito da anestesia	Morte	<i>Wet dog shake</i>	<i>Barrell roll</i>	Convulsão tônico- clônica	Corrida selvagem
0,3µg/kg	5 horas	1 animal morto após 5 horas da cirurgia	100%	50%	50%	50%
0,5µg/kg	5 horas	50% (entre 10 e 36 horas após a cirurgia)	100%	75%	100%	100%
0,8µg/kg	5 horas	100% (entre 5 e 7 horas após a cirurgia)	-	-	-	-

A dose selecionada para utilização neste experimento, baseado nos resultado do teste-piloto foi 0,3µg/kg. A dose foi escolhida por não ocasionar mortes e gerar efeitos agudos clássicos do envenenamento crotálico. Também verificou-se com este teste que os animais não exibiam mais quaisquer efeitos

agudos do envenenamento cerca de 48 horas após a inoculação da peçonha bruta.

APÊNDICE II

Histologia dos encéfalos dos animais inoculados sistemicamente com a peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*

A figura abaixo mostra as fotomicrografias das secções de hipocampo coradas seguindo o protocolo de Nissl para violeta de cresila do grupo controle e do grupo veneno do experimento 1 do capítulo 1. Note que o hipocampo dos animais que sofreram administração sistêmica da peçonha bruta de Cdt exibem marcada perda celular na camada CA3, enquanto a camada CA1 exhibe danos pormenores.

Figura 2 – Fotomicrografias de lamina de hipocampo corada com violeta de cresila do grupo controle (lado esquerdo) e grupo que recebeu veneno por via intraperitoneal (lado direito). Em ordem de cima para baixo: 1) visão geral do hipocampo; 2) CA1 e CA3 detalhados; 3) subcampo CA1 e 4) subcampo CA3.