DIEGO DE CARVALHO

**Efeitos comportamentais do veneno de
Crotalus durissus terrificus e do soro
anticrotálico em Ratos Wistar**

São Paulo

2010

DIEGO DE CARVALHO

**Efeitos comportamentais do veneno de
Crotalus durissus terrificus e do soro
anticrotálico em Ratos Wistar**

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

Orientador(a): Prof^a Dr^a Ida Siqueko Sano-Martins

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

Carvalho, Diego de
Efeitos comportamentais do veneno de
Crotalus durissus terrificus e do soro antcrotático em
ratos Wistar/ Diego de Carvalho
124 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia Geral.

1. Veneno crotático 2. Memória espacial 3.
ansiedade 4. Soro anticrotático I. Universidade de
São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de
Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)
Orientador(a)

Agradecimentos

À Profª Drª Ida Sigueko Sano-Martins por me admitir como aluno, mesmo diante de condições adversas, e por suas valiosas orientações.

Ao Profº Dr. Gilberto Fernando Xavier pelo espaço cedido e pelas inúmeras e igualmente valiosas sugestões.

À Claudia e ao Edson, além de grandes amigos são responsáveis iniciais e diretos da evolução desta pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Neurociência e Comportamento do IBUSP pelas críticas e também pelas risadas.

Aos amigos do departamento de Fisiologia pelos bons momentos.

Aos colegas e pesquisadores do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, que sempre foram muito prestativos, mesmo sendo eu um colega ausente.

Aos meus pais, irmão e familiares pelo constante apoio e suporte.

À Marina e sua família pelo amor, carinho e amizade.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Índice

Resumo	01
Abstract	02
Introdução geral	03
Objetivos Gerais	31
Justificativa para a abordagem proposta	31
Capítulo 1	32
Capítulo 2	67
Discussão e Conclusão geral	100
Considerações Finais	105
Referências	106

RESUMO

Acidentes ofídicos constituem um problema de saúde pública. Estudos prévios indicam que constituintes do veneno de *Crotalus durissus terrificus* injetados sistemicamente promovem, agudamente, aumento dos níveis de ansiedade em ratos; se injetados topicamente na formação hipocampal, região intimamente ligada a processos de memória espacial e ansiedade, induzem alterações citoestruturais. O objetivo deste trabalho foi avaliar, em ratos, efeitos comportamentais decorrentes da injeção sistêmica de veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* e a eficácia do soro anticrotálico em prevenir esses prejuízos quando administrado variáveis intervalos de tempo depois do envenenamento. Ratos submetidos a uma única injeção sistêmica de veneno bruto 7 dias antes do início dos testes foram avaliados nas tarefas de memória de referência e de memória operacional no labirinto aquático de Morris, e também a uma tarefa envolvendo uma plataforma visível no mesmo aparelho. A seguir, os animais foram submetidos ao paradigma do teste-reteste no labirinto em cruz elevado. Os resultados mostraram que houve prejuízos de memória de referência e de memória operacional; este último efeito ocorreu quando o intervalo entre as tentativas foi de 10 minutos, mas não quando foi de “zero” minutos. Potenciais efeitos sensoriais e motores foram excluídos. Além disso, houve substancial aumento nos níveis de ansiedade. A administração de soro anticrotálico preveniu os principais prejuízos de memória desde que realizada em até 10 horas após a injeção do veneno (foram testados intervalos de 0, 0,5, 2, 10 e 24 horas, em grupos independentes de animais). O grupo tratado com soro anticrotálico 24 horas depois do envenenamento apesar de prejudicado em relação aos grupos controle (um injetado com salina e o outro apenas com soro), exibiu desempenho melhor do que o grupo tratado apenas com veneno. Assim, o presente conjunto de resultados representam a primeira demonstração de que (1) uma única dose sistêmica do veneno crotálico produz prejuízos de memória espacial em ratos e aumenta os níveis de ansiedade avaliados 4 semanas após a injeção, e (2) os prejuízos de memória podem ser prevenidos pela administração de soro anticrotálico desde que essa administração ocorra em até 10 horas após o envenenamento.

ABSTRACT

Snakebites constitute a serious public health problem in Brazil. Prior studies have shown that systemic injections of venom fractions of *Crotalus durissus terrificus* produce acute increase in anxiety levels in rats; when injected topically within the hippocampal formation, a brain region underlying processes of spatial memory and anxiety, induce damage. The aims of this study included to investigate, in rats, behavioral effects of a single systemic injection of crude venom on performance of spatial memory tasks and on anxiety, and the efficacy and time course of the anti-venom administration to prevent memory disruption. Rats subjected to a single systemic injection of venom 7 days before the beginning of behavioral testing were evaluated in modified versions of the reference and working memory tasks in the water maze, and also to a version of the task in which the platform is visible. Then, the subjects were submitted to the test-retest paradigm in the elevated plus maze. Rats injected with the venom exhibited disruption of performance both in reference and working memory versions of the water maze task; in this latter task, however, disruption occurred when the intertrial interval was 10 minutes but not when it was “zero” minutes. Anti-crotalic serum injection prevented memory disruptions when its administration occurred up to 10 hours after injection of the venom (time intervals evaluated included 0, 0.5, 2, 10 and 24 hours, in independent groups of rats). Subjects that received anti-crotalic serum 24 hours after venom injection exhibited disruption of memory relative to control groups (one of them treated with saline and the other with anti-crotalic serum only); however, performance of those animals was better when compared to subjects receiving only venom administration. These results show, to our knowledge for the first time, that (1) a single systemic injection of crotalic venom induces disruption of spatial memory and increases anxiety evaluated 4 weeks after injection, and (2) major spatial memory disruptions may be prevented by administration of the anti-crotalic serum up to 10 hours after the venom injection.

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. Somando-se todos os tipos de envenenamento por animais, ou seja, todos os casos registrados de qualquer espécie, a incidência é de 24,75% do total de envenenamentos para todo o Brasil (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 2008 foram registrados uma média anual de 27.564 acidentes por serpentes (Ministério da saúde, 2010). Esses dados são distribuídos pelas macro-regiões brasileiras segundo a Figura 1.

Figura 1 – Incidência dos acidentes ofídicos entre 2000 e 2009 em cada macro-região brasileira. Os números absolutos na abscissa refletem o total de casos de acidente por serpentes registrado para cada ano no Brasil inteiro (Retirado de Ministério da Saúde, 2010).

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, 2007).

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 nos membros atingidos.

A maior letalidade do acidente crotálico deve-se, em grande parte, 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. No Brasil 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. Talvez a mais conhecida delas seja a *Crotalus durissus terrificus*, 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 sabe-se 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 de pressão arterial, que são normalmente relacionadas ao estado emocional do paciente envenenado (Cupo *et al.*, 1997). Além disso, um dos efeitos desta peçonha é 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 colinérgica 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. Os responsáveis por tais ações são 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 fosfolipases A₂ 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 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 - i.p.) 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 acreditava-se 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. O experimento demonstrou 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, revelou-se a ação ansiogênica desta toxina. Portanto, é possível que o veneno atue no sistema nervoso central, mesmo quando inoculado sistemicamente.

Em estudo mais recente, Torrent et al. (2007) verificaram que a inoculação sistêmica da gírotoxina em ratos neonatos provocou alterações cito-estruturais 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 relacionados ao funcionamento da região lesada.

Ademais, quando o veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi injetado diretamente no hipocampo de ratos, observou-se crises epiléticas nos animais e, posteriormente, lesões no hipocampo bem como em outras áreas 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 *Crotalus durissus terrificus* mostraram que apesar da pequena quantidade, essas toxinas se fixam no tecido cerebral após inoculação sistêmica (Cardi et al., 1998). Ainda neste mérito, Maruyama et al. (2005) observaram que o veneno dessa serpente pode induzir apoptose em células endoteliais que compõem a BHE reduzindo sua competência.

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), no livro "The Hippocampus as a cognitive map", distinguiram entre (1) orientação espacial cognitiva, envolvendo múltiplas triangulações entre estímulos do ambiente e o próprio animal, que permitiriam formar um mapa aloentrico do ambiente e (2) estratégias de guiamento que podem incluir (2a) orientação relacionada a um estímulo preponderante do ambiente em relação ao qual o animal se desloca e (2b) orientação egocêntrica, envolvendo rotações do eixo corpóreo; e sugeriram que animais podem empregar mais de uma delas simultaneamente. Em outras palavras, de

acordo com a teoria do mapa cognitivo, 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 o animal 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. E propuseram que a formação hipocampal corresponderia a essa estrutura. Entretanto, 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 de rotação 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 um estímulo visual que indica a posição da localidade almejada ou quando o repertório motor para o alcance daquela localização é conhecido, a formação hipocampal não é fundamental para a eficiência da navegação.

A formação hipocampal compreende o giro denteado, o hipocampo propriamente dito, incluindo seus sub-campos [os Cornos de Ammon (CA) 1, 2, 3 e 4], o complexo subicular e a área entorrinal (Swanson, 1983).

O'Keefe e Dostrovsky (1971) descreveram a existência de células hipocampais 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 surpreendentemente, vários autores descreveram prejuízos de memória espacial em decorrência de lesões na 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 na retenção de informações de natureza espacial. Nessa ocasião, Olton (1979) havia proposto que a formação hipocampal participaria da codificação e retenção temporária da informação espacial, isto é, que a memória operacional espacial, relativa à retenção de informações relacionadas a um contexto espacial e temporal específicos, é dependente do hipocampo; em contraposição, a memória de referência, utilizada na manutenção de informações de aplicação independente de contextos espaciais e temporais específicos, portanto de aplicação geral, seria independente do hipocampo.

Diversos fatores podem ocasionar lesões nas células hipocampais. 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), além de uma variedade de agentes químicos.

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

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

Avaliação de 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, 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 associada ao treinamento em que o animal parte de diferentes pontos da borda da piscina a cada tentativa para encontrar a plataforma, força o uso do mapeamento espacial e a adoção de 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 uma orientação allocêntrica. Seria possível aprender a tarefa por meio de estratégias de guiamento em relação a uma pista proeminente, caso o animal partisse sempre do mesmo ponto. Porém, a variação do ponto de partida do animal a cada tentativa o obriga a usar orientação allocêntrica e restringe o uso de estratégias egocêntricas (Morris, 1983; Wishaw e Mittleman, 1986, Santos, 2001).

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 portanto está associada a um contexto temporal específico e válido para aquele dia; neste último caso avalia-se a 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. Note, porém, que essa informação deixa de ser útil nos dias subseqüentes uma vez que a

plataforma será apresentada em outros locais. Ademais, o intervalo de tempo entre as tentativas pode ser variado neste teste a fim de dificultar ou facilitar a tarefa, e avaliar por quanto tempo o animal é capaz de reter a informação espacial na memória operacional.

Neurobiologia da Ansiedade

Define-se ansiedade como um estado emocional semelhante ao medo. No entanto, enquanto este último teria sua origem em estímulos bem definidos, a ansiedade tem origem em algo que não estaria aparente. Ou seja, a complexa interação entre fatores ambientais e psicológicos são determinantes para a existência ou não da ansiedade (Graeff, 1999).

Existe grande debate sobre a existência ou não da ansiedade em animais não humanos e qual seria seu papel biológico. Durante muito tempo análises envolvendo medo e ansiedade em animais não-humanos basearam-se em testes de respostas condicionadas, que requeriam treinamento prévio baseado em pareamentos de estímulos que determinavam um comportamento de medo (Gray e McNaughton, 1982). No entanto, é possível avaliar os níveis de ansiedade de ratos ou camundongos por meio de respostas não-condicionadas (Rodgers *et al.*, 1997) utilizando, por exemplo o labirinto em cruz elevado (ver adiante).

Em modelos animais as análises dos níveis de ansiedade se valem, em geral, de ferramentas farmacológicas ansiogênicas e ansiolíticas, além de modelos de lesões em determinadas estruturas nervosas que participam da gênese da ansiedade. Isso permite o entendimento, além dos processos

farmacológicos das drogas em questão, da fisiologia dos processos que desencadeiam a ansiedade (File *et al.*, 2001).

Situações estressantes que requerem respostas frente a uma possível ameaça podem estar relacionadas a respostas de “luta ou fuga” ou a uma inibição comportamental, como por exemplo, reações de congelamento (*freezing*) (Gray, 1982).

Esses comportamentos são mediados por estruturas nervosas que incluem porções caudais (reações de fuga), porções rostrais (reações de luta) e porções ventrolaterais (reações de congelamento) da substância cinzenta periaquedutal (Graeff *et al.*, 1993). Além da substância cinzenta periaquedutal, participam da gênese da ansiedade e medo estruturas como o córtex paralímbico e demais estruturas do sistema límbico, locus coeruleus, hipotálamo e o sistema septo-hipocampal (Gray, 1982; Sandford *et al.*, 2000).

A participação do sistema septo-hipocampal na gênese da ansiedade foi proposta por Gray (1982). O autor propôs que este sistema funcionaria como um comparador de estímulos ambientais permitindo gerar previsões acerca do contexto ambiental. As informações dos estímulos ambientais entram no sistema via córtex entorrinal, e as previsões seriam geradas por um circuito gerador de previsões, que envolve o subículo (principal centro de saída de informações hipocampais), o tálamo antero-ventral, os corpos mamilares, o córtex pré-frontal e o córtex entorrinal.

Esse breve resumo ressalta que é possível identificar a existência de relações entre as estruturas nervosas subjacentes memória espacial e ansiedade. Além da forte participação hipocampal em sua gênese, há evidências de que lesões no hipocampo alteram ambas as funções.

TOXINAS DE VENENOS ANIMAIS E SUAS (POSSÍVEIS) APLICAÇÕES EM NEUROCIÊNCIAS

Apresentaremos a seguir uma breve revisão sobre toxinas encontradas em venenos animais cuja ação influencia funções do sistema nervoso. Embora não seja objetivo do trabalho estudar mecanismos de ação de diferentes venenos nem usá-los como ferramenta de estudo de funções neurais, essa pequena revisão de dados disponíveis na literatura permite concluir que toxinas de venenos animais podem ter ações extremamente interessantes para o entendimento do funcionamento do sistema nervoso. Ademais, pelas características dessas ações, os venenos animais têm sido utilizados como valiosas ferramentas em diferentes áreas de pesquisa.

Tipos de Neurotoxinas de venenos animais

As neurotoxinas possuem os mais variados mecanismos de ação sobre o sistema nervoso. Estas podem agir sobre canais de Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} , atuar bloqueando a neurotransmissão por interferência na ancoragem das vesículas sinápticas interagindo com as proteínas do complexo SNARE, agir associada à fosfolipases A_2 (PLA_2 – do inglês *Phospholipase A₂*), ou então agir não permitindo que a neurotransmissão se complete, ligando-se aos receptores pós-sinápticos, além de outros mecanismos específicos.

Um bom exemplo de uma neurotoxina que atua em canais de N^+ é a tetrodotoxina (TTX) uma toxina encontrada no veneno de peixes da família tetrodontidae que teve sua ação revelada na década de 1960 (Narashi,

2008). Esta toxina promove o bloqueio seletivo de canais de Na^+ dependentes de voltagem. Muito do que se sabe sobre a participação destes canais na condução elétrica de células excitáveis deve-se a ação seletiva da TTX.

Existe uma gama de venenos animais que agem bloqueando canais de Na^+ . Uma possível explicação evolutiva para essa observação talvez esteja relacionada com o fato de que estes canais são cruciais para o desenvolvimento de potenciais de ação e a grande maioria dos venenos visa à paralisia do alvo. Diversas toxinas, como as de escorpiões, anêmonas do mar, aranhas, moluscos e insetos, têm sido utilizadas para o estudo destes canais, inclusive permitindo elucidar pontos sobre a conformação e estrutura dos canais de Na^+ (Wang e Wang, 2003).

Outro canal iônico importante para a sinalização celular dentro do sistema nervoso é o canal de K^+ dependente de voltagem. Esses canais são alvos de toxinas de aranhas, escorpiões, anêmonas, moluscos (*Conus sp.*) e serpentes (Possani et. al., 2000; Rash e Hodgson, 2002; Srinivasan et al., 2002; Terlau e Oliveira, 2004). Exemplos interessantes de toxina de venenos animais que tem ação seletiva na inibição de canais de K^+ dependentes de voltagem incluem a caribdotoxina e a agitoxina, do veneno do escorpião *Leiurus quiquestiatatus hebraeus* (Miller, 1995) e as hanatoxinas do veneno da tarântula *Grammostola spatulata* (Swartz e McKinnon, 1995; ver Swartz, 2007 para revisão).

As toxinas que agem sobre canais iônicos dependentes de voltagem têm dois mecanismos de ação diferentes: 1) podem se ligar ao poro de condução do canal, impedindo assim o fluxo de íons; 2) podem alterar a

conformação estrutural da proteína que forma o canal, mantendo o mesmo em posição fechada, aberta ou inativa (Miller, 1995; McKinnon e Miller, 1989).

A maioria das toxinas citadas anteriormente age de forma pós-sináptica, mas outras toxinas podem agir de forma pré-sináptica de diferentes maneiras. O íon Ca^{2+} participa de uma grande variedade de processos celulares, como: excitabilidade, neurotransmissão, metabolismo intracelular e expressão gênica (Uchitel, 1997). Este íon tem como principal porta de entrada nas células os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem; portanto o bloqueio destes canais pode desencadear processos de morte celular e consequente lesão em diversos tecidos animais, sobretudo no sistema nervoso, além do bloqueio da neurotransmissão.

As toxinas que bloqueiam canais iônicos podem ter seletividade para cada subtipo de canal. Por exemplo, a ω -conotoxina GVIA (lê-se G6A), uma toxina contida no veneno do molusco marinho *Conus geographus*, bloqueia seletivamente os canais tipo N de Ca^{2+} de forma irreversível (Oliveira et. al., 1985) e por isso essa toxina tem sido um excelente marcador farmacológico para a presença deste tipo de canais em diferentes sistemas (Regan et al., 1991).

As toxinas que agem de forma pré-sináptica também podem agir impedindo a célula pré-sináptica de liberar as vesículas contendo os neurotransmissores. Em geral, essas toxinas atuam destruindo ou inativando algumas proteínas que participam da ancoragem das vesículas sinápticas conhecidas como proteínas do complexo SNARE. Fugindo brevemente das toxinas de venenos animais, toxinas amplamente conhecidas por causar

paralisa desta maneira são as toxinas tetânicas e botulínicas de bactérias do gênero *Clostridium* que são conhecidas desde o final do século XIX (Rosseto et al., 2004). A toxina botulínica tem sido, hoje, aplicada em diferentes casos clínicos. Recentemente, uma metaloprotease do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* foi descrita por clivar a proteína VAMP (do inglês – *Vesicle-Associated Membrane Protein*) que é uma proteína de ancoragem do complexo SNARE (Fletcher et. al., 2010).

As toxinas associadas a PLA₂ interferem também na transmissão sináptica por um mecanismo ainda não muito claro. As PLA₂ clivam os fosfolípedes da membrana celular na posição *Sn-2* gerando lesões na membrana, alterando assim a permeabilidade da célula a determinados íons. Há um grande número de venenos animais que possuem toxinas associadas às PLA₂ (Kini, 1997). Entretanto, cada um deles pode ser associado a diferentes classes destas fosfolipases. Baseado em sua estrutura quaternária existem 5 classes de PLA₂. Os venenos de algumas serpentes como as do gênero *Bungarus*, *Crotalus* e *Naja* são bons exemplos que contém estas toxinas (Rosseto et al., 2004).

Existem outros mecanismos específicos de ação de neurotoxinas como, por exemplo, bloquear um receptor específico. Alguns desses mecanismos serão discutidos mais adiante, como o mecanismo de ação das toxinas muscarínicas da serpente do gênero *Dendroaspis*, que tem algumas características peculiares e tem fornecido informações importantes acerca do funcionamento dos receptores muscarínicos e seu papel nos processos de memória.

Neurotoxinas de Cnidários

Um dos primeiros relatos de neurotoxinas de cnidários data de 1975 (Béress et al., 1975). Os pesquisadores conseguiram purificar algumas neurotoxinas da anêmona européia *Anemonia sulcata*. Após a purificação foi possível avaliar o mecanismo de ação destas toxinas, que foi apontado como de retardar a inativação dos canais de Na^+ dependentes de voltagem, alterando consequentemente os potenciais de ação (Rathmeyer e Béress, 1976). Algum tempo depois o mecanismo preciso de ação destas toxinas foi determinado como sendo a de ligação no sítio 3 dos canais de Na^+ localizados na superfície externa da membrana de neurônios (Caterall e Béress, 1978). Em seguida muitas outras toxinas de diferentes espécies de anêmonas foram descobertas e com mecanismo de ação semelhante (para revisão ver Turk e Kem, 2009).

Neurotoxinas de Moluscos

Dentro do filo *Mollusca*, talvez os mais conhecidos representantes do filo (pelo menos no meio acadêmico e científico) que possuem neurotoxinas são as espécies do gênero *Conus*.

Existe uma grande variedade de relatos na literatura de eventos amnésicos seguidos de intoxicação pela ingestão de ostras e outros moluscos bivalves (ver Jeffery et al., 2004, para revisão). Esses eventos ficaram conhecidos pela sigla ASP (do inglês *Amnesic Shellfish Poisoning*). Entretanto, o envenenamento não acontece pela produção de algum tipo de

veneno pelos moluscos, e sim pelo acúmulo de ácido domóico, que é produzido por algumas microalgas e filtrado da água pelos bivalves (Mafrá et al., 2010). O ácido domóico é uma neurotoxina capaz de promover a lesão de células do hipocampo, estriado, cerebelo, córtex occipital e frontal. Seus efeitos incluem perda de memória e alucinações decorrentes da intoxicação (Jeffery et. al., 2004). O ácido domóico transpõe a barreira hematoencefálica (Preston e Hynie, 1991), ou seja, apesar de não ser um veneno animal, o ácido domóico pode ter grande importância para as neurociências.

Voltemos às conotoxinas, que têm sido amplamente utilizadas como ferramenta de pesquisa nos mais variados laboratórios de neurociências. Existe uma enorme variedade de peptídeos tóxicos na peçonha das espécies de *Conus*. Esses moluscos de forma cônica atingem suas presas através de uma espécie de dardo contendo as toxinas (Oliveira e Cruz, 2001). Apenas na década de 60 foi descoberto que estes animais caçavam e se alimentavam de peixes (Kohn, 1960). E talvez, até mesmo antes dessa descoberta, já teriam acontecido acidentes fatais envolvendo humanos, que culminaram em motivar a pesquisa sobre o veneno destes moluscos. Na década de 70 houve o primeiro relato acerca da farmacologia dos venenos de *Conus*, e daí por diante muitas toxinas foram purificadas da peçonha deste gênero (Oliveira e Cruz, 2001).

O potencial neurotóxico destas toxinas foi revelado quando Clark e colaboradores (1981) aplicaram várias frações do veneno de *Conus* diretamente no sistema nervoso central de camundongos. Os animais exibiam diferentes comportamentos dependendo da toxina que era injetada. Cada toxina foi nomeada pelo efeito comportamental que ela produzia. Por

exemplo, a fração que produzia um estado de sono nos animais foi denominada peptídeo *Sleeper*, a fração que gerava agitação nos camundongos foi denominada *Shaker*, e a fração que provocava letargia *Sluggish*. (Clark et al., 1981; Oliveira et al., 1984; Clark et al., 1999). Anos mais tarde descobriu-se que havia uma variedade de conotoxinas que produziam os mesmos efeitos. Os peptídeos *Shaker* foram, então, denominados ω -conotoxinas que provocam bloqueio seletivo de canais tipo N de Ca^{2+} . O peptídeo *Sleeper* foi denominado de conantokina, cuja atividade é de antagonista de receptores NMDA. E, por fim, os peptídeos que provocavam letargia foram denominados de contulakin-g, que gera potente efeito analgésico e atualmente tem sido utilizada em pesquisas de dor crônica e nocicepção (ver Oliveira e Cruz, 2001, para revisão).

Neurotoxinas de Aranhas e Escorpiões

As aranhas e os escorpiões, quando venenosos, possuem grande importância em saúde pública por provocarem grande parte dos acidentes com humanos.

No Brasil, o envenenamento por escorpiões e aranhas atinge mais de 10% do total de todas as modalidades de envenenamentos, incluindo aqueles por substâncias químicas e medicamentos, entre outros (Sinitox, 2007).

As neurotoxinas de aracnídeos possuem os mais variados mecanismos de ação; entretanto, os mais usuais são a interação com canais iônicos e a inibição da exocitose do conteúdo de vesículas sinápticas.

Quanto a ação sobre canais iônicos, vários tipos de canais podem ser afetados. Por exemplo, a toxina da aranha brasileira *Phoneutria nigriventer*, caracterizada pela sua extrema agressividade e sintomatologia de envenenamento com tremores, paralisia flácida, dor irradiante, entre outros, tem como principal alvo canais de Na⁺ dependentes de voltagem eliciando repetitivos potenciais de ação em fibras nervosas e musculares, gerando lesões nestas células (Fontana e Brazil., 1985). Efeito oposto é obtido pela hanatoxina, do veneno da tarântula *Grammostola spatulata*; os potenciais de ação são drasticamente reduzidos e isso se deve ao bloqueio seletivo de um tipo específico de canal de K⁺ dependente de voltagem (Swartz e Mackinnon, 1995). Esta toxina foi recentemente utilizada como ferramenta para demonstrar o papel do glutamato e das correntes de K⁺ em culturas de células hipocâmpais (Mohapatra *et al.*, 2009). Papel análogo a este tem a noxiustoxina do escorpião australiano *Androctonus australis*, que foi a primeira toxina de ação seletiva para canais de K⁺ de escorpiões. Esta toxina é seletiva para canais que formam as correntes de potássio tipo-A, cujo papel é preponderante para a funcionalidade das células granulares do cerebelo e hipocampo (Prestipino *et al.*, 2009).

A outra ação mais comum das toxinas de aracnídeos é a inibição da exocitose do conteúdo de vesículas sinápticas. A ação α -latrotoxina, uma potente neurotoxina do veneno da viúva negra (*Latrodectus sp.*) tem como alvo as neurexinas e as CIRL/latrofilinas, que são moléculas que promovem a adesão da vesícula sináptica à membrana celular (Südhof, 2001), ou seja, esta toxina impede que a neurotransmissão se complete. Uma metaloprotease do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* também exhibe este

mecanismo de ação, porém, tem como alvo a proteína de ancoragem VAMP (Fletcher *et al.*, 2010).

Neurotoxinas de serpentes

Anualmente cerca de 2,5 milhões de pessoas no mundo envolvem-se em acidentes com serpentes. A grande maioria destes ocorrem em regiões tropicais sobretudo nas zonas rurais (Koh *et al.*, 2006). Das toxinas de serpentes que tem como alvo o sistema nervoso, a grande maioria são neurotoxinas propriamente ditas; no entanto, existe um grupo muito particular (a qual não deixa de ser uma neurotoxina) de toxinas de serpentes que tem sido empregada nas neurociências, as dendrotoxinas e as toxinas muscarínicas de *Dendroaspis* (ver adiante).

A maioria das neurotoxinas de serpentes são as α -neurotoxinas, pós-sinápticas, que tem como principal alvo farmacológico receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), atuando como antagonistas (Endo e Tamiya, 1987). Essa ação é semelhante a ação do curare utilizado pelos índios amazônicos. Acredita-se que grande parte destas neurotoxinas não cruzem a barreira hematoencefálica e, portanto, sua ação seria periférica (Harvey, 1990; Silveira e Dajas, 1994; Armugan *et al.*, 2004). Entretanto, é importante ressaltar que além de atuarem nos receptores das células musculares, essas toxinas atuam também nos receptores neuronais, muitas vezes com maior afinidade neste último (Siew, 2004).

As α -neurotoxinas são distinguidas pelo tamanho de suas cadeias de aminoácidos: podem ser de cadeia longa e de cadeia curta (do veneno de

serpentes das famílias elapidae e hydrophiidae) e outras toxinas menos convencionais de elapídeos, que são denominadas neurotoxinas fracas (Koh *et al.*, 2006).

Outro grande grupo de neurotoxinas de serpentes são as β -neurotoxinas que atuam de forma pré-sináptica, impedindo que a acetilcolina seja liberada (Rosseto *et al.*, 2004). Exemplos destas neurotoxinas são a β -bungatoxina da serpente asiática *Bungarus* (Rowan, 2001), Taipoxina da serpente australina *Oxyuranus microlepidotus* (Montecucco e Rosseto, 2008) e a Crotoxina, da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus* (Rosseto *et al.*, 2004). Fato interessante acerca do veneno das serpentes do gênero *Bungarus* é que elas possuem tanto β -neurotoxinas como α -neurotoxinas, e estas tem especificidade para nACHr do tipo α -7, que estão presentes em grande número nas células piramidais do hipocampo (Jones *et al.*, 2004).

As toxinas de ofídios podem ainda estar associadas à fosfolipases A_2 (PLA_2), as quais frequentemente geram processos inflamatórios e lesões celulares decorrentes dos envenenamentos. As PLA_2 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. Isso torna a membrana celular permeável a diferentes componentes, como os íons Ca^{2+} que podem promover alterações fisiopatológicas e morte celular em algumas populações de neurônios (Bennet *et al.*, 1994; Dunn e Broady, 2001; Schaffer e Gattaz, 2005).

Por fim, outro grande grupo de neurotoxinas ofídicas são as dendrotoxinas. Um tipo particular de neurotoxina do veneno das mambas (serpentes africanas). Também no veneno destas serpentes são encontradas

as toxinas muscarínicas, que têm sido utilizadas em estudos da neurobiologia da memória.

Toxinas muscarínicas de Dendroaspis: suas contribuições para o estudo da fisiologia da memória

O veneno da mamba verde *Dendroaspis angusticeps* tinha a interessante habilidade de facilitar a liberação de acetilcolina; no entanto, na década dos 1970, os mecanismos que levavam a isto eram desconhecidos (Osman *et al*, 1973). Harvey e Karlsson (1980) apontaram que a ação desse veneno seria a de bloquear seletivamente alguns canais de K^+ dependentes de voltagem. Por si essa descoberta teve grande relevância e aplicabilidade para o estudo de excitabilidade celular.

No entanto, fato marcante deste veneno animal foi a presença de toxinas muscarínicas, isto é, toxinas que interagem com canais muscarínicos de acetilcolina (mAChR) (Adem *et al.*, 1988). A transmissão colinérgica mediada por mAChR é de suma importância para processos cognitivos, como memória e aprendizagem. Mas qual, então, a aplicabilidade destas toxinas? Existem 5 diferentes tipos de mAChR e diferentes tipos das toxinas muscarínicas que têm afinidade para um sub-tipo de receptor, com diferentes ações. Por exemplo, a toxina muscarínica MT2 possui afinidade pelo mAChR tipo 1 (M_1) com efeito agonista, enquanto a MT3 tem afinidade pelo mAChR tipo 4 (M_4) com ação antagonista (Harvey, 2001).

Utilizando o paradigma de esQUIVA inibitória em ratos submetidos à injeção intra-hipocampal de MT2 e MT3, Ferreira e colaboradores (2003)

demonstraram que MT2 facilitou a consolidação da memória e MT3 produziu efeitos amnésicos análogos aos da pirenzenpina e escopolamina, porém somente em altas doses; quando administrada em doses baixas ela promoveu facilitação. Então é possível concluir que o receptor M1 participa ativamente dos processos cognitivos e o receptor M4 pode atuar como modulador da consolidação, ou seja, sua participação depende da população de receptores ativos ou inativos. Diehl e colaboradores (2007) testaram o efeito de MT3 quando os animais passavam por um pré-treino da esQUIVA inibitória e, agora, MT3 (antagonista de M₄) exibiu sempre efeito facilitatório, ou seja, M₄ não parece ter papel fundamental na evocação de memórias.

Considerações finais acerca desta breve revisão

Alterações fisiopatológicas podem influenciar a principal manifestação observável da fisiologia neural, o comportamento. A análise comportamental pode fornecer valiosas pistas acerca da fisiopatologia dos venenos animais. O contrário também pode ocorrer, i.e., a partir do conhecimento das ações e alvos das toxinas, os mecanismos fisiológicos que levam àqueles comportamentos podem ser investigados.

Como visto, as toxinas de venenos animais são compostos que, fruto da evolução, tem mecanismos sofisticados e muitas vezes específicos para cada alvo farmacológico e por isso tem aplicabilidade em diversas áreas do conhecimento.

Em neurociências seu uso pode abranger desde estudos de eletrofisiologia de uma única célula nervosa até a neurobiologia de determinados comportamentos.

Muitas vezes as respostas são procuradas de formas complexas, envolvendo alta tecnologia e recursos. Estudos da biologia molecular dos venenos animais representam um grande avanço científico e nos fornecem respostas concisas acerca do mecanismo de ação das toxinas. No entanto, outras respostas de mecanismos fisiopatológicos podem ser observadas com a análise experimental do comportamento e outras hipóteses podem ser formuladas para, aí sim, buscar respostas altamente refinadas.

Nos capítulos 1 e 2, que se seguem, serão discutidos alguns efeitos comportamentais, em ratos, do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Como exposto anteriormente, as toxinas contidas na peçonha desta serpente produzem alguns efeitos comportamentais. Além de aumento dos níveis de ansiedade, episódios convulsivos bem como alterações e lesões em estruturas nervosas de animais de experimento já foram descritas. Partindo do pressuposto que a gênese da ansiedade possui correlatos diretos com estruturas nervosas envolvidas em funções de memória, a avaliação de memória espacial torna-se pertinente. Além disso, as características biológicas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* permitem inferências acerca de acometimentos neurais que envolvem a formação hipocampal.

Ademais, os achados descritos na literatura apontam que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* pode ter ação sobre o sistema nervoso central. Os resultados de análise comportamental do envenenamento experimental, a ocorrência de estados convulsivos e demais efeitos neurológicos indicam

isso. Baseado nestes indícios é plausível supor que a ação da peçonha desta serpente envolve a indução de alterações no funcionamento da formação hipocampal. Portanto, analisar o comportamento de ratos em tarefas sensíveis ao funcionamento desta estrutura é extremamente relevante.

OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se uma única administração de veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* resulta em prejuízos no desempenho de tarefas de memória de referência e memória operacional, ambas espaciais, e alterações nos níveis de ansiedade em ratos. Avaliou-se também em que extensão a administração do soro anticrotálico disponível comercialmente no Brasil é capaz de prevenir os prejuízos comportamentais observados no labirinto aquático de Morris após a administração do veneno, e até quando tempo depois do envenenamento essa ação preventiva do soro ainda se faz presente.

JUSTIFICATIVA PARA A ABORDAGEM PROPOSTA

O labirinto aquático de Morris é uma ferramenta robusta e extremamente sensível para a avaliação de memória espacial. Portanto, na hipótese de haver alguma alteração fisiopatológica na formação hipocampal, decorrente do envenenamento experimental, passível de expressão de alteração comportamental, esta tarefa deverá ser sensível o suficiente para revelá-la. Por outro lado, existem evidências que apontam que a crotoxina tem ação ansiogênica aguda após inoculação única e sistêmica em ratos;

não está claro, porém, se esse efeito se mantém depois de eliminados os efeitos agudos do envenenamento. Nesse sentido, o labirinto em cruz elevado foi a tarefa escolhida pela grande sensibilidade em aferir alterações nos níveis de ansiedade em roedores.

O tratamento dos animais com soro anticrotálico em diferentes momentos após o envenenamento teve dois objetivos: 1) avaliar a eficácia do soro em prevenir os prejuízos comportamentais que se seguem à administração de uma única dose do veneno, e 2) identificar o intervalo de tempo desde o envenenamento em que a administração do soro ainda se faz efetiva em prevenir os prejuízos comportamentais, fornecendo pistas valiosas acerca de quando ocorrem os prejuízos e possivelmente a lesão.

CAPÍTULO 1

Veneno de *Crotalus durissus terrificus* induz prejuízos em tarefas espaciais e aumenta os níveis de ansiedade em ratos Wistar ?

OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO

Estes experimentos visaram avaliar se uma única dose do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* inoculado intraperitonealmente em ratos produz prejuízos duradouros na memória de referência e na memória operacional, ambas espaciais, no labirinto aquático de Morris (1981). Avaliou-se também, por meio do labirinto em cruz elevado, se existem efeitos ansiogênicos decorrido longo intervalo de tempo (aproximadamente 4 semanas) depois do envenenamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Formação dos Grupos Experimentais

Foram utilizados 24 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.

Os ratos foram organizados em dois grupos. O grupo experimental, denominado grupo “Veneno” (n=13), foi injetado com veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* veiculizado em solução salina (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal (i.p.), na dose de 1200 µg/kg. Os animais do outro grupo, servindo como controle e denominado grupo “Salina” (n=11), receberam uma injeção de 1 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) por via i.p. Após 7 dias da injeção os testes foram iniciados.

Obtenção do Veneno

O *pool* de veneno liofilizado de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) foi fornecido pelo Instituto Butantan de São Paulo.

Labirinto Aquático de Morris (1981)

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 da água, possibilitava sair da água, servindo de escape para os animais. A posição da plataforma variava de acordo com o teste efetuado (ver adiante). Todo o experimento foi registrado por uma câmera de vídeo (VP112, HVS Image Ltd., Hampton, UK) conectada a um computador programado para analisar pares de coordenadas, que definem a posição do animal, coletados a cada 0,1 s.

Para fins de análise a piscina foi dividida ao meio por duas linhas imaginárias perpendiculares, formando quatro quadrantes de mesmo tamanho. O quadrante que continha a plataforma foi denominado quadrante crítico. Além disso, havia uma área (imaginária), concêntrica à plataforma e de três vezes seu diâmetro, denominada contador crítico. A maior presença dos animais dentro destas áreas críticas é informativa da precisão da busca pela plataforma. Outra divisão da piscina, para fins de análise, foi adotada: foi dividida em três anéis concêntricos a partir do centro da piscina. O anel interno, mais próximo ao centro da piscina, tinha aproximadamente 33

centímetros de raio, em seguida o anel intermediário tinha aproximadamente 66 centímetros de raio e, por fim, o anel externo, coincidente com o tamanho da piscina tinha 1 metro de raio. Em etapas iniciais, espera-se que os animais permaneçam a maior parte do tempo no anel externo (zonas da parede da piscina); ao longo das sessões o rato começa a explorar o centro do labirinto, a fim de encontrar a plataforma.

O primeiro teste realizado, envolvendo memória de referência, iniciou-se 7 dias após o tratamento dos animais. A plataforma foi mantida sempre na mesma posição e o animal era solto a cada tentativa de um ponto diferente da borda da piscina. 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 de 10 minutos entre elas. Esta etapa envolveu 12 sessões consecutivas. Os parâmetros analisados em cada tentativa deste teste incluíram latência, comprimento do trajeto, a percentagem de tempo de permanência nos anéis externo, intermediário e central da piscina e o ângulo de divergência inicial entre a trajetória do animal nos primeiros 50 cm de nado e a localização da plataforma.

A latência, i.e., o tempo que o animal despende do início do teste até alcançar a plataforma juntamente com o comprimento do trajeto que o animal percorre até o escape são medidas que comumente se alteraram mais rapidamente ao longo das sessões de teste e consequente aprendizado da localização da plataforma.

O tempo de permanência do animal nos anéis externo, intermediário e externo exprime a forma como o animal explora o ambiente a fim de criar relações espaciais para sua navegação. Isto é, em tentativas iniciais o animal tende a permanecer na região da parede da piscina (anel externo) ao longo do teste os animais buscam a plataforma mais ao centro da piscina, localização em que realmente a plataforma se achava.

O ângulo inicial de divergência entre a trajetória inicial do animal e a posição da plataforma é uma medida refinada de precisão da busca do escape; isto é, ângulos próximos a zero denotam maior precisão.

A seguir avaliou-se a lembrança sobre a localização da plataforma e a extinção da resposta adquirida no teste de memória de referência (*"Probe test"*). A plataforma foi retirada da piscina e os animais tinham 3 minutos para nadar livremente. Os dados foram analisados minuto a minuto (Time bins) avaliando 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 incluíram comprimento do trajeto, porcentagem de tempo em que o animal permanece no quadrante crítico, porcentagem de tempo de permanência nos anéis externo, intermediário e central da piscina e velocidade média de natação.

A porcentagem de tempo em que o animal permanece no quadrante crítico permite a inferência de quanto o animal lembra-se da localização geral da plataforma no teste de memória de referência e como ele extingue essa informação ao longo das janelas de tempo do *"probe test"*.

A velocidade média de natação, calculada com base no trajeto total do animal dividido pelo tempo de permanência na piscina, foi avaliada neste teste pois todos os animais permanecem na piscina por igual quantidade de tempo, diferindo, por exemplo, do tempo de permanência na piscina durante o teste de memória de referência, que variou em função do desempenho dos animais em encontrarem a plataforma. Este parâmetro permite avaliar se os animais possuem algum comprometimento motor relacionado à execução da tarefa bem como reflete a motivação dos animais.

O teste de memória operacional iniciou-se 3 dias após o “Probe test”. A cada dia de teste a posição 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 e frequência no contador do dia anterior.

Os parâmetros que refletem o tempo de permanência nos locais onde se achava a plataforma no dia anterior são medidas para avaliação da lembrança do animal sobre a localização da plataforma 24 horas antes do teste corrente.

Foram realizadas duas fases no teste de memória operacional em que se variou o intervalo entre as tentativas (*ITI – Intertrial Interval*). A primeira fase parte consistiu de 4 dias com ITI igual a 10 minutos. A segunda fase envolveu 3 dias com ITI virtualmente zero. Estes dados foram sintetizados sob forma de média de cada uma das tentativas nas sessões de cada fase.

Para avaliar eventuais prejuízos sensoriais, realizou-se um teste adicional envolvendo uma plataforma visível; colocou-se uma esfera de

isopor branco com 9 cm de diâmetro 15 cm acima do local em que a plataforma se encontrava. Este teste envolveu 3 tentativas, variando-se a localização da plataforma a cada tentativa. O ITI foi de 10 minutos.

Labirinto em Cruz Elevado

O equipamento é constituído de quatro braços de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, dois deles, opostos pelo centro, com paredes laterais de 40 cm, denominados braços fechados, e outros dois, também opostos pelo centro, com “paredes” laterais de 1 cm de altura, denominados braços abertos. O conjunto fica apoiado em suportes 50 cm acima do assoalho.

Durante uma sessão de teste o animal foi posicionado no centro do labirinto podendo percorrê-lo livremente ao longo de 5 minutos. Os parâmetros registrados incluem o número de entradas nos braços abertos e fechados, o número de vezes que o animal passou pelo centro do labirinto e o tempo de permanência nos braços abertos, fechados e no centro do labirinto. Então, calcula-se a percentagem de entradas e de tempo de permanência nos braços abertos, número de entradas nos braços fechados e percentagem de tempo no quadrado central (como medida de avaliação de risco). Considerou-se que o animal entrou em um dos braços quando este ultrapassou, com as 4 patas, o limite que divide o quadrado central e os braços. Findos os 5 minutos, os animais foram colocados em suas gaiolas onde aguardaram até a próxima exposição. O intervalo entre as exposições foi de 5 minutos. A segunda exposição ocorreu de forma idêntica a primeira.

Sempre que um animal concluía uma sessão o equipamento era limpo com álcool a 70%.

Todo o procedimento é filmado por meio de uma câmera de vídeo; os dados foram registrados e analisados utilizando-se o programa X-plo-rat (disponível em: <http://scotty.ffclrp.usp.br/page.php?6>)

A premissa por detrás deste teste seria o conflito entre o medo dos animais em relação aos ambientes abertos e elevados, e sua natureza exploratória. Portanto, espera-se que um animal saudável exiba medo natural à exposição a ambientes abertos, mas explore o ambiente numa tentativa inicial; a percentagem de tempo nos braços abertos assim como a percentagem de entradas nos braços abertos são usualmente consideradas medidas da sua ansiedade (Rodgers e Cole, 1994; File *et al.*, 2001).

A atividade locomotora também pode ser avaliada mensurando-se o número total de entradas nos braços fechados (File *et al.*, 2001). A atividade locomotora não é influenciada pelos níveis de ansiedade, o que é evidenciado por resultados que apontam que mesmo quando os níveis de ansiedade estão aumentados nos animais, a atividade motora permanece inalterada (File *et al.*, 2001; Sallai, 2005).

Análise estatística

Os resultados obtidos no labirinto aquático de Morris foram analisados por meio da análise de variância para medidas repetidas (ANOVA), tendo “Grupo” como fator entre-sujeitos e “Sessão” e “Tentativa”, além do “ITI” quando existente, como fatores intra-sujeitos. O fator “Sessão” afere a

melhora do desempenho do animal dia-a-dia, ou seja, admite-se que ao longo das sessões o animal carrega consigo informações dos dias anteriores, que reflete em sua melhora de desempenho no teste de memória de referência. O fator “Tentativa” afere a melhora de desempenho ao longo das tentativas. No “probe test” o fator tentativa foi substituído por janelas de tempo (*Time Bins*) uma vez que o teste é avaliado minuto a minuto; e no teste de memória operacional aplicava-se como fator intra-sujeito também a condição ITI.

No labirinto em cruz elevado incluiu-se Grupo como fator entre-sujeitos e sessão de exposição como fator intra-sujeitos.

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

Foi executada uma ANOVA para cada parâmetro distinto (e.g., latência, comprimento do trajeto, ângulo de divergência, velocidade de natação, percentagem de tempo no quadrante crítico, porcentagem de permanência nos braços aberto, número de entradas nos braços fechados).

Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SAS® 9.0.

RESULTADOS

Memória de Referência Espacial

Os resultados do teste de memória de referência espacial são apresentados na Figura 2.

A ANOVA revelou a existência de efeitos significantes em relação aos fatores Grupo [**Latência:** ($F(1,22)=16,71$; $p<0,0005$) (Figura 2A);

Comprimento do trajeto: ($F(1,22)=11,99$; $p<0,0022$) (Figura 2B); **Porcentagem de tempo no anel central:** ($F(1,22)=8,38$; $p<0,0084$) (Figura 2C); **Porcentagem de tempo no anel intermediário:** ($F(1,22)=3,24$; $p<0,0578$) (neste caso quase estatístico) (Figura 2D); **Porcentagem de tempo no anel externo:** ($F(1,22)=4,65$; $p<0,0346$) (Figura 2E); **Ângulo inicial de divergência:** ($F(1,22)=5,81$; $p<0,0247$) (Figura 2F)], Sessão [**Latência:** ($F(11,242)=20,72$; $p<0,0001$); **Comprimento do trajeto:** ($F(11,242)=20,72$; $p<0,0001$), **Porcentagem de tempo no quadrante crítico:** ($F(11,242)=13,10$; $p<0,0001$) **Porcentagem de tempo no anel central:** ($F(11,242)=13,04$; $p<0,0001$) **Porcentagem de tempo no anel intermediário:** ($F(11,242)=25,49$; $p<0,0001$) **Porcentagem de tempo no anel externo:** ($F(11,242)=34,91$; $p<0,0001$); **Ângulo inicial de divergência:** ($F(11,242)=3,91$; $p<0,0001$)], isto é, as sessões são diferentes entre si, ou seja, os animais são capazes de aprender entre os dias de teste], e Tentativa [**Latência:** ($F(1,22)=2,20$; $p<0,0151$), **Comprimento do trajeto:** ($F(1,22)=26,11$; $p<0,0001$). Estes parâmetros apresentam diferença, pois, os animais conseguem reter as informações da tentativa anterior e melhorar seu desempenho quando estão aprendendo a localização da plataforma; entretanto, quando o desempenho é assintótico isto não ocorre. A ANOVA revelou ainda diferenças significantes nas interações entre Grupo e Sessão [**Latência:** ($F(11,242)=2,20$; $p<0,0255$); **Comprimento do trajeto:** ($F(11,242)=3,82$; $p<0,0014$); **Porcentagem de permanência no anel central:** ($F(11,242)=2,43$; $p<0,0179$); **Porcentagem de permanência no anel intermediário:** ($F(11,242)=3,44$; $p<0,0017$); **Porcentagem de permanência no anel externo:** ($F(11,242)=3,70$; $p<0,0015$); **Ângulo de**

divergência inicial: ($F(11,242)=2,25$; $p<0,0145$)], refletindo que a taxa de aquisição dos grupos ao longo das sessões de teste diferiu, sendo pior no grupo “Veneno”, e Grupo e Tentativa [**Comprimento do trajeto:** ($F(1,22)=4,872$; $p<0,0387$), refletindo que a taxa de melhora do grupo “Veneno” ao longo das tentativas foi menor que a do grupo “Salina”, e Grupo, Sessão e Tentativa [**Latência:** ($F(11,242)=1,06$; $p<0,0393$); **Comprimento do trajeto:** ($F(11,242)=1,0$; $p<0,0363$); **Ângulo de divergência inicial:** ($F(11,242)=2,13$; $p<0,0256$)], indicando que a taxa de melhora dos grupos nas tentativas variou diferentemente ao longo das sessões de treino.

De fato, como mostra a Figura 2, o grupo tratado com veneno bruto de *C. durissus terrificus* exibe prejuízo na aquisição e/ou retenção de informações acerca da localização da plataforma. Observa-se que ambos os grupos apresentam, inicialmente, resultados semelhantes; porém, ao longo do treinamento os animais inoculados com o veneno apresentaram pior taxa de aquisição da tarefa, como revelado na curva de aquisição mais lenta.

Nos parâmetros percentagem de tempo que o animal permaneceu na área central (Figura 2C) ($F(1,22)=8,38$; $p<0,0084$), percentagem de tempo no anel intermediário (Figura 2D) ($F(1,22)= 3,24$; $p<0,0578$) e percentagem de tempo no anel externo (Figura 2E) ($F(1,22)=4,65$; $p<0,0346$) os animais do grupo “veneno” revelaram prejuízo na exploração do ambiente, permanecendo maior percentagem de tempo na região da parede da piscina do que nas regiões centrais. Nota-se, ainda que a redução deste parâmetro ao longo das sessões de treinamento é prejudicada neste grupo.

No parâmetro que afere o ângulo de divergência inicial entre o ponto de partida e a plataforma (Figura 2F) novamente, os animais do grupo

experimental exibiram desempenho aquém do dos controles ($F(1,22)=5,81$; $p<0,0247$), da mesma forma que a evolução do desempenho ao longo das sessões, analisada pela comparação dos fatores Sessão e Grupo.

Figura 2 – (A) Latência (em segundos), (B) Comprimento do trajeto (em centímetros), (C) Porcentagem de tempo no anel central, (D) Porcentagem de tempo no anel intermediário, (E) Porcentagem de tempo no anel externo e (F) Ângulo inicial de divergência (em graus) em relação à localização da plataforma em função das 12 sessões de treino no teste de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris. Note que apenas para efeitos de representação calculou-se a média (- E.P.M.) das tentativas de cada sessão para os diferentes escores. * $p<0,05$ no teste Post-hoc.

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta – Probe Test

A Figura 3 mostra os resultados do *Probe test*.

A ANOVA revelou ausência de efeitos significantes em relação ao fator Grupo [**Comprimento do trajeto**: ($F(1,22)=0,19$; $p<0,6695$; (Figura 3B); **Porcentagem de permanência no quadrante crítico**: ($F(1,22)=0,17$; $p<0,6840$ (Figura 3B); **Porcentagem de tempo no anel central**: ($F(1,22)=0,89$; $p<0,3563$) (Figura 3C); **Porcentagem de tempo no anel intermediário**: ($F(1,22)= 2,23$; $p<0,1500$) (Figura 3D); **Porcentagem de tempo no anel externo**: ($F(1,22)=2,26$; $p<0,1472$) (Figura 3E); **Velocidade média de natação**: ($F(1,22)=0,17$; $p<0,6834$) (Figura 3F)]. No entanto, conforme esperado, houve efeitos significantes em relação ao fator “TIME BIN” [**Comprimento do trajeto**: ($F(2,44)=17,09$, $p<0,0001$); **Porcentagem de permanência no quadrante crítico**: ($F(2,44)=4,68$, $p<0,0144$); **Porcentagem de tempo no anel central**: ($F(2,44)=6,61$; $p<0,0031$); **Porcentagem de tempo no anel intermediário**: ($F(2,44)=5,49$; $p<0,0093$); **Porcentagem de tempo no anel externo**: ($F(2,44)=10,49$; $p<0,0093$); **Velocidade média de natação**: ($F(2,44)=17,18$, $p<0,0001$). Não houve alteração em relação às interações entre os fatores Grupo e TIME BIN [**Comprimento do trajeto**: ($F(2,44)= 0,11$; $p<0,8717$; **Porcentagem de permanência no quadrante crítico**: ($F(2,44)=0,68$, $p<0,5109$); **Velocidade média de natação**: ($F(2,44)=0,11$, $p<0,8658$)]. Portanto, os animais de ambos os grupos são capazes de extinguir a resposta previamente

aprendida. Ou seja, após o primeiro minuto, os animais tendem a deixar de explorar o local onde estava a plataforma.

É interessante notar que o comprimento do trajeto ($F(1,22)=0,19$; $p<0,6695$) (Figura 3A), assim como a velocidade de natação ($F(1,22)=0,17$; $p<0,6834$) (Figura 3E) não diferiu entre os grupos, sugerindo que os animais não exibem prejuízos motores associados à inoculação do veneno.

A diferença revelada teste post hoc de Tukey, comparando cada janela de um minuto separadamente revela diferenças significantes nos parâmetros de percentagem de tempo no quadrante crítico, porcentagem de tempo nos anéis central, interno e externo, sempre no primeiro minuto, como pode ser visto na Figura 3. Os animais do grupo “veneno” parecem não ter atingido um nível de proficiência semelhante ao grupo salina, na busca da plataforma no teste de memória de referência.

A extinção do comportamento previamente adquirido está preservada nos animais do grupo veneno. Isso é evidenciado pelo efeito significativo do fator Time Bin, principalmente no parâmetro que afere a percentagem de tempo no quadrante crítico ($F(1,22)=0,17$; $p<0,6840$), e ausência de diferença significativa neste mesmo parâmetro na interação entre Grupo e Time Bin ($F(2,44)=0,68$, $p<0,5109$) (Figura 3B).

Figura 3 - (A) Comprimento do trajeto, expresso em centímetros; (B) Porcentagem de tempo no quadrante crítico; (C) Porcentagem de tempo no anel central; (D) Porcentagem de tempo no anel intermediário; (E) Porcentagem de tempo no anel externo e , por fim, (F) Velocidade de natação, expresso em centímetros por segundo em função das janelas de um minuto, no probe test do labirinto aquático de Morris. Note que apenas para efeitos de representação calculou-se a média (- E.P.M) das janelas de cada minuto para os diferentes escores. * $p < 0,05$ no teste Post-hoc.

Memória Operacional Espacial

Os resultados do teste de memória operacional são mostrados na Figura 4.

A ANOVA revelou a existência de efeitos significantes em relação aos fatores Grupo [**Latência:** ($F(1,22)=1,69; p<0,0391$) (Figura 4A); **Comprimento do trajeto:** ($F(1,22)=2,14; p<0,0314$) (Figura 4B)] ITI [**Latência:** ($F(1,22)=9,90, p<0,0001$); **Porcentagem de tempo no quadrante do dia anterior:** ($F(1,22)=13,50; p<0,0013$); **Frequencia no contador do dia anterior:** ($F(1,22)=13,50; p<0,0013$), ou seja, as condições de intervalo são diferentes para alguns parâmetros, i.e., a tarefa é facilitada pelo ITI igual a zero] e Tentativa [**Latência:** ($F(2,44)=59,15; p<0,0001$); **Comprimento do trajeto:** ($F(2,44)=44,64; p<0,0001$) **Porcentagem de tempo no quadrante do dia anterior:** ($F(2,44)=12,23; p<0,0001$); **Frequencia no contador do dia anterior:** ($F(2,44)=33,82; p<0,0001$). Isto deve-se ao fato de que os animais retêm e utilizam as informações das primeiras tentativas].

A ANOVA revelou ainda a existência de interação significativa entre os fatores Grupo e ITI [**Latência:** ($F(1,22)=6,39; p<0,0192$) (Figura 4A); **Comprimento do trajeto:** ($F(1,22)=6,14; p<0,0214$) (Figura 4B); **Porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior:** ($F(1,22)=2,29; p<0,0441$) (Figura 4C); **Frequencia no contador do dia anterior:** ($F(1,22)=5,58; p<0,0280$) (Figura 4D)].

As interações entre os fatores Grupo, ITI e Tentativa retornaram efeitos significativos [**Latência:** ($F(2,44)=2,47; p<0,0312$); **Comprimento do trajeto:** ($F(2,44)=3,91; p<0,0194$); **Porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior:** ($F(2,44)=1,75; p<0,0417$); **Frequencia no contador do dia anterior:** ($F(2,44)=1,59; p<0,0512$). Isto permite avaliar que o teste de memória operacional revelou prejuízos severos do grupo experimental demonstrado pelas diferenças nas análises de latência (Figura 4A)

($F(2,44)=2,47$; $p<0,0312$) e comprimento do trajeto (Figura 4B) ($F(2,44)=3,91$; $p<0,0194$) quando o ITI foi 10 minutos. Em todos os parâmetros quando o ITI é virtualmente 0, exceto na porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior, os animais exibem performance semelhante aos controles, isso quer dizer que há uma relação temporal para a perda da informação acerca da localização da plataforma. Ou seja, apenas quando há intervalo os animais do grupo veneno têm pior desempenho.

No parâmetro que afere porcentagem de tempo no quadrante onde a plataforma se encontrava no dia anterior, houve diferença apenas no ITI 0 ($F(1,22)=3,27$; $p<0,0422$) (Figura 4C), ou seja, quando não há intervalo os animais persistem em buscar a plataforma no local do dia antecedente. Em outras palavras, quando não há tempo para que o animal configure novas relações espaciais sobre a nova localização da plataforma, este persiste em buscar no local previamente conhecido.

Para o ITI de 10 minutos houve diferença na análise tentativa/grupo nos parâmetros latência e comprimento do trajeto evidenciando que o grupo controle retém a informação sobre a localização da plataforma, obtida na primeira tentativa, para melhorar o desempenho nas tentativas subseqüentes, enquanto o grupo veneno parece não usar tão bem essa informação.

Figura 4 – Média da (A) Latência (em segundos), (B) Comprimento do trajeto (em centímetros), (C) Porcentagem de permanência no quadrante crítico do dia anterior e (D) Frequência no contador crítico do dia anterior, em função de 3 tentativas nas fases 1 (foram incluídas as sessões 01 a 04), em que o ITI foi igual a 10 minutos, e 2 (foram incluídas as sessões 05 a 07), em que o ITI foi virtualmente igual a zero, no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris. * $p < 0,05$ no teste post-hoc.

Plataforma Visível

Os resultados do teste com a plataforma visível são apresentados na Figura 5.

A ANOVA revelou ausência de diferenças significantes em relação aos fatores Grupo [Latência: ($F(1,22)=1,26; p<0,2741$) (Figura 5A);

Comprimento do trajeto: ($F(1,22)=0,56;p<0,4622$) (Figura 5B) e **Velocidade média de natação:** ($F(1,22)=0,39;p<0,5499$) (Figura 5C)] e Tentativa [Latência: ($F(2,44)=2,00;p<0,1479$); **Comprimento do trajeto:** ($F(2,44)=2,18;p<0,1270$) e **Velocidade média de natação:** ($F(2,44)=0,25;p<0,7820$), assim como na interação entre Grupo e Tentativa [Latência: ($F(2,44)=1,51;p<0,2312$) e **Velocidade média de natação:** ($F(2,44)=0,39;p<0,6787$)]. Interessantemente, porém, a ANOVA revelou efeito significativo na interação entre Grupo e Tentativa em relação ao **Comprimento do trajeto** ($F(2,44)=3,34;p<0,0464$), indicando que esse parâmetro variou diferentemente ao longo das tentativas (Figura 5B). Esse resultado sugere que os animais controle exibem maior flexibilidade para lidar com a alteração na localização da plataforma que, neste caso, ocorre a cada tentativa, diferindo dos animais injetados com veneno.

Em resumo, o teste da plataforma visível mostrou que os animais tratados com o veneno não exibiam prejuízos sensoriais ou motores, mas exibem menor flexibilidade para lidar com a variação na localização da plataforma entre as tentativas.

Figura 5 – (A) Latência (expresso em segundos); (B) Comprimento do trajeto (expresso em centímetros) e (C) Velocidade média de natação (expressa em centímetros por segundo), em função das 3 tentativas da única

sessão do teste da plataforma visível no labirinto aquático de Morris. # $p < 0,05$, post-hoc entre as tentativas de um mesmo grupo.

Labirinto em Cruz Elevado

Os resultados do teste no labirinto em cruz elevado são apresentados na Figura 6.

A ANOVA revelou diferenças significantes em relação ao fator Grupo na **porcentagem de tempo nos braços abertos** ($F(1,21)=4,28$; $p < 0,0283$) (Figura 6A) e **porcentagem de entradas nos braços abertos** ($F(1,21)=1,34$; $p < 0,0283$) (Figura 6B).

Quanto ao fator sessão de exposição, a ANOVA revelou ausência de diferenças significantes nos parâmetros **porcentagem de entradas nos braços abertos** ($F(1,21)=2,92$; $p < 0,1465$). No entanto, para o parâmetro **número total de entradas nos braços fechados** ($F(1,21)=13,95$; $p < 0,0022$) (Figura 6C) houve efeito significativo no fator exposição, bem como neste fator para o parâmetro de **porcentagem no quadrado central** ($F(1,21)=5,03$; $p < 0,0414$) (Figura 6D).

A ANOVA revelou efeitos significantes para a interação entre sessão de Exposição e Grupo em relação aos parâmetros **porcentagem de tempo nos braços abertos** ($F(1,21)=4,53$; $p < 0,0221$) e **porcentagem de entradas nos braços abertos** ($F(1,21)=3,41$; $p < 0,0381$), o que indica que o grupo salina alterou seu comportamento em função da primeira exposição de forma mais efetiva que o outro, isto pode decorrer em função de prejuízos de memória do grupo veneno.

A porcentagem de tempo que o animal despende nos braços abertos assim como a porcentagem de entradas nos braços abertos, é indicativa dos níveis de ansiedade. A Figura 6 mostra que os animais do grupo veneno exploram proporcionalmente menos os braços abertos em relação ao grupo salina, ou seja, apresentaram maiores níveis de ansiedade

A porcentagem de entradas nos braços abertos mostra que os animais do grupo veneno, mais que os controle, evitaram entrar nos braços abertos . Note na figura 6C e tome como base a primeira exposição, é possível perceber que quando o ambiente é desconhecido os animais do grupo experimental relutam em explorar o novo ambiente com características aversivas.

Efeito interessante pode-se observar no parâmetro que afere o número de entradas nos braços fechados (Figura 6D). Este dado é indicativo da atividade motora dos animais, ou seja, os animais não exibiam prejuízos locomotores que interferissem na realização da tarefa.

Como medida da tomada de decisões e avaliação do risco envolvido na exploração dos novos ambientes é mensurada a porcentagem de tempo que o animal permanece no quadrado central do aparelho (Figura 6E) (zona entre os 4 braços). Não houve qualquer alteração estatística neste parâmetro no que se refere aos grupos ($F(1,21)=0,63;p<0,2971$). Isso indica que o poder de decidir e avaliar os riscos está íntegro nos animais envenenados.

Figura 6 – Médias (+ E.P.M) (A) da porcentagem de tempo em que o animal permaneceu nos braços abertos, (B) da porcentagem de tempo em que o animal permaneceu nos braços fechados, (C) do número total de entradas nos braços abertos, (D) do número total de entradas nos braços fechados e (E) da porcentagem de tempo em que o animal permaneceu no quadrado central, nas primeira e segunda tentativas de exposição do labirinto em cruz elevado. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente conjunto de experimentos mostraram, pela primeira vez, que os animais submetidos a uma única injeção do veneno de *Crotalus durissus terrificus* exibem (1) prejuízo de desempenho no teste de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris. (2) Integridade no poder de extinguir memórias prévias, avaliado no Probe Test.

- (3) Prejuízos no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris.
- (4) Ausência de prejuízos sensoriais, avaliado no teste da plataforma visível no labirinto aquático de Morris e (5) aumento nos níveis de ansiedade avaliada no labirinto em cruz elevado.

No conjunto, esses resultados sugerem que a ação neurotóxica do veneno parece estar relacionada ao funcionamento de estruturas da formação hipocampal.

Mello e Cavaleiro (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. Os autores observaram ainda lesões no hipocampo dos animais e em regiões mais distantes do sítio de aplicação, como o hipotálamo.

Estudos anteriores envolvendo a administração sistêmica do veneno bruto em animais de laboratório descrevem estados convulsivos e síndromes neurológicas, como a rotação do corpo no eixo longitudinal e movimentos conhecidos como “wet dog shake” (agitação do corpo semelhante aos que cães molhados executam) (Barrio, 1961; Alexander *et al.*, 1988; Torrent *et al.*, 2007).

Curiosamente, esses tipos de manifestações não foram observadas no presente conjunto de experimentos sugerindo que a dose utilizada neste estudo foi menor que a utilizada nesses estudos. Mesmo assim houve marcados prejuízos cognitivos dos animais, permitindo inferências no sentido de que há componentes no veneno que não apenas atravessam a BHE como induzem alterações em estruturas nervosas envolvidas em tarefas dependentes da memória espacial, e particularmente memória operacional.

Memória de Referência Espacial

Sabe-se que tarefas que exigem orientação espacial dependem da função hipocampal para sua realização (Xavier et. al., 1999). Os dados obtidos no labirinto aquático de Morris demonstram que os animais tratados com o veneno de *Cdt* exibiram marcado prejuízo nos testes de memória de referência e operacional.

No teste de memória de referência, inicialmente todos os animais exibem escores semelhantes, pois, todos são ingênuos. Ao longo das sessões de experimento os animais adquirem a informação da localização da plataforma e melhoram gradualmente seu desempenho. Os animais do grupo veneno, primeiramente, não adquirem essa informação tão bem como os controles e, por fim, não atingem o mesmo nível de desempenho que o dos controles, ao final das sessões de treino. Note os parâmetros de latência (Figura 2A), comprimento do trajeto (Figura 2B) e ângulo inicial de divergência em relação à plataforma (Figura 2F) do teste de memória de referência refletem, já a partir da terceira sessão, evidente prejuízo de desempenho dos animais do grupo veneno em relação aos controles. Esses dados são consistentes com dados da literatura que relatam prejuízos de memória espacial no labirinto aquático de Morris (e.g. Morris, 1981; Morris, 1983; Conrad e Roy, 1993; Jeon *et al.*, 2010) após danos hipocampais..

Deve-se notar, porém, que apesar dos animais do grupo veneno apresentarem aquisição mais lenta e desempenho significativamente inferior ao dos animais do grupo controle, esses animais exibem alguma melhora ao longo do treinamento na tarefa. Portanto, os animais de grupo veneno

parecem capazes de adquirir informação relevante sobre a tarefa e retê-la entre as sessões de teste.

Xavier e cols. (1999) utilizando animais submetidos a lesão seletiva das células do giro denteado observaram marcado prejuízo em tarefas espaciais, embora os animais pudessem obter diferentes graus de melhora ao longo do treino. Os autores propuseram que isto poderia dever-se ao fato dos animais lesados utilizarem outras estratégias de orientação espacial, possivelmente envolvendo guiamento por pista preponderante ou orientação egocêntrica, mas não mapeamento cognitivo, o que possibilitaria melhorar ao longo do treinamento repetitivo. O uso de outras estratégias espaciais quando só é possível se guiar por pistas distais ou egocentricamente torna a busca menos eficiente e isso se reflete em escores piores dos que os obtidos por animais saudáveis. Além disso, é possível observar graficamente em vários estudos que usam o teste de memória de referência no labirinto aquático que os animais lesados exibem certa melhora (e.g., Shohan *et al.*, 2003; Sallai, 2005; Tanhoffer, 2006).

A integridade da formação hipocampal é de suma importância para o sistema de navegação envolvendo mapeamento cognitivo. As células granulares informam outras estruturas da formação hipocampal sobre os ângulos de incidência dos estímulos distais, como preconizado na teoria de O'Keefe e Nadel (1978).

As outras células que formam a formação hipocampal desempenham função igualmente importante na aquisição de memórias espaciais. A perda de células piramidais de CA1 e CA3 do hipocampo também gera marcados

prejuízos de memória de referência (Rogers *et al.*, 1989; Conrad e Roy, 1993; Scheff *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados no teste de memória de referência apontam que o veneno de *Cdt* gera prejuízos de memória de referência espacial condizentes com os apresentados por animais com lesão hipocampal; no entanto, o mecanismo que leva a esse resultado permanece ainda desconhecido. Hipóteses acerca da fisiopatologia destes eventos serão discutidas adiante (ver discussão geral).

A análise das Figuras 2C, 2D e 2E mostra como os animais dos diferentes grupos evoluíram na exploração da piscina ao longo da tarefa. Inicialmente, quando os animais são ingênuos, espera-se que eles se mantenham a maior parte do tempo no anel externo (Figura 2E), isto é, próximo a parede. Quando o rato percebe que não há escape pelas altas paredes da piscina, este começa a esquadrinhar as porções mais centrais da piscina (onde se encontra a plataforma). Ao longo das sessões, quando informações sobre a localização da plataforma são adquiridas, o animal passa a permanecer mais tempo nos anéis mais internos (Figuras 2C e 2D) em detrimento da permanência no anel próximo à parede.

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta – Probe Test

No teste de avaliação da memória de referência e de extinção da resposta adquirida – “Probe test” – não foram observadas diferenças entre os grupos. Isto é, os parâmetros utilizados para avaliar o desempenho dos

animais não parecem ter sido suficientemente sensíveis para revelar diferenças de desempenho entre os animais do grupo veneno e controle.

Existem estudos mostrando que lesões seletivas à algumas porções do hipocampo, sobretudo CA1, levam a persistência de busca a um local previamente aprendido. Por exemplo, Milani e cols. (1998), ao observarem ratos com lesões no sub-campo 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 presente conjunto de experimentos esse fenômeno não foi revelado. Não está claro se isso decorre de um menor, embora não significativo, nível de desempenho dos animais do grupo veneno no primeiro Time Bin, refletindo-se numa queda menos acentuada nos demais Time Bins (Figura 3) ou se de fato essa persistência na busca por um local previamente reforçado não ocorreu nos animais envenenados. Em outras palavras, note que já no primeiro minuto a porcentagem de tempo que os animais do grupo veneno permanecem no quadrante crítico (Figura 3B) está diminuída, o que pode estar relacionado ao fato desses animais não terem alcançado desempenho assintótico no teste de memória de referência.

A Figura 3A mostra que não há diferenças entre os grupos em relação ao comprimento do trajeto. Portanto, também não houve diferenças entre os grupos em relação à velocidade média de natação (Figura 3F). Estes dados permitem descartar a hipótese de que teria havido comprometimentos motores depois de passados os efeitos agudos do envenenamento.

Memória operacional espacial

Achados extremamente interessantes foram encontrados no teste de memória operacional do labirinto aquático de Morris. Este teste avalia a capacidade dos animais de manterem informações de natureza espacial temporariamente na memória, por períodos variáveis de tempo. Esse tipo de avaliação foi possível, pois a cada dia de teste a localização da plataforma foi alterada; então, na primeira tentativa o animal deve encontrar a plataforma por busca e escaneamento. Depois da primeira tentativa, quando a informação sobre a localização da plataforma naquele dia foi obtida, o animal pode utilizar essa informação para as demais tentativas daquele dia. Variando-se o ITI pode-se avaliar por quanto tempo essa informação é mantida na memória operacional. E os resultados desse teste mostraram que os animais do grupo veneno exibem maior prejuízo de desempenho quando o ITI é maior.

Segundo Olton e cols. (1979), a formação hipocampal seria responsável pelo 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 sempre no mesmo local ao longo dos vários dias de treino e, portanto, a informação de um dia é relevante para outro dia. Em contrapartida, o contexto temporal se torna particularmente relevante quando a informação sobre a localização da plataforma é crítica apenas para as tentativas daquele dia, deixando de ser útil para as tentativas de outros dias.

As observações relativas aos parâmetros de latência (Figura 4A) e comprimento do trajeto (Figura 4B) estão rigorosamente de acordo com

diversos achados de outros estudos que demonstraram prejuízos de memória operacional após intervenções na 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). A relação entre o ITI e o prejuízo parece plausível na medida em que mostra que quanto maior o ITI maior o prejuízo nesse tipo de memória. Em contraste, quando o ITI é igual a zero, o desempenho dos animais do grupo veneno se assemelha ao dos animais do grupo controle (Figuras 4A e 4B).

É interessante notar que a persistência do comportamento de busca dos animais lesados no local em que a plataforma foi apresentada no dia anterior, expresso por meio da percentagem de tempo no quadrante do dia anterior, dependeu do ITI (Figura 4C). Isto é, quando o ITI foi “zero” minutos, os animais do grupo veneno persistiram na busca pela plataforma no local em que a mesma se encontrava no dia anterior, em relação os animais do grupo controle. Diferentemente, quando o ITI foi 10 minutos, o comportamento dos animais do grupo veneno não diferiu do dos animais controle. Aparentemente, os animais envenenados prendem-se mais ao local em que a plataforma foi apresentada no dia anterior se o ITI foi virtualmente zero, sugerindo que sua flexibilidade comportamental encontra-se prejudicada pelo “treinamento intensivo”. Em conjunto, os resultados sugerem que ao mesmo tempo que o treinamento com ITI igual a zero facilita o desempenho da tarefa em relação ao treinamento com ITI igual a 10 minutos, isso gera uma redução da flexibilidade comportamental dos animais envenenados, efeitos estes típicos de animais com disfunções na formação hipocampal

Plataforma Visível

O teste da plataforma visível foi inicialmente proposto para avaliar se os animais tratados com veneno de *Cdt* exibiam prejuízos decorrentes de funções não cognitivas, por exemplo, deficiências sensoriais e/ou motoras. E de fato, o teste cumpriu essa função. Interessantemente, porém, além de permitir descartar a possibilidade de que os resultados obtidos têm relação com deficiências sensoriais e motoras, o teste revelou também a falta de flexibilidade dos animais submetidos à administração do veneno em lidar com alterações nas contingências ambientais.

Isto é, na primeira tentativa quando a situação é completamente nova para todos os animais, não houve diferenças de desempenho entre os grupos (Figuras 5A e 5B). Porém, na segunda e demais tentativas, observou-se melhora de desempenho do grupo controle, e ausência da mesma melhora nos animais do grupo veneno. É importante lembrar que a localização da plataforma visível foi alterada em cada tentativa, de modo que a melhora observada nos animais controle não pode ser atribuída à memória espacial envolvendo a localização da plataforma nas tentativas anteriores. Portanto, parece mais plausível interpretar que os animais controle aprenderam que a localização da plataforma era identificável pela pista visual a ela associada e se alterava a cada nova tentativa; assim, bastaria localizar o estímulo visível e nadar em sua direção. Isso explica a redução da latência e do trajeto observados já a partir da segunda tentativa (Figuras 5A e 5B). O mesmo não parece ter ocorrido com os animais do grupo veneno, que parecem lidar com a situação da mesma maneira ao longo das três tentativas

do teste, indicando que não houve aquisição daquela habilidade. Congruente com essa interpretação é o fato de que o ITI no teste da plataforma visível foi de 10 minutos, intervalo em que, conforme os resultados nos testes anteriores (de memória de referência e de memória operacional), há prejuízo de desempenho dos animais envenenados.

Labirinto em Cruz Elevado

O aumento dos níveis de ansiedade já havia sido apontada como uma característica de uma das toxinas, a crotoxina, do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, quando os testes foram realizados cerca de 2 horas depois da administração da toxina. Isto é, usando o teste do campo aberto, Moreira e cols. (1996) verificaram que a crotoxina, maior componente deste veneno, era capaz de induzir aumento nos níveis de ansiedade e redução da exploração do novo ambiente. Em 1997, o mesmo grupo de autores fez testes de interação social e o teste de “hole-board”, também com administração da toxina 2 horas antes dos testes, e encontraram resultados similares. Em estudo posterior os mesmos autores (2000) testaram se o diazepam e flumazenil (benzodiazepinas ansiolíticas) antagonizavam os efeitos ansiogênicos da toxina, novamente administrada 2 horas antes dos testes, o que de fato ocorreu. Baseados nisto, os autores propuseram que o sistema gabaérgico (sítio de ação das benzodiazepinas) estaria envolvido na gênese aguda de ansiedade por parte do veneno de *Crotalus*. O ácido gama-aminobutírico (GABA) é comumente um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso de diversos mamíferos. O sistema gabaérgico tem grande

importância em diversas estruturas inclusive hipocampo e sistema septo-hipocampal (Gray, 1982; Wilson, 1996).

Os resultados do presente estudo estendem essas observações ao mostrar que a administração de uma única dose do veneno leva a um aumento nos níveis de ansiedade até aproximadamente 4 semanas depois de sua administração (Figura 6) portanto, depois que os efeitos agudos do veneno já haviam sido eliminados.

Evidências experimentais prévias apóiam a noção de que o hipocampo participa na gênese da ansiedade (Gray, 1982). Sallai (2005) usando ratos submetidos a tratamento com radiação ionizante, a qual gerava extensa lesão hipocampal, confirmou que a lesão alterava os níveis de ansiedade dos animais em relação aos controles.

Ainda em relação a este aspecto, Bannerman e col. (2004) sugeriram que as porções ventrais e dorsais do hipocampo subjazem processamentos distintos. A porção dorsal relacionar-se-ia com o contexto espacial da tarefa e a porção ventral com o processamento do contexto emocional.

Wall e Messier (2000) defendem que situações estressantes poderiam gerar prejuízo de memória operacional e outros processos hipocampo-dependentes; ou seja, é possível que haja interferência mútua entre os processos que desencadeiam a ansiedade e a memória (no caso operacional espacial).

Os dados encontrados no labirinto em cruz elevado mostram que o veneno de *Cdt* produz aumento duradouros dos níveis de ansiedade em ratos, que se mantêm muito além os efeitos agudos que se seguem ao envenenamento, o que pode apoiar a hipótese que vem sendo defendida no

presente estudo, de que é a possível lesão hipocampal, decorrente do envenenamento, a principal responsável pelos resultados obtidos nos diferentes testes.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente conjunto de experimentos mostraram que uma única injeção do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* produz prejuízos comportamentais em tarefas de navegação espacial, particularmente nas de memória operacional, e eleva os níveis de ansiedade, testados semanas depois da injeção, sugerindo que esses efeitos estão relacionados com alterações permanentes no sistema nervoso central desses animais, mesmo quando inoculado sistemicamente.

Esses achados têm grande importância por se constituir na primeira demonstração de que ocorrem prejuízos cognitivos após uma única dose sub-letal sistêmica do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Embora não se possa transpor o presente conjunto de resultados diretamente para seres humanos, estes resultados levam à hipótese de que tais prejuízos também estão presentes em vítimas de acidentes crotálicos, particularmente nas que receberam anti-veneno depois de longo intervalo de tempo do envenenamento, e em que a dose do veneno, dedutível indiretamente por meio de evidências clínicas (e.g., níveis de creatinoquinase circulantes), foram relativamente maiores.

Além disso, esses resultados ressaltam a importância de se ampliar nosso conhecimento acerca da fisiopatologia do envenenamento,

particularmente em relação ao tecido nervoso, que parece permanentemente afetado após o envenenamento.

Os resultados envolvendo prejuízos de memória e aumento nos níveis de ansiedade sugerem que a formação hipocampal seria uma das estruturas nervosas afetadas pelo veneno crotálico.

CAPÍTULO 2

Soro anticrotálico minimiza prejuízos de memória espacial quando administrado até 10 horas após a administração sistêmica de veneno de *Crotalus durissus terrificus*, em ratos

INTRODUÇÃO

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-imune. Isso ficou ainda mais evidente 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, a forma utilizada 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, Instituto Butantan e 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 *Lachesis muta*) e o anti-elapídico (contra o veneno de *Micrurus frontalis*). Não por acaso, estes são os tipos mais comuns de acidentes ofídicos.

É importante ressaltar que os soros são fármacos preventivos de lesões, ou seja, eles atuam como neutralizadores do envenenamento, a *posteriori*. Por isso, torna-se recomendável a administração do anti-veneno o mais rápido possível após o acidente.

Ademais, uma vez que os experimentos descritos no capítulo 1 deste trabalho mostraram que uma única administração do veneno bruto de cascavel, sistemicamente, em dose sub-letal, produz prejuízos permanentes de memória espacial, além de aumento dos níveis de ansiedade em ratos Wistar, é pertinente indagar sobre a eficácia do soro anticrotálico em prevenir esses prejuízos comportamentais.

Os experimentos incluídos neste capítulo almejam avaliar dois aspectos. O primeiro refere-se à efetividade do soro comercial anticrotálico na prevenção dos prejuízos cognitivos observados após a injeção do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*. O segundo aspecto refere-se ao curso temporal dessa prevenção. Isto é, até quanto tempo após o envenenamento a administração de soro é capaz de prevenir os prejuízos comportamentais observados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e constituição dos grupos experimentais

Foram utilizados 89 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.

Os animais foram agrupados e tratados conforme especificado na Tabela 2. Note que tanto o volume de soro anticrotálico como a quantidade de veneno injetado foram calculados para cada animal em função de seu peso corpóreo. A diluição do veneno se deu em 1 mg/mL; então, cada animal recebeu cerca de 1,2mL/kg de solução, mais o volume de anti-veneno, quando aplicável.

Tabela 02 – Constituição dos grupos incluídos neste experimento (entre parênteses, o número de animais em cada grupo) e respectivo tratamento. A administração de veneno de *Crotalus durissus terrificus* (na dose de 1200 µg/kg em 1,2mL/kg) concomitante ou seguida da de soro com quantidade suficiente para neutralizar a ação do veneno injetado (~ 0,5mL dependendo do peso do animal) foram efetivadas por via intraperitoneal.

Grupo (denominação)	Tratamento
Salina (n=11)	Solução de NaCl a 0,9%
Veneno (n=13)	1200 µg/kg de veneno
Soro (n=13)	Soro anti-crotálico
Veneno + Soro 0 (Zero) (n=11)	1200 µg/kg de veneno e de soro anti-crotálico 0 (zero) hora depois
Veneno + Soro 0,5 (30 min) (n=12)	1200 µg/kg de veneno e soro anti-crotálico meia hora depois
Veneno + Soro 2 (120 min) (n=10)	1200 µg/kg de veneno e soro anti-crotálico 2 horas depois
Veneno + Soro10 (10 horas) (n=9)	1200 µg/kg de veneno e soro anti-crotálico 10 horas depois
Veneno + Soro 24 (24 horas) (n=10)	1200 µg/kg de veneno e soro anti-crotálico 24 horas depois

Obtenção do Veneno e do soro

O “pool” de veneno liofilizado de *Crotalus durissus terrificus*, bem como o soro anti-crotálico foram fornecidos pelo Instituto Butantan de São Paulo. Para inoculação, o veneno foi veiculizado em solução de NaCl 0,9% e,

assim como o soro, administrado por via intraperitoneal. Após 7 dias do envenenamento iniciaram-se os testes comportamentais.

Labirinto aquático de Morris

O aparelho e metodologia utilizados envolvendo o labirinto aquático de Morris (1981) foram exatamente os mesmos descritos no capítulo 1.

Análise estatística

A análise estatística foi semelhante à descrita no capítulo 1.

RESULTADOS

Memória de referência

Com a finalidade de facilitar a visualização dos resultados, as figuras foram organizadas de modo que os resultados dos grupos que exibiram prejuízo de desempenho em relação aos animais tratados apenas com soro, como revelado pela ANOVA (ver adiante), foram apresentados no lado esquerdo da figura; os demais grupos foram apresentados no lado direito. Cada um dos parâmetros foi apresentado numa figura distinta, para facilitar sua visualização.

Os resultados do teste de memória de referência são apresentados nas Figuras 7 (latência), 8 (comprimento do trajeto), 9 (porcentagem de tempo no quadrante crítico), 10 (porcentagem de tempo no anel central), 11

(porcentagem de tempo no anel intermediário), 12 (porcentagem de tempo no anel externo) e 13 (ângulo inicial de divergência em relação à localização da plataforma).

A ANOVA revelou a existência de efeitos significantes em relação aos fatores Grupo [para os parâmetros **Latência**: ($F(7,81)=5,41$; $p<0,0001$) (Figura 7); **Comprimento do trajeto**: ($F(7,81)=5,81$; $p<0,0001$) (Figura 8); **Porcentagem de tempo no anel central**: ($F(7,81)=5,12$; $p<0,0001$) (Figura 10); **Porcentagem de tempo no anel externo**: ($F(7,81)=2,82$; $p<0,0111$) (Figura 12); e **Ângulo inicial de divergência em relação à localização da plataforma**: ($F(7,81)=4,20$; $p<0,0005$) (Figura 13), Sessão [**Latência**: ($F(11,891)=110,28$; $p<0,0001$) (Figura 7); **Comprimento do trajeto**: ($F(11,891)=68,43$; $p<0,0001$) (Figura 8); **Porcentagem de tempo no anel central**: ($F(11,891)=58,86$; $p<0,0001$) (Figura 10); **Porcentagem de tempo no anel intermediário**: ($F(11,891)=119,76$; $p<0,0001$) **Porcentagem de tempo no anel externo**: ($F(11,891)=209,82$; $p<0,0001$) (Figura 12); e **Ângulo inicial de divergência em relação à localização da plataforma**: ($F(11,891)=25,02$; $p<0,0001$) (Figura 13) e Tentativa [**Latência**: ($F(1,81)=16,53$; $p<0,0001$); **Comprimento do trajeto**: ($F(1,81)=72,93$; $p<0,0001$) **Porcentagem de tempo no anel central**: ($F(1,81)=14,78$; $p<0,0001$); **Porcentagem de tempo no anel intermediário**: ($F(1,81)=30,43$; $p<0,0001$); **Porcentagem de tempo no anel externo**: ($F(1,81)=76,04$; $p<0,0001$) e **Ângulo inicial de divergência em relação à localização da plataforma**: ($F(1,81)=26,84$; $p<0,0001$).

A ANOVA revelou ainda interações significantes envolvendo os fatores Grupo e Sessão [**Latência**: ($F(77,891)=1,60$; $p<0,0016$); **Comprimento do**

trajeto: ($F(77,891)=1,84$; $p<0,0002$); **Porcentagem de tempo no quadrante crítico:** ($F(77,891)=2,03$; $p<0,0001$); **Porcentagem de tempo no anel central:** ($F(77,891)=1,70$; $p<0,0016$); **Porcentagem de tempo no anel intermediário:** ($F(77,891)=1,69$; $p<0,0006$); **Porcentagem de tempo no anel externo:** ($F(77,891)=2,51$; $p<0,0001$) **Ângulo de divergência inicial:** ($F(77,891)=1,90$; $p<0,0001$).

Houve, também, interação significativa para os fatores Sessão, Tentativa e Grupo [**Latência:** ($F(77,891)=2,09$; $p<0,0281$); **Comprimento do trajeto:** ($F(77,891)=1,99$; $p<0,0499$); **Ângulo de divergência inicial:** ($F(77,891)=2,02$; $p<0,0342$)].

Para efeito de comparação entre os diferentes grupos, a Tabela 03 mostra os valores de “p” para as comparações realizadas no post-hoc para os parâmetros de latência e comprimento do trajeto do teste de memória de referência do labirinto aquático de Morris.

Tabela 03 – Resultados das comparações Post-hoc (“vs” significa “versus”) envolvendo o fator grupo para os parâmetros de latência e comprimento do trajeto no teste de memória de referência do labirinto aquático de Morris.

Parâmetro	Grupos comparados	"p"
LATÊNCIA	Veneno vs zero	<.0001
LATÊNCIA	Veneno vs 30 min	<.0001
LATÊNCIA	Veneno vs 120 min	0.0029
LATÊNCIA	Veneno vs 10 horas	0.0008
LATÊNCIA	Veneno vs 24 horas	0.1294
LATÊNCIA	Veneno vs Soro	0.0003
LATÊNCIA	Veneno vs Salina	<.0001
LATÊNCIA	24 horas vs Salina	0,0017
LATÊNCIA	24 horas vs Soro	0,0122
LATÊNCIA	Salina vs Soro	0,4241
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs zero	<.0001
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs 30 min	<.0001
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs 120 min	0.0006
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs 10 horas	0.0024
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs 24 horas	0.024
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs Soro	<.0001

COMP. DO TRAJETO	Veneno vs Salina	<.0001
COMP. DO TRAJETO	24 horas vs Salina	0,0072
COMP. DO TRAJETO	24 horas vs Soro	0,0128
COMP. DO TRAJETO	Salina vs Soro	0,7709

A primeira comparação entre os grupos a se observar é entre o grupo salina, tido como um controle “puro”, e o grupo soro, tido como um controle para eventuais efeitos da administração isolada do soro. Não houve diferenças significantes entre esses grupos em relação aos parâmetros latência e comprimento do trajeto (Tabela 03), o que se repete na análise dos demais parâmetros. Portanto, o soro anticrotálico administrado isoladamente não gerou qualquer prejuízo de memória de referência espacial. Assim, o grupo soro foi utilizado como referência na comparação com os grupos expostos à administração de veneno acompanhado ou seguido de soro.

Ressalte-se que prejuízos no desempenho desta tarefa refletem-se diretamente tanto na latência, i.e., o tempo que o animal leva para encontrar a plataforma, como no comprimento do trajeto. Os grupos que exibiram maiores latências foram aqueles submetido à administração do veneno apenas, o que já era de fato esperado, e também o grupo que recebeu veneno com administração do soro 24 horas depois (Figura 7A e Tabela 03); ambos diferiram significativamente do grupo salina e do grupo soro. Nenhum outro grupo diferiu dos grupos salina e soro (tomados aqui como referência-controle) (Figura 7B). A interação entre os fatores Sessão e Grupo, quando significativa, indica que a taxa de aquisição da tarefa ao longo das sessões de treino diferiu. O teste Post hoc em relação a essas comparações confirmaram as observações acima descritas em relação ao fator Grupo.

Note que o grupo veneno diferiu significativamente em relação a todos os demais grupos, até mesmo o grupo que recebeu veneno seguido de soro 24 horas depois, sugerindo que em ratos o soro minimiza os prejuízos comportamentais do veneno de *Crotalus durissus terrificus* mesmo quando administrado 24 horas depois e que a eficiência da prevenção aumenta a medida que o intervalo de tempo entre o envenenamento e o tratamento com soro diminui (Figura 7).

Figura 7 – Médias (-E.P.M.) das latências, em função das 12 sessões no teste de memória de referência do labirinto aquático de Morris; (A) grupos prejudicados durante a tarefa em relação a um dos controles (soro) e (B) demais grupos.

Em relação ao comprimento do trajeto (Figura 8) a análise Post hoc revelou resultados semelhantes de latência (ver Tabela 3). As comparações entre os grupos revelaram as mesmas diferenças que as anteriores, ou seja, a comparação entre o grupo veneno e salina e entre veneno e soro foram estatisticamente diferentes (Tabela 03), assim como as comparações entre o grupo 24 horas e salina, e 24 horas e soro. O que demonstra, novamente, que estes grupos têm desempenho pior (Figura 8A).

É interessante notar que em relação a este parâmetro, novamente, os grupos 24 horas e veneno diferiram entre si; portanto, possivelmente o soro é capaz que prevenir, ainda que parcialmente, os prejuízos comportamentais do envenenamento. Os demais grupos não sofreram quaisquer prejuízos em relação aos animais controle (Figura 8B). A análise post hoc relativa à interação entre Sessão e Grupo exibiram padrão similar ao descrito acima.

Figura 8 – Médias ($\pm$ E.P.M) do comprimento do trajeto, em função das 12 sessões no teste de memória de referência no labirinto aquático de Morris; (A) grupos prejudicados em relação a um dos controles (soro) e (B) demais grupos.

Em relação à percentagem de tempo que o animal permaneceu no quadrante crítico, a ANOVA revelou ausência de diferenças significantes em relação ao fator Grupo. Porém, a ANOVA revelou a existência de interação significativa em relação à interação entre Sessão e Grupo ($F(77,891)=2,03; p<0,0001$). De fato, a taxa de aquisição da busca espacial nos animais dos grupos veneno e 24 horas foi mais lenta que a exibida pelos animais controle (Figura 9). O pós-teste de Tukey ainda revelou a existência de diferenças significantes nas sessões finais (sessões 10 e 12) do

experimento, particularmente entre os grupos 24 horas e veneno. Note que estes animais não atingem um desempenho próximo ao grupo soro (Figura 9A), enquanto este tem um aumento progressivo do tempo de permanência no quadrante crítico. Em relação aos demais grupos, novamente, não foram observadas diferenças significativas (Figura 9B).

Figura 9 – Médias (- E.P.M) da porcentagem de tempo no quadrante crítico, em função das 12 sessões no teste de memória de referência no labirinto aquático de Morris. (A) Grupos que apresentaram prejuízo em relação aos controles. Note que a curva de aquisição dos demais grupos (B) é mais acentuada.

O conjunto de resultados da porcentagem de tempo de permanência em nos anéis externo e central da piscina exibiu efeito sigificante para o fator grupo, como mencionado acima. Além disso, exisitiram diferenças na comparação do pós-teste com as interações de Sessão e Grupo; sobretudo, para o grupo veneno, isto é, o soro pode ter minimizado prejuízos de exploração do ambiente mesmo até 24 horas depois do envenenamento (Figuras 10A, 11A e 12A). Para os demais grupos não existiram diferenças (Figuras 10B, 11B e 12B).

Figura 10 – Médias (- E.P.M.) da porcentagem de tempo no anel externo, em função das 12 sessões no teste de memória de referência do labirinto aquático de Morris; (A) Grupos prejudicados em relação aos controles e (B) demais grupos.

Figura 11 - Médias (- E.P.M.) da porcentagem de tempo no anel intermediário, em função das 12 sessões no teste de memória de referência do labirinto aquático de Morris; (A) grupos prejudicados em relação aos controles e (B) demais grupos.

Figura 12 – Médias (- E.P.M) de porcentagem de tempo no anel intermediário, em função das 12 sessões no teste de memória de referência do labirinto aquático de Morris; (A) grupos prejudicados em relação aos controles e (B) demais grupos.

Resultados interessantes foram observados em relação ao parâmetro que ângulo inicial de divergência em relação à localização da plataforma (Figura 13). Este parâmetro exprime a precisão da orientação inicial do nado do animal em relação à localização da plataforma submersa. A ANOVA revelou diferenças significantes no fator Grupo ($F(7,81)=4,20; p<0,0005$). O *post hoc* mostrou que além do grupo veneno e 24 horas, o grupo 10 horas apresentou prejuízo em relação ao salina ($F(1,81)=11,61; p<0,0010$). Entretanto, talvez o fato que seja mais relevante, é que o grupo 120 min apesar de não diferir significativamente dos controles, também não difere do grupo veneno ($F(1,81)=2,27; p<0,1360$). Sugerindo que, ainda que não tão evidentemente, existam prejuízos pormenores mesmo quando os animais foram tratados com anti-veneno apenas 2 horas após o envenenamento.

A evolução durante as sessões, mensurada pela comparação no pós-teste da interação entre Sessão e Grupo, também mostrou diferenças

significantes ao que se refere às comparações dos grupos veneno, 24 horas e 10 horas com o Salina e Soro (controles).

Figura 13 – Médias (- E.P.M.) do ângulo de partida em relação à plataforma em função das 12 sessões no teste de memória de referência do labirinto aquático de Morris; (A) grupos prejudicados em relação aos controles (B) demais grupos.

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta – Probe Test

Os resultados do Probe test estão apresentados nas figuras 14 (comprimento do trajeto), 15 (porcentagem de permanência no quadrante crítico) e 16 (velocidade de natação).

Conforme esperado, pois não houve diferenças quanto à extinção das memórias previamente adquiridas pelo grupo veneno, conforme o capítulo 1, a ANOVA não revelou diferenças quanto ao fator Grupo, ao que se refere a processos de extinção de resposta adquirida, demonstrado pelo parâmetro de **Porcentagem de permanência no quadrante crítico** ($F(7,81)=1,25$;

$p < 0,2823$ (Figura 15). Entretanto, houve efeito significativo no fator Grupo nos parâmetros: **Comprimento do trajeto** ($F(7,81)=2,64$, $p < 0,0163$) (Figura 14) e, por consequência, na **Velocidade média de natação** ($F(7,81)=2,64$; $p < 0,0165$) (Figura 16).

Houve diferença significativa no fator "TIME BIN" (janela de tempo de 1 minuto) [**Comprimento do trajeto**: ($F(2,162)=100,73$, $p < 0,0001$; **Porcentagem de permanência no quadrante crítico**: ($F(2,162)=46,77$, $p < 0,0001$); **Velocidade média de natação**: ($F(2,162)=101,61$, $p < 0,0001$)] e em relação às interações entre os fatores Grupo e TIME BIN [para os parâmetros **Comprimento do trajeto**: ($F(14,162)= 2,71$; $p < 0,0019$); **Velocidade média de natação**: ($F(14,162)=2,69$, $p < 0,0020$)]. Interessantemente, nesta mesma interação não houve diferença para o parâmetro **Porcentagem de permanência no quadrante crítico** ($F(14,162)=1,62$, $p < 0,1471$), o que indica que a capacidade de deixar de exibir uma resposta previamente adquirida está íntegro nestes animais. Tais diferenças encontradas no fator Grupo e na interação entre Grupo e "TIME BIN", as quais não eram esperadas, podem ser fruto do desempenho díspar do grupo 10 horas, que, de fato, foi o único grupo a apresentar diferenças entre grupos no post-hoc (tabela 04).

Para sintetizar as diferenças entre grupos, na tabela 04 é fornecida a síntese dos resultados do post-hoc para o fator Grupo nos parâmetros de comprimento do trajeto e velocidade média de natação.

Tabela 04 - Resultados das comparações Post-hoc ("vs" significa "versus") envolvendo o fator grupo para os parâmetros de comprimento do trajeto e velocidade no probe test do labirinto aquático de Morris.

Parâmetro	Grupos comparados	"p"
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs Salina	0.528
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs Soro	0.3206

COMP. DO TRAJETO	Zero vs Salina	0.974
COMP. DO TRAJETO	Zero vs Soro	0.6842
COMP. DO TRAJETO	30 min vs Salina	0.1941
COMP. DO TRAJETO	30 min vs Soro	0.1384
COMP. DO TRAJETO	120 min vs Salina	0.3231
COMP. DO TRAJETO	120 min vs Soro	0.2855
COMP. DO TRAJETO	10 horas vs Salina	0.0254
COMP. DO TRAJETO	10 horas vs Soro	0.0263
COMP. DO TRAJETO	24 horas vs Salina	0.2252
COMP. DO TRAJETO	24 horas vs Soro	0.2366
VELOCIDADE	Veneno vs Salina	0.6388
VELOCIDADE	Veneno vs Soro	0.3025
VELOCIDADE	Zero vs Salina	0.3628
VELOCIDADE	Zero vs Soro	0.1724
VELOCIDADE	30 min vs Salina	0.1982
VELOCIDADE	30 min vs Soro	0.1897
VELOCIDADE	120 min vs Salina	0.3963
VELOCIDADE	120 min vs Soro	0.2768
VELOCIDADE	10 horas vs Salina	0.0082
VELOCIDADE	10 horas vs Soro	0.0255
VELOCIDADE	24 horas vs Salina	0.1298
VELOCIDADE	24 horas vs Soro	0.0726

Fato importante a se considerar neste teste é que o soro anticrotálico, por si, também não gera prejuízos no sentido do animal deixar de exibir uma resposta prévia, isso é demonstrado pela ausência de diferença global entre o grupo salina e soro em qualquer um dos parâmetros.

Houve diferença na velocidade média de natação entre os grupos ($F(7,81)=0,91$; $p<0,498$) (Figura 15) aparentemente isso deve-se às alterações no parâmetro comprimento do trajeto. Isto é, note que, por algum motivo, alguns grupos (120 minutos e 10 horas) nadaram menos neste teste (Figura 14B).

Figura 14 – Médias (-E.P.M) do comprimento do trajeto, em centímetros, em função de janelas de 1 minuto, no probe test. (A) grupo prejudicados em relação aos controles (B) os demais grupos.

Figura 15 - Médias (-E.P.M) da porcentagem de tempo de permanência no quadrante crítico, em função de janelas de 1 minuto no probe test. (A) grupos prejudicados em relação aos controles (B) os demais grupos.

Figura 16 - Médias (-E.P.M) da velocidade média de natação, expressa em centímetros por segundo, em função das janelas de 1 minuto no probe test. (A) grupos prejudicados em relação aos controles e (B) os demais grupos.

Memória Operacional

Os resultados do teste de memória operacional estão apresentados nas figuras 17 (latência), 18 (comprimento do trajeto) e 19 (porcentagem de tempo no quadrante do dia anterior).

A ANOVA não revelou a existência de efeitos significantes em relação aos fatores Grupo [para os parâmetros **Latência** ($F(7,81)=1,73$; $p<0,1138$) (Figura 17) e **Porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior**: ($F(7,81)=0,96$; $p<0,1858$) (Figura 19) o que deve-se a ausência de diferenças quando o ITI era 0 (para latência) e quando o ITI era 10 minutos (para porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior)]. Para comparação efetiva, ver os resultados da ANOVA para a interação dos fatores ITI e Grupo (ver adiante). Entretanto, para o mesmo fator Grupo, o parâmetro que apresentou diferença significativa foi o **Comprimento do trajeto**: ($F(1,22)=2,14$; $p<0,0314$) (Figura 18).

Os resultados da ANOVA para os fatores ITI [**Latência**: $F(1,81)=6,24$, $p<0,0145$); **Comprimento do trajeto**: $F(1,81)=5,56$; $p<0,0237$); **Porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior**: ($F(1,81)=43,17$; $p<0,0001$)], que informa que para cada condição de ITI o desempenho dos animais na tarefa foi diferente; para latência (Figura 17) e comprimento do trajeto (Figura 18) o melhor desempenho foi alcançado com ITI 0, ao passo que com ITI 10 minutos para porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior (Figura 19), e para o fator Tentativa [**Latência**: ($F(2,162)=226,73$; $p<0,0001$); **Comprimento do trajeto**: ($F(2,162)=210,81$; $p<0,0001$) e **Porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior**: ($F(2,162)=17,73$; $p<0,0001$)] apresentaram diferenças significantes.

As interações entre os fatores Grupo e ITI [**Latência**: ($F(7,81)=3,64$; $p<0,0018$); **Comprimento do trajeto**: ($F(7,81)=3,41$; $p<0,0030$); **Porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior**: ($F(7,81)=2,70$; $p<0,0694$)] e a interação entre os fatores ITI, Tentativa e Grupo revelou efeito significativo [**Latência**: ($F(7,81)=3,64$; $p<0,0018$); **Comprimento do trajeto**: ($F(7,81)=3,41$; $p<0,0030$); **Porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior**: ($F(7,81)=2,70$; $p<0,0694$)], isto é, o desempenho dos grupos diferem entre si ao longo das tentativas dependendo da condição de ITI. Isto está sintetizado nas tabelas 05 e 06 através das comparações do fator grupo para cada condição de intervalo.

Tabela 05 - Resultados das comparações Post-hoc ("vs" significa "versus") envolvendo o fator grupo para os parâmetros de latência e comprimento do trajeto no teste de memória operacional do labirinto aquático de Morris com ITI igual a 10 minutos.

Parâmetro	Grupos comparados	"p"
LATÊNCIA	Veneno vs zero	0.0067
LATÊNCIA	Veneno vs 30 min	0.0049
LATÊNCIA	Veneno vs 120 min	0.0305
LATÊNCIA	Veneno vs 10 horas	0.4719
LATÊNCIA	Veneno vs 24 horas	0.6636
LATÊNCIA	Veneno vs Soro	0.0019
LATÊNCIA	Veneno vs Salina	0.0396
LATÊNCIA	10 horas vs Salina	0.0125
LATÊNCIA	10 horas vs Soro	0.2422
LATÊNCIA	24 horas vs Salina	0.0801
LATÊNCIA	24 horas vs Soro	0.0427
LATÊNCIA	Salina vs Soro	0.3302
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs zero	0.0003
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs 30 min	0.0003
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs 120 min	0.004
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs 10 horas	0.165
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs 24 horas	0.079
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs Soro	0.0006
COMP. DO TRAJETO	Veneno vs Salina	0.0029
COMP. DO TRAJETO	10 horas vs Salina	0.1508
COMP. DO TRAJETO	10 horas vs Soro	0.1737
COMP. DO TRAJETO	24 horas vs Salina	0.0575
COMP. DO TRAJETO	24 horas vs Soro	0.0797
COMP. DO TRAJETO	Salina vs Soro	0.745

Tabela 06 - Resultados das comparações Post-hoc ("vs" significa "versus") envolvendo o fator grupo para os parâmetros de latência e comprimento do trajeto no teste de memória operacional do labirinto aquático de Morris com ITI igual a 0.

Parâmetro	Grupos comparados	"p"
% DE TEMPO NO QUADRANTE DO DIA ANTERIOR	Veneno vs Salina	0.0023
% DE TEMPO NO QUADRANTE DO DIA ANTERIOR	Veneno vs Soro	0.0003
% DE TEMPO NO QUADRANTE DO DIA ANTERIOR	Zero vs Salina	0.0111
% DE TEMPO NO QUADRANTE DO DIA ANTERIOR	Zero vs Soro	0.0094
% DE TEMPO NO QUADRANTE DO DIA ANTERIOR	30 min vs Salina	0.0072
% DE TEMPO NO QUADRANTE DO DIA ANTERIOR	30 min vs Soro	0.0053
% DE TEMPO NO QUADRANTE DO DIA ANTERIOR	120 min vs Salina	0.0051
% DE TEMPO NO QUADRANTE DO DIA ANTERIOR	120 min vs Soro	0.001
% DE TEMPO NO QUADRANTE DO DIA ANTERIOR	10 horas vs Salina	0.0401
% DE TEMPO NO QUADRANTE DO DIA ANTERIOR	10 horas vs Soro	0.0139
% DE TEMPO NO QUADRANTE DO DIA ANTERIOR	24 horas vs Salina	0.0493
% DE TEMPO NO QUADRANTE DO DIA ANTERIOR	24 horas vs Soro	0.0095

Quando o ITI foi igual a 10 minutos, ou seja, quando a tarefa foi dificultada, a ANOVA mostrou diferença significativa para o fator Grupo (Figura 17). Os animais do grupo veneno e do grupo 24 horas exibiram prejuízo em relação ao grupo soro para esta condição de ITI. Note que quando o ITI é virtualmente zero, ou seja, a tarefa é substancialmente facilitada, não existem quaisquer diferenças entre os grupos nos parâmetros de latência (Figura 17) e comprimento do trajeto (Figura 18). Para os demais

grupos não houve diferença significativa para nenhuma condição de intervalo, nestes parâmetros (Tabela 05).

Figura 17 – Médias (-E.P.M) de latência (expressa em segundos), em função das 3 tentativas diárias (foram incluídas as sessões 01 a 04), em que o ITI foi igual a 10 minutos, e 2 (foram incluídas as sessões 05 a 07), em que o ITI foi virtualmente igual a zero, no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris. (A) grupos prejudicados em relação aos controles e (B) demais grupos.

É interessante notar que para o comprimento do trajeto (Figuras 18), o grupo 24 horas não exibiu diferenças significantes quando comparado com o grupo soro (Tabela 05), entretanto, a ANOVA mostrou que há tendência deste grupo em diferir dos controles. Nenhum outro grupo diferiu dos demais neste parâmetro (Figura 18B e Tabela 05).

Figura 18 – Médias (- E.P.M) do comprimento do trajeto (expresso em centímetros), em função das 3 tentativas diárias (foram incluídas as sessões 01 a 04), em que o ITI foi igual a 10 minutos, e 2 (foram incluídas as sessões 05 a 07), em que o ITI foi virtualmente igual a zero, no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris. (A) grupos prejudicados em relação aos controles e (B) demais grupos.

O resultado do tempo no quadrante do dia anterior (Figura 19) é peculiarmente interessante, pois, diferentemente dos demais parâmetros citados até agora a diferença global entre grupos se inverte em relação ao ITI, ou seja, quando o ITI é virtualmente zero os grupos tratados com veneno diferem dos controles (tabela 06). Neste parâmetro todos os grupos envenenados tiveram desempenhos diferentes tanto do grupo salina, quanto soro. Parece que houve uma persistência em buscar a plataforma onde ela se achava no dia anterior quando não havia tempo entre as tentativas. Isto é, quando a tarefa exigia que os animais fizessem rapidamente relações com os objetos do ambiente a fim de saber a nova posição da plataforma. A curva de aquisição para o ITI zero apresentou um padrão diferente entre os grupos controles e os tratados com o veneno, percebe-se que os animais dos grupos soro e salina deixam de visitar o local que a plataforma estava no dia anterior mais rapidamente (Figura 19).

Figura 19 – Médias (-E.P.M) da porcentagem de tempo no quadrante crítico, em função das 3 tentativas diárias (foram incluídas as sessões 01 a 04), em que o ITI foi igual a 10 minutos, e 2 (foram incluídas as sessões 05 a 07), em que o ITI foi virtualmente igual a zero, no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris. (A) grupos prejudicados em relação aos controles e (B) demais grupos.

Plataforma Visível

A figura 20 contém os resultados dos parâmetros analisados no teste da plataforma visível.

A ANOVA não revelou a existência de efeitos significantes em relação aos fatores Grupo [**Latência**: ($F(7,81)=1,74;p<0,1174$) (Figura 20 A e B); **Comprimento do trajeto**: ($F(7,81)=1,74;p<0,1102$) (Figura 20 C e D) e **Velocidade média de natação**: ($F(7,81)=0,27;p<0,9655$) (Figura 20 D e E)], e Tentativa [nos parâmetros **Latência**: ($F(2,162)=2,06;p<0,1303$) e **Velocidade média de natação**: ($F(2,162)=1,49;p<0,2276$)]. Entretanto, para o parâmetro **Comprimento do trajeto**: ($F(2,162)=3,55;p<0,0317$) neste mesmo fator houve diferenças significativa.

Em relação às interações entre os fatores Grupo e Tentativa [**Latência:** ($F(14,162)=0,83;p<0,6374$); **Comprimento do trajeto** ($F(14,162)=0,86;p<0,5985$) e **Velocidade média de natação:** ($F(14,162)=0,91;p<0,2276$)] não existiram diferenças estatísticas.

Os resultados do teste da plataforma visível mais uma vez demonstraram que nenhum dos grupos envenenados apresenta prejuízos devido a componentes sensoriais. Não existiu diferença entre grupos em nenhum dos parâmetros. No entanto, a exemplo dos resultados do tempo no quadrante no teste de memória operacional, todos os grupos envenenados, à exceção do grupo zero, exibiram uma curva de aquisição diferente dos controles quando comparados com sua própria primeira tentativa nos parâmetros latência e comprimento do trajeto (Figura 20 A,B,C,D). Aparentemente, quando é necessária a mudança de estratégia, ou seja, mudar de uma estratégia de lugar para guiamento, parece que os animais envenenados exibem certo prejuízo. Note que apenas o grupo zero (Figura 20), nestes parâmetros, se comporta de forma semelhante ao grupo salina. A velocidade de natação também não se alterou pela inoculação do veneno ou do soro (Figura 20 E,F).

Figura 20 – Médias (-E.P.M) da latência expressa em segundos (A e B), do comprimento do trajeto, expresso em centímetros (C e D) e da velocidade média de natação, expressa em centímetros por segundo (E e F), em função das 3 tentativas da única sessão do teste da plataforma visível no labirinto aquático de Morris. Note que do lado esquerdo estão os resultados dos animais que exibiam piores desempenhos nos testes de memória de referência

e operacional; ao lado direito da figura estão os demais grupos. Neste teste não houve diferenças entre os grupos, a divisão só se manteve para manter o padrão de apresentação dos resultados.

DISCUSSÃO

Estas séries de experimentos permitiram demonstrar, pela primeira vez, a eficiência do soro anticrotálico, produzido pelo Instituto Butantan, em prevenir os prejuízos de memória espacial decorrentes do envenenamento crotálico em ratos, conforme descrito no capítulo 1. Uma vez que o soro foi eficiente em prevenir tais efeitos comportamentais, foi possível avaliar o curso temporal dessa proteção com dois objetivos: (1) saber até quanto tempo depois do envenenamento experimental o soro é eficaz e (2) em que momento iniciam-se os possíveis acometimentos no sistema nervoso central que são apresentados em caráter de prejuízos comportamentais pelos animais.

Presentemente, a soroterapia é o melhor tratamento para acidentes com animais venenosos e peçonhentos (Chippaux e Goyffon, 1997).

É interessante notar que a extensão da prevenção induzida pela administração pós-envenenamento do soro é dependente do intervalo de tempo entre a administração do veneno e do soro. Quando administrado em até 10 horas após o envenenamento, o soro foi efetivo em prevenir os efeitos do veneno; sua administração 24 horas depois já não previne os prejuízos cognitivos decorrentes do envenenamento.

Amaral e cols. (1997) analisaram 37 pacientes que haviam se envolvido em acidentes com *Crotalus durissus* no estado de Minas Gerais, Brasil. Os pacientes foram classificados conforme o tempo decorrido entre o acidente e o tempo que iniciaram a soroterapia (até 4 horas, entre 4 e 8

horas e superior a 8 horas). Os autores avaliaram, através de amostras de sangue obtidas em intervalos de tempo diferentes após o início da soroterapia, a presença do veneno bruto e de crotoxina nas amostras. Quando iniciou-se a soroterapia anteriormente a 8 horas pós-envenenamento os níveis de crotoxina encontrados nas amostras de sangue foram insignificantes já após 8 horas do início do tratamento; entretanto, quando o intervalo entre o acidente e o início da soroterapia foi superior a 8 horas restavam traços de crotoxina e do veneno bruto mesmo após 8 horas passadas do início da soroterapia. Isto é, esses dados demonstram a necessidade de rápida aplicação dada a rápida difusão do veneno pelo sistema e conseqüente lesões às células (e.g. musculares) ao longo do tempo.

Os experimentos relatados no capítulo 1 demonstram que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* pode ter ação sobre o sistema nervoso central ocasionando prejuízos de memória espacial em ratos. Os experimentos deste capítulo demonstraram que o soro anticrotálico é eficaz em combater tais efeitos. E mais, parece que mesmo quando há um atraso na administração do soro (até 10 horas), o soro se mostra minimizador de tais efeitos. Isto pode ser indicativo de que a soroterapia deve ser realizada em qualquer momento pós-acidente, mas o quanto antes a mesma for implantada melhor para os pacientes. Também parece haver 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 e cols. (1998). Esses autores demonstraram que havia fixação do veneno no cérebro de animais após 10 horas do envenenamento. Na época os autores

pareceram não ter atentado ao fato que esse dado poderia ser extremamente relevante e não o discutem.

Os dados do presente capítulo serão discutidos considerando cada etapa dos testes.

Teste de memória de referência espacial

Os resultados do teste de memória de referência são provas incontestes que o soro é eficaz em prevenir e minimizar os efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a memória espacial. Note que a latência (Figura 7) e comprimento do trajeto (Figura 8) dos animais inoculados apenas com veneno apresentam maiores escores, indicativos de prejuízos comportamentais, relativamente aos demais grupos que foram tratados com o soro anticrotálico. É possível perceber que mesmo o grupo que foi tratado com soro 24 horas após o envenenamento não apresenta prejuízo tão intenso quando o grupo veneno; por outro lado, aquele mesmo grupo não exibe desempenho similar ao dos grupos controles (salina e soro). Isto ressalta o quão crítico é o intervalo de tempo entre o envenenamento e a administração do soro para prevenir os prejuízos induzidos pelo veneno.

A precisão do conhecimento sobre a localização da plataforma, expresso pelo ângulo de divergência inicial em relação a plataforma (Figura 13), expressa com clareza essa relação temporal. Note que o desempenho do grupo 24 horas é ligeiramente melhor que o do grupo veneno, e por sua vez, o desempenho do grupo 10 horas é ligeiramente melhor que o grupo 24

horas. Em relação a este parâmetro, estes grupos diferiram estatisticamente dos controles

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta – Probe Test

Uma vez que os experimentos do capítulo 1 demonstraram que o veneno não produz efeitos sobre a extinção da resposta adquirida, não eram esperadas quaisquer diferenças no presente experimento.

Entretanto, fato importante deste teste foi a demonstração de que o soro por si não produz quaisquer efeitos sobre a memória dos animais assim como sobre a extinção da resposta de busca pela plataforma (Figuras 14, 15 e 16). Note que o comprimento do trajeto (Figura 14) e a porcentagem de tempo que o animal permaneceu no quadrante crítico (Figura 15) do grupo soro não diferiram do parâmetro correspondente do grupo salina.

Neste teste, diferentemente do capítulo 1, a velocidade de natação se mostrou alterada. Alguns grupos nadaram menos que outros (e.g. zero e 30 min), por motivo incerto, o que se refletiu em maiores velocidades de nado nesses animais.

Teste de memória operacional espacial

Os resultados do teste de memória operacional também foram contundentes no sentido de revelar o quão crítico é o intervalo de tempo entre o envenenamento e a administração do soro na prevenção dos

prejuízos induzidos pelo veneno no desempenho de tarefas espaciais. Em relação a latência (Figura 17) nota-se novamente que o grupo 24 horas exibe desempenho intermediário entre o grupo veneno e o grupo soro. Os outros grupos tratados com o soro não exibiram prejuízos de desempenho que se refletiram neste parâmetro (Figura 17B). Os resultados foram mais evidentes quando o ITI foi 10 minutos, ou seja, quanto maior o nível de dificuldade da tarefa.

Porém, resultados surpreendentes foram obtidos no parâmetro que afere a porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior (Figura 19). A exemplo do ocorrido no capítulo 1, os animais envenenados (todos os grupos que receberam veneno) persistem em buscar a plataforma no local onde esta se encontrava no dia anterior, quando o ITI era zero, fato que não ocorreu quando o ITI foi igual a 10 minutos. Isto novamente sugere que a flexibilidade comportamental encontra-se prejudicada pelo “treinamento intensivo” mesmo quando o veneno é inoculado concomitantemente com o soro. Estes dados são indicativos de que possivelmente, algum prejuízo cognitivo não é prevenido pela administração do soro anticrotático. Além disso, pode-se especular que esse processo cognitivo afetado parece depender da “taxa” de apresentação da informação a ser memorizada. Isto é, quando são apresentadas 3 tentativas em sucessão com ITI zero, a aquisição dessa informação é tal que 24 horas depois ela faculta ao animal buscar pela plataforma no quadrante crítico do dia anterior (na tentativa 1) e ainda persistir nessa busca (tentativas 2 e 3). Porém, quando são apresentadas 3 tentativas com ITI de 10 minutos entre elas, o resultado é ligeiramente diferente. Os animais buscam pela plataforma no quadrante

correto na primeira tentativa do dia seguinte, porém, não exibem a persistência dessa busca nas tentativas 2 e 3.

Plataforma visível

A análise da figura 20 mostra, que os animais dos grupos que receberam administração de veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* não exibem prejuízos sensoriais e/ou motores. Isto é indicado pela primeira tentativa deste teste. Note que na tentativa 1 os escores para qualquer um dos parâmetros é semelhante entre os grupos. No entanto, nas tentativas seguintes os grupos que foram tratados com veneno (a exceção do grupo zero) não melhoram seus desempenhos em função do conhecimento adquirido da nova tarefa, como fazem os controles. Em conjunto, estes dados denotam que o veneno pode gerar prejuízos cognitivos que não são prevenidos pelo soro.

Foi descartada a hipótese de comprometimento sensorial ou motor neste teste; note como a velocidade de natação não difere globalmente entre os grupos (Figuras 20 E e F).

É importante ressaltar Não era esperado que o soro anticrotálico produzisse algum efeito comportamental. Entretanto, existia a necessidade de realização de testes utilizando apenas o soro, pelo fato deste não se tratar de uma substância inócua. Neste caso, de fato, os resultados apresentados neste capítulo demonstram que não houve quaisquer alterações na comparação entre o grupo salina e grupo soro. Uma possível ação prejudicial, em humanos, do soro anticrotálico para cascavéis norte-

americanas foi analisada por Offerman e cols. (2001). Os autores não encontraram efeitos colaterais severos e posteriores ao uso em grandes doses de soro.

CONCLUSÕES

O soro anticrotálico previne os efeitos mais relevantes dos prejuízos de memória espacial em ratos quando a soroterapia é iniciada mais rapidamente seguida do envenenamento.

Os resultados mostram que a administração sistêmica do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* gera prejuízos cognitivos. Apesar de haver alguns destes resultados que apontam prejuízos pormenores os quais o soro não previne, pode-se perceber que o soro minimiza em grande parte os prejuízos comportamentais quando administrado até 10 horas após o envenenamento. E, indo além, os resultados do grupo 24 horas mostraram que mesmo após este intervalo os prejuízos são menores que quando a soroterapia não foi empregada.

Esses resultados podem ser altamente relevantes do ponto de vista da saúde pública, pois indicam que a administração do soro dever ser iniciada o mais rapidamente possível, devendo ser realizada independentemente da gravidade do envenenamento e mesmo que já tenha decorrido um certo intervalo de tempo desde o envenenamento.

Parece haver um período mais crítico, de cerca de 10 horas, em que a administração do soro previne a maior parte dos prejuízos cognitivos que se seguem ao envenenamento em ratos, o que pode fornecer indícios

importantes acerca dos mecanismos de ação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* no sistema nervoso central.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL

Os achados comportamentais do presente estudo apontam no sentido de haver prejuízos de memória espacial e aumento dos níveis de ansiedade em ratos Wistar quando a administração do veneno de *Cdt* é sistêmica. Esses dados tomados em conjunto indicam a ocorrência de lesões em determinadas estruturas do sistema nervoso central, subjacentes aos comportamentos prejudicados.

Conforme discutido no capítulo 1, tanto a ansiogênese, quanto os prejuízos de memória espacial assemelham-se aos tipos de alterações comportamentais decorrentes de danos na formação hipocampal. Nesse sentido, é possível gerar pelo menos duas hipóteses acerca da fisiopatologia do envenenamento crotálico: 1) alguma ou algumas das toxinas e compostos bioativos da peçonha poderia cruzar a BHE e ocasionar lesões no sistema nervoso central (sendo a formação hipocampal um candidato forte a ser futuramente investigado), e 2), talvez menos provável, poderia haver interferência indireta no padrão de neurotransmissores que participam do processamento da memória espacial e ansiedade.

Peçonhas originárias de animais são compostos bioquímicos complexos. Usualmente, existe uma grande quantidade de componentes no veneno bruto de diferentes espécies, cada uma podendo desempenhar um papel ainda desconhecido.

Alves da Silva *et al.* (2010) mostraram que a gioxina aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica de ratos; portanto, esta toxina poderia facilitar o acesso de outras toxinas ao sistema nervoso central e atuar de forma sinérgica ocasionando lesões centrais.

A crotoxina e a gioxina presentes no veneno de *Cdt* produzem efeitos comportamentais sugestivos de sua ação no sistema nervoso central mesmo após inoculação sistêmica (Moreira *et al.*, 1996; 1997; 2000; Torrent *et al.*, 2007). Na hipótese de que a crotoxina, ou pelo menos as PLA2 presentes em abundância nesta toxina, cruze a BHE é possível que haja comprometimento das 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 grande dependência da presença de íons Ca^{2+} para seu funcionamento, além de interagir amplamente com os receptores deste íon. 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)

Sampaio e colaboradores (2010), em estudo de revisão, listaram atividades recentemente descritas pelo efeito da crotoxina. Apesar da discussão dos autores não focar ações centrais do envenenamento, apenas as periféricas, seu modelo permite ilustrar a associação entre crotoxina, PLA2 e íons Ca^{2+} .

A Figura 21 mostra um esquema simplificado dos efeitos da crotoxina em nível celular. A via sinalizada em verde mostra a internalização da crotoxina, via endocitose, ou a atuação das PLA2 hidrolisando os fosfolípedes de membrana. A via sinalizada em azul seria consequência direta da hidrólise de PLA2 e consequente influxo de íons Ca^{2+} e sua subsequente atuação. E a via em vermelho é consequência da internalização da crotoxina e suas ações sobre a exocitose.

Figura 21 – 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 e degradar vesículas sinápticas pela própria hidrólise de membranas. Nessa mesma via pode haver degradação de proteínas que participam da exocitose e liberação das vesículas na sinapse. O segundo mecanismo seria a degradação dos fosfolípedes da membrana plasmática, alteração que por se provocaria lesões. A terceira ação decorre desta nova condição envolvendo a

incompetência da membrana na seletividade de íons, decorrente da lise de seus fosfolipídios. 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 acetilcolina (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+} .

Assim, parece possível hipotetizar que tenha havido comprometimento em estruturas do sistema nervoso central, particularmente a formação hipocampal, levando aos prejuízos comportamentais observados.

Isso poderia ter decorrido da dependência do processamento hipocampal, e portanto dos processos de memória, em relação a neurotransmissão mediada por acetilcolina (Jones *et al.*, 1999; Gold, 2003; Power *et al.*, 2003).

Não se pode descartar também possíveis comprometimentos envolvendo a participação do íon Ca^{2+} , o qual participa de diversas sinalizações envolvendo constituintes hipocampais, que devido a sua alta concentração nesta estrutura, além da densidade de receptores de Ca^{2+} e outros receptores ionotrópicos que permitem sua passagem, o aumento da concentração intracelular deste íon levando à toxicidade (Mons *et al.*, 1999; Grant *et al.*, 2008; Leitch *et al.*, 2009).

A gioxina também poderia participar ativamente da indução de lesões hipocampais. Torrent e cols (2007) descreveram lesões no hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal após inoculação sistêmica de girotoxina em

ratos neonatos. Não está claro em que extensão essas lesões estariam relacionadas ao estágio de maturação de neurônios e à formação da rede sináptica. É possível que ocorram alterações similares em animais injetados sistemicamente com essa toxina também na fase adulta.

Outra hipótese seria a ocorrência de uma alteração na dinâmica dos neurotransmissores pelos componentes do veneno de *Cdt*. Nos estudos de Moreira e cols. (2000) foi proposto que a crotoxina interferiria diretamente no sistema gabaérgico. Talvez isso ocorra em um primeiro momento, assim como a alta liberação de acetilcolina promovida por esta mesma toxina logo após a inoculação do veneno. No entanto, essa hipótese parece aplicável apenas a momentos iniciais do envenenamento. Nossos experimentos mostram prejuízos mesmo depois de decorrido um longo intervalo de tempo, i.e., 4 semanas, desde a administração do veneno.

A ausência de uma explicação definitiva para os mecanismos envolvidos nos prejuízos comportamentais observados não reduz a importância dos achados deste estudo. O fato da peçonha ocasionar marcados e efeitos comportamentais, que são, por outro lado, específicos, indica que ocorrem alterações no sistema nervoso central decorrentes do envenenamento.

Fato igualmente importante é a prevenção dos prejuízos comportamentais decorrentes do envenenamento pelo soro anticrotálico. Esse achado revela a eficiência desta substância produzida pelo instituto Butantan em prevenir mais uma das conseqüências do envenenamento demonstrada no presente estudo. A escala temporal em que o anti-veneno foi eficiente nos fornecerá pistas valiosas para pesquisas futuras.

Essas observações abrem possibilidades de investigação sobre a existência de prejuízos comportamentais decorrentes do envenenamento em humanos, assim como sobre ações que podem ser implementadas para minimizar esses prejuízos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho descreve conseqüências até então desconhecidas decorrentes do envenenamento crotálico e também estratégias para lidar com essas conseqüências. Porém, mais do que apresentar respostas, o estudo gerou perguntas acerca desse fenômeno, entre elas indagações (1) sobre os mecanismos que levam às alterações comportamentais observadas após o envenenamento, (2) sobre qual(is) toxina(s) estaria(m) envolvida(s) nesse processo, (3) sobre a eventual ocorrência dos mesmos fenômenos em seres humanos vítimas de envenenamento.

Algumas destas indagações serão avaliadas em estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

ADEM, A.; ASBLOM, A.; JOHANSSON, G.; MBUGUA, P.M.; KARLSSON, E. Toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* that inhibit the binding of quinuclidinyl benzilate to muscarinic acetylcholine receptors. **Biochim Biophys Acta**. v. 968. n.3. p.340-5, 1988

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.

ALVES-DA-SILVA, J.A.; OLIVEIRA, K.C.; CAMILLO, M.A.P.; Gyroxin increases blood-brain barrier permeability to Evans Blue dye mice. **Toxicon**. no prelo. 2010.

AMARAL, C.F.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B.; BUENO, C.M.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; PENAFORTE, C.L.; DINIZ, C.R.; REZENDE, N.A. Time factor in the detection of circulating whole venom and crotoxin and efficacy of antivenom therapy in patients envenomed by *Crotalus durissus*. **Toxicon**. v. n.5. p.699-704, 1997

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.

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.

ARMUGAM, A.; GONG, N.; LI, X.; SIEW, PY.; CHAI, S.C.; NAIR, R.; JEYASEELAN, K.; Group IB phospholipase A2 from *Pseudonaja textilis*. **Arch Biochem Biophys**. v.421. n.1. p.10-20, 2004

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.

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.

BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N. P.; MCHUGH, S. B.; DEACON, R. M. J.; YEE, B. K.; BAST, T.; ZHANG, W.N.; POTHUIZEN, H. H. J. AND FELDON, J. Regional Dissociations Within The Hippocampus – Memory And Anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 28, 273-283, 2004.

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.

BADDELEY, A. Modularity, mass-action and memory. **Q J Exp Psychol A**. v.38. n.4, p.527-33,1986

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

BÉRESS, L., BÉRESS, R., WUNDERER, G., Isolation and characterization of three polypeptides with neurotoxic activity from *Anemonia sulcata*. **FEBS Lett**. v. 50, 311–314. 1975

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.

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

Brasil. Ministério da Saúde .<http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao.pdf>. Acesso em 12/11/2007.

BRAZIL, O.V; EXCELL, B.J. Actions of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* on the frog neuromuscular junction. **J. Physiol**. v.212, p. 34-35. 1971.

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.

CATTERALL, W.A., BERESS, L., Sea anemone toxin and scorpion toxin share a common receptor site associated with the action potential sodium ionophore. **J. Biol. Chem**. v.253. p.7393–7396, 1978.

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

CLARK, C., OLIVERA, B.M., CRUZ, L.J.,. A toxin from *Conus geographus* venom which acts on the vertebrate central nervous system. **Toxicon**. v. 19 . p.691-699, 1981

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

CRAIG, A.G., BANDYOPADHYAY, P., OLIVERA, B.M.,. Post-translationally modified peptides from *Conus* venoms. **European J. Biochem.** v. 264, p.271-27,1999.

CRUZ, L.S. VARGAS, R. LOPES, A. A.; Snakebite envenomation and death in developing world. **Ethnicity and disease.** v.19,p. 41-46 2009.

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.

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

DIEHL, F.; FÜRSTENAU-DE-OLIVEIRA, L.; SÁNCHEZ, G.; CAMBOIM, C.; DE-OLIVEIRA-ALVARES, L.; LANZIOTTI, V.B.; CERVEÑANSKY, C.; KORNISIUK, E.; JERUSALINKY, D.; QUILLFELDT JA. Facilitatory effect of the intra-hippocampal pre-test administration of MT3 in the inhibitory avoidance task. **Behav Brain Res.** v.177. n.2. p.227-31, 2007.

DOS SANTOS, M.C., MORHY, L., FERREIRA, L.C.L. e a. Purification and properties of a crotamine analog from *Crotalus durissus ruruima* venom. **Toxicon**, v. 3 1, p. 166, 1993.

DUNN, R.D.; BROADY, K.W. Snake inhibitors of phospholipase A(2) enzymes. **Biochim Biophys Acta.** v.1533. n.1. p.29-37, 2001.

ENDO, T.; TAMIYA, N.; Current view on the structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. **Pharmacol Ther.** v.34. n.3. p. 403-51, 1987.

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.

FERREIRA, A.R.; FÜRSTENAU, L. BLANCO, C.; KORNISIUK, E.; SÁNCHEZ, G.; DAROIT, D.; CASTRO-E-SILVA, M.; CERVEÑANSKY, C.; JERUSALINSKY, D.; QUILLFELDT, J.A. Role of hippocampal M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 74. n.2. p. 411-5, 2003.

FILE, S.E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavioral Brain Research**, v.125. p. 151-157, 2001.

FLETCHER, P.L.; FLETCHER, M.D.; WENINGER, K.; ANDERSON, T.E.; MARTIN, B.M. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **J Biol Chem**. v.285. n.10. p. 7405-16, 2010

FONTANA, M.D.; VITAL-BRAZIL, O. Mode of action of Phoneutria nigriventer spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. **Braz J Med Biol Res**. v.18. n.4. p. 557-65, 1985.

FRIELINGS DORF, 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

GOLD, P.E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. **Neurobiol Learn Mem**. v.80. n.3. p.194-210, 2003.

GONCALVES JM, POLSON A. The electrophoretic analysis of snake venoms. *Arch Biochem*. 1947 May;13(2):253-9.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: Graeff Fg, Brandão MI (Eds). *Neurobiologia das Doenças Mentais*. 5a Ed., Lemos Editorial, São Paulo, p.144, 1999.

GRANT PA, BEST SL, SANMUGALINGAM N, ALESSIO R, JAMA AM, TÖRÖK K. A two-state model for Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase II (alphaCaMKII) in response to persistent Ca²⁺ stimulation in hippocampal neurons. *Cell Calcium*. 2008 Nov;44(5):465-78

GRAY, J.A. The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septohippocampal system. Oxford University Press, 1982.

HABERMANN, A.; CHENG-RAUDE, D., Central neurotoxicity of apamin, crotoxin, phospholipase A and α -amanitin, **Toxicon**. v.13. p. 465 – 471, 1975.

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

HARVEY, A.L.; KARLSSON, E. Dendrotoxin from the venom of the green mamba, *Dendroaspis angusticeps*. A neurotoxin that enhances acetylcholine release at neuromuscular junction. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. v.312. n.1. p. 1-6, 1980.

HARVEY, A.L.; Presynaptic effects of toxins. **Int Rev Neurobiol**. v.32. p. 201-39, 1990.

HARVEY, AL. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discov. Today**, V. 5. n.7. p. 294–300, 2001.

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,

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

JEFFERY, B.; BARLOW, T.; MOIZER, K.; PAUL, S.; BOYLE, C. Amnesic shellfish poison. **Food Chem Toxicol.** v.42. n.4. p.545-57, 2004

JENG, T.W.; HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic, and neurotoxic activities of snake venoms. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.75.n.2. p.600-4, 1978.

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

JONES, I.W.; BARIK, J.; O'NEILL, M.J.; WONNACOTT, S. Alpha bungarotoxin-1.4 nm gold: a novel conjugate for visualising the precise subcellular distribution of alpha 7* nicotinic acetylcholine receptors. **J Neurosci Methods.** v.134.n.1. p.65-74, 2004

JONES, S.; SUDWEEKS, S.; YAKEL, J.L. Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. **Trends Neurosci.** v.22. n.12. p.555-6, 1999

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.

KOH, D.C, ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol Life Sci.** v.63. n.24. p.3030-41, 2006

KOHN, A.J., SAUNDERS, P.R., WIENER, S. Preliminary studies on the venom of the marine snail *Conus*. **Ann. N.Y.Acad. Sci.** v.90. n.2, p. 706-7, 1960

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

LEITCH, B.; SZOSTEK, A.; LIN, R.; SHEVTSOVA, O. Subcellular distribution of L-type calcium channel subtypes in rat hippocampal neurons. **Neuroscience**. v. 164. n.2. p.641-57, 2009

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

MACKINNON, R; MILLER, C. Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. **Science** v.245, p.1382–1385, 1989

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.

MAFRA, L.L.; BRICELJ, V.M.; OUELLETTE, C.; BATES, S.S. Feeding mechanics as the basis for differential uptake of the neurotoxin domoic acid by oysters, *Crassostrea virginica*, and mussels, *Mytilus edulis*. **Aquat Toxicol**. v.97. n.2. p.160-71, 2010

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 crothamine. **Eur. J. Pharmacol**. v. 348. n. 2-3, p. 167-73. 1998.

MCGEER EG, MCGEER PL. Neurotoxins as tools in neurobiology. *Int Rev Neurobiol*. 1981;22:173-204.

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.

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

MILLER, C. The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides. **Neuron**. V.15, p. 5–10., 1995

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

MOHAPATRA, D.P, MISONOU H., PAN, S.J, HELD, J.E., SURMEIER, D.J, TRIMMER, J.S. Regulation of intrinsic excitability in hippocampal neurons by activity-dependent modulation of the KV2.1 potassium channel. **Channels (Austin)**. v.3. n.1. p.46-56, 2009

MONS, N., GUILLOU, J.L., JAFFARD, R. The role of Ca²⁺/calmodulin-stimulable adenylyl cyclases as molecular coincidence detectors in memory formation. **Cell Mol Life Sci**. v.55. n.4. p.525-33, 1999

MONTECUCCO, C.; ROSSETTO, O. On the quaternary structure of taipoxin and textilotoxin: the advantage of being multiple. **Toxicon**. v.51.n.8. p.1560-2. 2008.

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.

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.

NARASHI, T. ; Tetrodotoxin – A brief history:Review. **Proc. Jpn. Acad**. V.84. p 147-154, 2008.

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

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.

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.

OFFERMAN, S.R; SMITH, T.S; DERLET, R.W. Does the aggressive use of polyvalent antivenin for rattlesnake bites result in serious acute side effects? **West J Med.** v.175. n.2. p.88-91, 2001

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

OLIVERA, B.M.; CRUZ, L.J. Conotoxins, in retrospect. **Toxicon.** v.39. n. 1. p.7-14, 2001

OLIVERA, B.M., MCINTOSH, J.M., CLARK, C., MIDDLEMAS, D., GRAY, W.R., CRUZ, L.J. A sleep-inducing peptide from *Conus geographus* venom. **Toxicon** v.23. p. 277-82., 1985

OLIVERA, B.M., MCINTOSH, J.M., CRUZ, L.J., LUQUE, F.A., GRAY, W.R., Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. **Biochemistry.** v. 23. p.5087-5090, 1984

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

OSMAN, O.H., ISMAIL, M., EL-ASMAR, M.F. Pharmacological studies of snake (*Dendroaspis angusticeps*) venom. **Toxicon.** v.11.n.2. p.185-92, 1973

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

POSSANI, L.D., BECERRIL, B., DELEPIERRE, M., TYTGAT, J., Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **Eur. J. Biochem**. v.264, p. 287–300. 1999.

POWER, A.E.; VAZDARJANOVA, A.; MCGAUGH, J.L. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. **Neurobiol Learn Mem**. v.80. n.3. p.178-93, 2003

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.

PRESTIPINO, G.; CORZO, G.; ROMEO, S.; MURGIA, A.R.; ZANARDI, I.; GURROLA, G.B.; POSSANI, L.D. Scorpion toxins that block transient currents (I(A)) of rat cerebellum granular cells. **Toxicol Lett**. v.187. n.1. p.1-9, 2009

PRESTON, E. HYNIE, I. Transfer constants for blood-brain barrier permeation of the neuroexcitatory shellfish toxin, domoic acid. **Can J Neurol Sci**. v.18 n.1. p.39-44, 1991

RASH, L.D; HODGSON, W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms, **Toxicon**. V.40 p. 225–254, 2002

RATHMEYER, W., BERESS, L., The effect of toxins from *Anemonia sulcata* (Coelenterata) on neuromuscular transmission and nerve action potentials in the crayfish (*Astacus leptodactylus*). **J. Comp. Physiol**. v.109. p.373–382, 1976.

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.

REGAN, D.W.Y.; SAH, A.N.; BEAN, B.P. Ca²⁺ channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and ω -conotoxin, **Neuron**. v. 6, p. 269, 1991

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

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A. AND HOLMES A. Animal Models Of Anxiety: And Ethological Perspective, **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 30 : 289-304, 1997.

RODGERS, R.J; COLE, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In : Cooper S.J. e Hendrie C.A. (Editores), **Ethology and Psychopharmacology**. Chichester: Wiley, p.9-44, 1994.

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

ROSENFELD, G. Syntomatology, Pathology and Treatment of Snakebites in South America. In: Bücherl, W. e Buckley, E (Editores) **Venomous animals and their venoms**. New York, Academic Press, V.2 p.345-84, 1971.

ROWAN, E.G. What does beta-bungarotoxin do at the neuromuscular junction? **Toxicon.** v.39. n.1. p.107-18, 2001

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

SANDFORD, J.J.; ARGYROPOULUS, S.V. AND NUTT, D.J. The Psychobiology of Anxiolytic Drugs Part 1 : Basic Neurobiology. **Pharmacology & Therapeutics** 88: 197-212, 2000.

SANO-MARTINS, I.S. ; TOMY, S C ; CAMPOLINA, D. ; DIAS, M. B. ; CASTRO, S. C. B. ; SILVA, M C C Sousa e ; AMARAL, C. F. ; REZENDE, N. A. ; KAMIGUTI, A. S. ; WARRELL, D A ; THEAKSTON, R D G Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **Quarterly Journal of medicine**, v.94, n.10, p.551-559, 2001.

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.

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

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.

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

SILVEIRA, R., DAJAS, F. Neurotoxins in Neurobiology: an overview. In: Tipton, K.F., Dajas, F., (Eds). **Neurotoxins in Neurobiology, their actions and applications**, Ellis Horwood, New York, pp. 3–26. , 1994

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

SRINIVASAN, K.N., GOPALAKRISHNAKONE P.T., TAN K.C, CHEW B., CHENG R.M. Scorpion, a molecular database of scorpion toxins. **Toxicon**, v.40. p. 23-31, 2002

SÜDHOF, T.C; Synaptotagmins: why so many? **J Biol Chem**. v.277. n.10. p. 7629-32, 2002

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

SWARTZ K..J., MACKINNON R. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. **Neuron**; v.15. p.941–949. 1995

TURK, T.; KEM, W.R. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. **Toxicon**. v. 54. p. 1031–1037, 2009.

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

TERLAU, H; OLIVEIRA, B. *Conus Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides*. **Physiol Rev**. v.84. p. 41–68, 2004

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.

TORRENT, R.M.R. 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.

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

UCHITEL, O.D. Toxins affecting calcium channels in neurons. **Toxicon**. v.35, p. 1161–1191., 1997

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.

VARGAFTIG, B.B.; CHIGNARD, M.; BENVENISTE, J. Present concepts on the mechanisms of platelet aggregation. **Biochem Pharmacol**. v. 30. n.4. p.263-71. 1981.

WALL, P. M. AND MESSIER, C. Concurrent Modulation of Anxiety and Memory. **Behavioural Brain Research**, 109 (2), 229-241, 2000.

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.

WILSON, M.A. GABA physiology: modulation by benzodiazepines and hormones. **Crit Rev Neurobiol.** v.10. n.1. p.1-37, 1996

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, 1989, p.61-74.

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