UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

EDUARDO OCTAVIANO PRIMINI

Avaliação do efeito neuroprotetor de compostos obtidos da peçonha da aranha *Parawixia bistrata*, em cultura primária mista de células do tecido nervoso, de ratos Wistar

Ribeirão Preto

2016

EDUARDO OCTAVIANO PRIMINI

Avaliação do efeito neuroprotetor de compostos obtidos da peçonha da aranha *Parawixia bistrata*, em cultura primária mista de células do tecido nervoso, de ratos Wistar

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia

Orientação: Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos [Biologia]

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Primini, Eduardo Octaviano

Avaliação do efeito neuroprotetor de compostos obtidos da peçonha da aranha *Parawixia bistrata*, em cultura primária mista de células do tecido nervoso, de ratos Wistar/ Eduardo Octaviano Primini; orientador Wagner Ferreira dos Santos.

--Ribeirão Preto, 2016

45 f. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia. Área de concentração: Psicobiologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

1-Neurotransmissão, 2-Excitotoxicidade, 3-Neuroproteção, 4-RT10 (fração da peçonha da aranha *Parawixia bistrata*).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eduardo Octaviano Primini

Avaliação do efeito neuroprotetor de compostos obtidos da peçonha da aranha *Parawixia bistriata*, em cultura primária mista de células do tecido nervoso, de ratos Wistar.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia

Aprovado em: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marcelo e Ana Lúcia, ao meu irmão Tiago e à minha namorada Carolina.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e fé para superar todas as dificuldades.

Aos meu pais, que sempre compreenderam e apoiaram as minhas decisões.

Ao meu irmão Tiago, por toda a amizade.

Á minha namorada Carolina, por todas as conversas e conselhos ao longo desta trajetória.

Ao Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos, por ter me aceitado em seu laboratório e ter compartilhado comigo inúmeros conhecimentos científicos, assim contribuindo para o meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Dr. José Luiz Liberato, que muitas vezes foi para a bancada para participar da execução dos experimentos e sempre concedeu sugestões, as quais foram cruciais para a conclusão deste estudo.

Ao Profs. Drs. Norberto Peporine Lopes e Leonardo Gobbo pelo apoio no processo de obtenção dos compostos.

Á Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli, que permitiu a utilização de equipamentos do seu laboratório.

Ao técnico Sr. Mauricio de Oliveira pela esterilização dos materiais utilizados ao longo deste trabalho.

Aos companheiros de Laboratório, Alberth González, Carol Medeiros, Igor Alves, Marcus Aguiar, Marcus Celani, Samia Nassir, Tamiris Prizon e Thiago Bronhara.

Á Sra. Renata Vicentini, secretária do programa de pós-graduação em Psicobiologia, pela ajuda, paciência e compreensão.

Ao programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, pelas sólidas bases em comportamento e neurociências.

À CAPES-PROEX e FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

À Universidade de São Paulo pela satisfação de poder estudar aqui.

Primini, E.O. Avaliação do efeito neuroprotetor de compostos obtidos da peçonha da aranha *Parawixia bistrata*, em cultura primária mista de células do tecido nervoso, de ratos Wistar. 2016. 45f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

RESUMO

O *L*-glutamato (*L*-Glu) é o principal neurotransmissor excitatório em vertebrados e é fundamental para funções primordiais do sistema nervoso central (SNC), tais como aprendizagem e memória. Entretanto, quando este neurotransmissor está em excesso na fenda sináptica, pode provocar uma série de eventos excitotóxicos, que por sua vez, estão associados a muitas neuropatologias. A terapia da maioria dessas doenças é ineficiente e provoca sérios efeitos colaterais. Portanto, é necessário desenvolver fármacos mais efetivos e com menos efeitos colaterais. Assim, peçonhas de artrópodes como a da aranha *P. bistrata*, se apresentam como fontes alternativas de compostos neuroativos, pois já demonstraram efeitos neuroprotetores *in vitro* e *in vivo*, bem como anticonvulsivos. Destarte, o objetivo deste estudo foi investigar um possível efeito neuroprotetor da fração RT10, isolada da peçonha de *P. bistrata*, em cultura primária de neurônios e glia (CPNGs), do tecido nervoso de ratos recém-nascidos, expostos a concentrações tóxicas de *L*-Glu (5mM). As CPNGs foram tratadas durante 3 horas, previamente a lesão, por 12h. Ambas as exposições (tratamento e lesão) foram conduzidas no 7º dia *in vitro* (DIV). Para analisar quantitativamente e qualitativamente os efeitos dos tratamentos, bem como demonstrar a composição das CPNGs foram realizados ensaios de viabilidade celular, com o sal sódico de resazurina (SSR) e, imunomarcações com anticorpos primários para MAP2, NeuN e GFAP. A fração RT10 foi neuroprotetora, pois diminuiu a perda celular nos testes com o SSR em 10%, nas CPNGs, expostas ao *L*-Glu, além de apresentarem efeito maior (5%), que o fármaco Riluzole (RIL). A neuroproteção da RT10 também foi observada nos ensaios de imunocitoquímica. Os neurônios tratados com RT10 e RIL, que foram marcados com anti-MAP2 tiveram maior prolongamentos dos dendritos em relação aos neurônios não tratados. Portanto, a intensidade da fluorescência de anti-MAP2 para os neurônios tratados com esta fração foi 38% maior em relação aos não tratados; e 21% maior quando comparados ao grupo RIL. Deste modo, podemos considerar a RT10, como uma ferramenta para a prospecção de novos fármacos contra neurodegenerações, *in vitro* e principalmente estudos de mecanismo de ação, cujas variáveis podem ser mais bem controladas.

Palavras chave: Neurônio, glia, *L*-Glu, neurotransmissão, excitotoxicidade, neuroproteção, *Parawixia bistrata*, Parawixinas, RT10

Primini, E. O. Evaluation of the neuroprotective effect of compounds from *Parawixia bistriata* spider venom, in primary mixed cells culture from cerebral tissue of newborn Wistar rats. 2016. 45f. Thesis (Master) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

ABSTRACT

L-Glutamate (*L*-Glu), the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system of vertebrates, is essential to the occurrence of cognitive functions. However, when *L*-Glu is over-accumulated in a synaptic cleft it can provoke excitotoxicity (EXT), which has been implicated in many neurological disorders (NDs). The current therapies against NDs are undereffective and can provoke side effects, so it is necessary to develop new treatments. In this regard, neuroactive compounds obtained from *Parawixia bistriata* spider venom are an alternative source of neuroactive compounds, because they showed neuroprotective effects *in vitro* and *in vivo*. Thus, the main aim of this work was to evaluate a possible neuroprotective effect of fraction RT10 obtained from *P. bistriata* venom in primary culture of neuron and glial cells (PCNGCs) from cerebral tissue of newborn Wistar rats, after the exposition to *L*-glu toxic concentration (5mM). The PCNGCs were submitted to the neuroprotection treatments for 3 hours and previously to the neurotoxic treatment, which the *L*-glu stayed for 12h in the PNGCs. The both expositions were conducted on the 7th day *in vitro* (DIV). The Resazurin sodium salt (RSS) and immunocytochemistry (MAP2, NeuN e GFAP primary antibodies) trials were utilized to measure quantitatively and qualitatively the treatments, as well as to prove the culture composition. In the RSS trial, the RT10 was neuroprotector, since avoided the cell death in 10%, under the PCNGCs which were exposed to *L*-Glu. in addition, RT10 demonstrated higher effect than RIL (5%). RT10 attenuated the toxic effects of *L*-Glu under the neuromorphology, consequently the fluorescence intensity of MAP2 at PCNGC treated with RT10 was 38% higher than untreated group and it was 21% higher than RIL group. Thus, we can consider that RT10 compounds are valuable tools to the prospection of new drugs against NDs.

Keywords: Neuron, glia cell, *L*-Glu, neurotransmission, excitotoxicity, neuroprotection, *Parawixia bistriata*, Parawixins, RT10

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de uma neurotransmissão Glutamatérgica.....	3
Figura 2. Esquema da neurotransmissão glutamatérgica e excitotoxicidade.....	5
Figura 3. Fotografias representativas da aranha <i>Parawixia bistrata</i>	6
Figura 4. Cromatogramas.....	17
Figura 5. Fotomicrografias representativas das imunomarcações.....	18
Figura 6. Fotomicrografias representativas da imunomarkação com anti-MAP2.....	18
Figura 7. Gráfico representativo da intensidade de fluorescência de MAP2.....	19
Figura 8. Gráfico representativo da viabilidade celular: <i>L-Glu</i>	20
Figura 9. Gráfico representativo da viabilidade celular: Tratamentos e <i>L-Glu</i>	21

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico

ANOVA: Análise de variância

Ca²⁺: Íon de cálcio

CaCl₂: Cloreto de cálcio

CLAE-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

CPNGs: Cultura primária de neurônios e glias

DIV: Dias *in vitro*

Dnase: Desoxirribonuclease

EAAT2: Transportador de aminoácido excitatório, subtipo 2 (do inglês, *excitatory aminoacid transport*)

EAATs: Transportadores de aminoácidos excitatórios

ELA: Esclerose lateral amiotrófica

FDA: Administração de comidas e remédios (do inglês, *Food and drug administration*)

GABA: Ácido gama - aminobutírico

GFAP: Proteína fibrilar ácida glial (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*)

HBSS: Solução salina balanceada de Hank (do inglês, *Hank's Balanced Salt Solution*)

IF: Intensidade da fluorescência

K⁺: Íon de potássio

KCl: Cloreto de potássio

L-Glu: L-Glutamato

MAP2: Proteína 2 associada a microtúbulo (do inglês, *microtubule associated protein 2*)

mGluR: Receptor metabotrópico de *L*-Glutamato

Na⁺: Íon de sódio

NaCl: Cloreto de sódio

NaHCO₃: Bicarbonato de sódio

NeuN: Proteína nuclear de neurônio (do inglês, *neuronal nuclear antigen*)

NMDA: N-metil-D-aspartato

NR1/NR2A/NR2B: Subunidades do receptor N-metil-D-aspartato

Pwx: Parawixina

RIL: Riluzole

RT10: Tempo de retenção até 10 minutos (do inglês, *retention time until 10 minutes*)

SNC: Sistema nervoso central

SSR: Sal sódico de resazurina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações e tempos utilizados para padronização da concentração tóxica de <i>L</i> -Glu e dos tratamentos de neuroproteção com RIL e RT10	13
Tabela 2. Imagem representativa de uma placa de Elisa de 24 poços, com os grupos experimentais e disposições dos experimentos.....	14

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Neurotransmissão Excitatória: L-Glutamato	1
1.2 Excitotoxicidade e Neuroproteção.....	3
1.3 Neurotoxinas de artrópodes	5
1.4 Aranha <i>Parawixia bistrata</i>	6
2- OBJETIVO	9
2.1 Geral	9
2.2 Específicos.....	9
3- MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Coleta das aranhas e isolamento dos compostos.....	10
3.1.1 Coleta da aranha <i>P. bistrata</i> , extração das glândulas e reservatório de veneno e preparação do extrato bruto.	10
3.1.2 Isolamento das frações da peçonha de <i>P. bistrata</i>	10
3.1.3 Etapas de isolamento em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).	10
3.2 Bioensaios.....	11
3.2.1 Animais	11
3.2.2 Obtenção das células e Meio de Cultura	11
3.2.3 Preparação das Lamínulas	12
3.2.4 Lesão e Tratamentos	13

3.2.5 Viabilidade Celular	14
3.2.6 Imunocitoquímica	15
4- RESULTADOS	17
4.1 Cromatografia - Isolamento	17
4.2 Imunocitoquímica	17
4.3 Quantificação da Viabilidade Celular	20
5- DISCUSSÃO	22
6- CONCLUSÃO	25
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1- INTRODUÇÃO

1.1 Neurotransmissão Excitatória: *L*-Glutamato

Fora da comunidade científica biomédica, o *L*-Glutamato (*L*-Glu) é provavelmente mais conhecido como glutamato monossódico, o qual é responsável por melhorar o aroma e gosto de alimentos. Entretanto, a maior razão de pesquisas envolvendo este aminoácido, é pelo fato que o *L*-Glu é o maior transmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC) de vertebrados e invertebrados (Zhou & Danbolt 2014).

A neurotransmissão mediada pelo *L*-Glu é responsável por diversas funções primordiais para o funcionamento do sistema SNC, tais como, memória e aprendizagem. Entretanto, a participação do ácido γ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório no SNC, é essencial nesses processos, pois o desequilíbrio funcional entre as sinapses excitatórias e inibitórias leva a um aumento da quantidade e permanência de *L*-Glu na fenda sináptica. Portanto, podendo levar a uma hiperestimulação de receptores específicos de *L*-Glu. Deste modo, ocorre uma série de eventos excitotóxicos, iniciados pelo influxo celular excessivo de íons de Ca^{2+} (Danbolt 2001; Zhou & Danbolt 2013).

O *L*-Glu exerce seu efeito excitatório através da ativação de três tipos de receptores ionotrópicos acoplados a canais de íons de Na^+ e de Ca^{2+} , o N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA) e ácido caínico, além de oito subtipos de receptores metabotrópicos, m-GluR 1-8 (Figura 1) (Bai et al. 2013; Vandenberg & Ryan 2013).

A excitabilidade glutamatérgica é limitada devido à ação de transportadores glutamatérgicos de alta afinidade, localizados tanto em membranas de neurônios, quanto de astrócitos. Assim, para limitar o acúmulo de *L*-Glu na fenda sináptica,

existem transportadores de aminoácidos excitatórios (do inglês, aminoacid excitatory transporters - EAATs), os quais são divididos em cinco subtipos EAAT 1-5, responsáveis pela remoção do *L*-Glu em processos dependentes de gradiente iônico, estabelecidos pelos íons de Na⁺ e de K⁺ (Zhou & Danbolt 2013).

A excitotoxicidade causada pelo *L*-Glu está associada a várias condições neurológicas, tais como os acidentes vasculares cerebrais isquêmicos, autismo, epilepsia, esclerose lateral amiotrófica (ELA), glaucoma, Huntington e mal de Alzheimer (Gonzalez et al. 2014; Fontana 2015; Takahashi et al. 2015). Portanto, uma estratégia para o tratamento destas neuropatologias é a utilização de compostos que reduzam os efeitos excitotóxicos, provocados pelos níveis anormais de *L*-Glu na fenda sináptica. Dentre eles, está o Riluzol (RIL), fármaco com diferentes mecanismos de ação anti-glutamatérgicos e aprovado pela “Food and Drug Administration – FDA” dos Estados Unidos, para o tratamento de ELA. Contudo, é pouco efetivo além disso, pode provocar diversos efeitos colaterais (Storch et al. 2000; Lamanauskas & Nistri 2008; Dennys et al. 2015). Deste modo, é necessário o desenvolvimento de novos fármacos com maiores eficácias, bem como, menores efeitos adversos.

Figura 1. Esquema de uma neurotransmissão Glutamatérgica. (a) – Armazenamento de L-Glu em vesículas pré-sinápticas por transportadores vesiculares de L-Glu; (b) - Liberação de L-Glu para a fenda sináptica por atividade dependente de proteínas SNARE; (c) influxo de íons Na^+ no neurônio pré-sináptico, responsáveis pela atividade das proteínas SNARE (d). Liberação de L-Glu para a fenda sináptica (e) Ativação de receptores metabotrópicos (f, g, h, i) ativação de receptores ionotrópicos; (j) Recaptação de L-Glu por EAAT2; (k). Receptor metabotrópico atuando na liberação de L-Glu (retirado de Sanacora, Krystal, & Manji 2008).

1.2 Excitotoxicidade e Neuroproteção

A excitotoxicidade refere-se aos efeitos tóxicos decorrentes de uma excessiva e prolongada ativação de receptores de aminoácidos, por exemplo L-Glu. Esse tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores, pelo fato de ser um aminoácido excitatório, como mencionado, com papel crucial em inúmeras doenças neurodegenerativas (Mehta et al. 2013).

Nesse contexto, a elevação de *L*-Glu no espaço extracelular e a superativação de seus receptores específicos resultam no influxo excessivo de íons de Ca^{2+} para o neurônio pós-sináptico, ocasionando a ativação de uma cascata de fosfolipases, endonucleases e proteases, podendo ocorrer morte celular, por necrose ou apoptose (Figura 2B) (Fontana 2015). Outra correlação entre morte celular e *L*-Glu é que em situações onde este neurotransmissor está em excesso na fenda sináptica, ocorre competição pela recaptação de *L*-Glu e cisteína, consequentemente ocorrerá menor produção de glutatona, implicando em uma menor defesa contra o estresse oxidativo, levando à morte celular (Pereira & Oliveira 2000; Liu, Albano & Lobner 2014).

Os astrócitos, além da homeostase neuronal, como equilíbrio iônico, pelo tamponamento de íons de K^+ , e suprimento energético (Dringen & Hamprecht 1992), são responsáveis pela regulação dos níveis de alguns neurotransmissores (*L*-Glu e GABA) na fenda sináptica. Portanto, podem ser considerados como moduladores de eventos excitotóxicos (Ouyang et al. 2014). Alguns trabalhos demonstraram que as células da glia, em particular os astrócitos podem alterar respostas neuronais a excitotoxicidade, interferindo na sensibilidade de neurônios ao *L*-Glu, devido a recaptação deste neurotransmissor na fenda sináptica, assim exercendo papel neuroprotetor (Dugan et al. 1995; Carrier et al. 2006; Nimmerjahn & Bergles 2015). Logo, é essencial a presença deste tipo celular na composição, por exemplo, do meio de cultura celular para a investigação de compostos com possíveis efeitos neuroprotetores.

Figura 2. Esquema da neurotransmissão glutamatérgica, excitotoxicidade e o papel fundamental dos astrócitos por meio da atividade de EAAT2 (Segundo Fontana 2015).

1.3 Neurotoxinas de artrópodes

Por consequência do processo contínuo de evolução, animais venenosos e peçonhentos foram selecionados com um coquetel de moléculas bioativas, que lhes conferiram uma enorme vantagem na luta pela sobrevivência e consequentemente, sucesso adaptativo. Estes compostos, principalmente os neuroativos, são utilizados para paralisar presas ou como defesa contra predadores. Tais moléculas interferem no funcionamento normal de mecanismos neurais, com alta afinidade e seletividade, para receptores, transportadores e canais iônicos, seja na inibição ou excitação de neurônios no SNC e periférico, tanto de insetos como de mamíferos (Lewis & Garcia 2003; Mortari et al. 2007).

Entre estas moléculas, merecem destaque aquelas provenientes de peçonhas de aranhas, pois atuam sobre canais de íons de Na^+ e de K^+ , transportadores de GABA e de *L*-Glu (Garcia 2004; de O Beleboni et al. 2004; Fachim et al. 2011). Devido às suas características, estes compostos são alvo de muitas pesquisas na busca por novas substâncias neuroativas.

1.4 Aranha *Parawixia bistriata*

Figura 3. Fotografias representativas da aranha *Parawixia bistriata* - macho (A). Em (B) pode ser visualizado um ninho desta aranha. Fotos Dr. Dirk Louis P. Schorkopf (Arquivos do Laboratório de Neurobiologia e Peçonhas).

Há 22 anos, pesquisadores do laboratório de Neurobiologia e Peçonhas (LNP) da FFCLRP-USP têm investigado a ação de venenos de vespas e aranhas sobre o SNC de roedores. Os estudos levaram ao isolamento de vários compostos das peçonhas das vespas *Agelaia vicina*, *Polybia ignobilis*, *Polybia occidentalis*, da aranha solitária *Scaptocosa raptoria* e da aranha semi - colonial *Parawixia bistriata* com ações anticonvulsivante, ansiolítica, neuroprotetora e antinociceptiva.

A aranha *P. bistriata* (Figura 3) é um aracnídeo, que se distribui pelos cerrados da América do Sul (Levi 1992). Devido à existência de sinapses gabaérgicas e glutamatérgicas em insetos, pressupôs que as neurotoxinas deste veneno apresentassem efeitos no SNC de roedores e outros mamíferos (Usherwood 1972; Cairrão et al. 2002).

A injeção intracerebral do veneno bruto de *P. bistriata* em roedores é capaz de provocar crises convulsivas. Entretanto, uma análise neuroetológica revelou que estas crises foram diferentes daquelas induzidas pelo ácido caínico. Isto pode ser

atribuído ao grande número de neurotoxinas presentes no veneno bruto, as quais podem atuar em uma variedade de receptores de neurotransmissores ou canais iônicos, se opondo ao ácido caínico que possui atividade específica em receptores glutamatérgicos ionotrópicos, por exemplo AMPA e cainato (Cairrão 2001). Diversas atividades biológicas e farmacológicas dos compostos da peçonha desta aranha foram descritas, como, ansiolíticas, anticonvulsivas e neuroprotetoras (Liberato et al. 2006; Gelfuso et al. 2007).

As moléculas purificadas desta peçonha tem sido objeto de estudo devido as suas ações em neurotransmissores e transportadores (Fontana et al. 2003; Fontana et al. 2007; Fachim et al. 2011; Fontana 2015). De acordo com, Fontana (2003) e Beleboni (2006) estas moléculas atuam nos transportadores gliais de *L*-Glu e GABA em sinaptossomas corticais de ratos. Dentre os compostos neuroativos, a Pbtx1.2.3 (atualmente Parawixina1) demonstrou atividade, aumentando a captação de *L*-Glu sem alterar a sua liberação. Consequentemente esse composto apresentou efeito neuroprotetor em ratos submetidos a modelos experimentais de isquemia retiniana (Fontana et al. 2003). Outra molécula que apresenta atividade biológica importante é a FrPbII (atualmente Parawixina2). Quando injetada intracerebroventricularmente aboliu crises convulsivas induzidas por convulsivantes químicos e inibiu a captação de GABA, sem interferir na liberação deste neurotransmissor (Beleboni et al. 2006; Gelfuso et al. 2007). Considerando as potenciais atividades neuroprotetoras dos compostos obtidos de *P. bistriata*, apresentadas em estudos anteriores e a necessidade de buscar novas estratégias terapêuticas para doenças neurológicas, é essencial investigar possíveis efeitos neuroprotetores de compostos, obtidos da peçonha deste animal.

Dessa maneira, a realização do presente estudo foi fundamental, uma vez que foi utilizada a metodologia de cultura primária de neurônios e glias. Um modelo bastante utilizado para estudos de neurotoxicidade, que permite a realização de um número maior de ensaios em menor tempo, além de reduzir o número de animais utilizados em relação aos estudos *in vivo*, e favorece estudos de mecanismo de ação, devido ao fato das variáveis serem bem mais controladas (Gähwiler et al. 1997; Molz et al. 2005; Molz et al. 2008).

2- OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar o efeito neuroprotetor da fração RT10, obtida da peçonha de *P.bistriata* em cultura mista de células (neurônio e glia) do cérebro de ratos Wistar.

2.2 Específicos

- Padronizar o modelo experimental de cultura primária mista de células (neurônio e glia), em nosso laboratório.
- Coletar espécimes de *P.bistriata*, extrair glândulas, reservatório de veneno e preparar o extrato bruto.
- Isolar a fração RT10 da peçonha de *P. bistriata*.
- Fazer uma curva de concentração para lesão com L-Glu.
- Fazer uma curva de tempo com diferentes concentrações.
- Conhecendo o tempo e a concentração lesiva de L-Glu fazer uma curva dose-resposta com a fração RT10.
- Realizar ensaios de viabilidade celular por meio do sal sódico de resazurina e de imunocitoquímica através das marcações para NeuN, MAP2 e GFAP.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das aranhas e isolamento dos compostos.

3.1.1 Coleta da aranha *P. bistrata*, extração das glândulas e reservatório de veneno e preparação do extrato bruto.

As coletas dos espécimes de *P. bistrata* foram realizadas no perímetro rural de municípios vizinhos a Ribeirão Preto (SP). As aranhas foram retiradas de seus ninhos com auxílio de um puçá e armazenadas em uma conservadora térmica com gelo moído durante a coleta. A ulterior extração de glândulas e reservatórios de veneno foi realizada com auxílio de pinça e tesoura oftálmicas, sendo o material coletado acondicionado em microtubos, os quais foram armazenados à -70° C, até posterior utilização.

3.1.2 Isolamento das frações da peçonha de *P. bistrata*

Foram extraídas aproximadamente 6000 glândulas e reservatórios de veneno, que foram macerados e homogeneizados em solução de água deionizada/acetonitrila (H₂O/ACN; 1:1, v/v) formando extratos, os quais foram centrifugados a 3500.g por 3 min, a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em filtro Microcon (*cutoff*= 3000 Da, Millipore) em centrifugação a 3500.g, a 4 °C. O filtrado resultante foi liofilizado e pesado.

3.1.3 Etapas de isolamento em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).

O extrato liofilizado (240 mg) foi solubilizado em 20 mL de H₂O/ACN (9:1, v/v) e filtrado em membrana de acetato de celulose (poro de 0,45 µm, Millipore, EUA). Em seguida, alíquotas de 1,0 mL deste filtrado (12 mg/mL) foram injetadas no CLAE (modelo LC-6A, Shimadzu, Japão), equipado com detector de UV-visível (modelo

SPD-6A, Shimadzu, Japão). Uma coluna Shim-pack ODS-C18 em escala preparativa foi utilizada (250 x 20 mm, 5 µm; Shimadzu, Japão).

O protocolo desenvolvido para o isolamento do veneno utilizou como fases móveis H₂O com 0,07% de ácido trifluoroacético (TFA) - bomba A; e ACN com 0,07% de TFA - bomba B. O fluxo foi de 9,0 mL/min e os cromatogramas foram registrados em 215 e 245 nm. Os gradientes de eluição foram: de 0 a 10 min: isocrático a 1% de B; de 10 a 40 min: gradiente linear até 30% de B; de 40 a 45 min: gradiente linear até 100% de B (limpeza da coluna).

Ao final, as frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas a -70°C. Dentre elas, estava a RT10 que consiste em um agrupamento de moléculas, obtidas nos primeiros 10 minutos de fracionamento.

As etapas de isolamento foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, FCFRP/USP.

3.2 Bioensaios

O modelo experimental de cultura primária de neurônios e glias (CPNG) foi empregado para investigar o efeito neuroprotetor da fração RT10. As células foram obtidas com modificações, baseadas nos artigos de Xu et al. (2012), Stoppelkamp et al. (2010) e Seibenhener e Wooten (2012).

3.2.1 Animais

Para este procedimento foram utilizados ratos Wistar, com um dia após-nascimento.

3.2.2 Obtenção das células e Meio de Cultura

Os animais recém-nascidos foram decapitados, tiveram seus encéfalos retirados e introduzidos em 12 mL de uma solução salina balanceada de Hanks (HBSS), contida em uma placa de Petri, que se encontrava sobre uma barra de

gelo artificial. Em uma cabine de biossegurança (ESCO, China), o tronco cerebral foi descartado e os hemisférios transferidos para uma placa de Petri contendo 10 mL de meio neurobasal A (GIBCO) e 1 mL de papaína (2mg/mL; Sigma-Aldrich, EUA) dissolvida em meio neurobasal A (Sigma-Aldrich, EUA), o tecido foi incubado por 40 minutos a 37°C em uma incubadora de CO₂ (Sanyo, Japão). Após o período de incubação, por meio de uma pipeta de Pasteur, foi realizada a dissociação mecânica do tecido, em 3 mL de HBSS, contendo 10% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich, EUA) e 5,5% de DNase (Sigma-Aldrich; EUA). O tecido foi centrifugado durante 3 minutos, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em mais 3 mL de solução de HBSS contendo soro e DNase para ser centrifugado por 5 minutos. O pellet foi filtrado em uma membrana de 100 µm e então ressuspensionado em 3mL de meio de cultura, para contagem em câmara de Neubauer. O meio de cultura completo é composto por neurobasal A (1x, Gibco, EUA), 1% de antibiótico (Estreptomicina/penicilina, Invitrogen, EUA), 2% de suplemento B27 (50X, Gibco, EUA), 0,5 mM de Glutamax (Invitrogen, EUA). As células foram inseridas a uma densidade 5×10^5 por poço, em placas de 24 poços, plaqueadas previamente com Poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich; EUA). As culturas foram alimentadas a cada 2-3 dias, com o meio de cultura completo, sendo que foram removidos 2/3 do meio antigo, e adicionado 2/3 do meio novo.

3.2.3 Preparação das Lamínulas

Para realização dos experimentos de imunocitoquímica (Item 3.2.6), lamínulas circulares foram autoclavadas, inseridas com auxílio de uma pinça estéril em placas de 24 poços e plaqueadas com Poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich; EUA), em ambiente estéril. As células foram inseridas a uma densidade de 3×10^4 , por poço da placa contendo as lamínulas.

3.2.4 Lesão e Tratamentos

Para padronizar a concentração tóxica de *L*-Glu, as CPNGs foram expostas a diferentes concentrações de *L*-Glu sob diferentes tempos, em solução de Locke (134mM NaCl, 25 mM KCl, 4mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, 2.3 mM CaCl₂, 5 mM glucose, pH 7.4) (Tayeboon & Tavakoli 2013). Os efeitos tóxicos das concentrações de *L*-Glu foram comparados ao grupo controle, o qual as CPNGs foram expostas a solução de Locke, na ausência de qualquer concentração de *L*-Glu. Os poços de cultura contendo as células foram tratados com o RIL ou RT10, previamente (durante 3 horas) a exposição da concentração tóxica de *L*-Glu (5mM), com duração de 12 horas. Os tratamentos (lesão e neuroproteção) foram conduzidos no 7º dia *in vitro* (DIV) das CPNGs (tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Concentrações e tempos utilizados para padronização da concentração tóxica de *L*-Glu e dos tratamentos de neuroproteção com RIL e RT10, para as CPNGs).

Lesão e Tratamentos	Tempos de Exposição (Horas)			
L-Glu (µM)	1	3	6	12
50	X	X		
100	X	X	X	
500			X	
L-Glu (mM)				
1			X	X
5				X
10				X
Neuroproteção: RIL (100 µM)		X		
Neuroproteção: RT10 (2;0,2; 0,02; 0,002µg/µL)		X		

Tabela 2. Imagem representativa de uma placa de Elisa de 24 poços, com os grupos experimentais e disposições dos experimentos usados em nosso estudo. Os tratamentos foram realizados em triplicata para cada grupo experimental das CPNGs.

	1	2	3	4	5	6
A	Controle	Controle	Controle	L-Glu (5mM)	L-Glu (5mM)	L-Glu (5mM)
B	RIL(100 μ M)	RIL(100 μ M)	RIL(100 μ M)	L-Glu +RIL	L-Glu +RIL	L-Glu +RIL
C	RT10 (2 μ g/ μ L)	RT10 (2 μ g/ μ L)	RT10 (2 μ g/ μ L)	L-Glu +RT10 (2 μ g/ μ L)	L-Glu +RT10 (2 μ g/ μ L)	L-Glu +RT10 (2 μ g/ μ L)
D	L-Glu +RT10 (0.2 μ g/ μ L)	L-Glu +RT10 (0.2 μ g/ μ L)	L-Glu +RT10 (0.2 μ g/ μ L)	L-Glu +RT10 (0.02 μ g/ μ L)	L-Glu +RT10 (0.02 μ g/ μ L)	L-Glu +RT10 (0.02 μ g/ μ L)

3.2.5 Viabilidade Celular

O sal sódico de resazurina (SSR; Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado para mensurar quantitativamente a viabilidade celular, onde devido a atividade das células presentes no meio, sofre redução passando de uma cor não fluorescente (azul) para uma fluorescente (rosa). Portanto, quanto maior for a fluorescência, maior será a viabilidade celular. O reagente foi adicionado (concentração de 10%) nos poços contendo o meio para incubação a 37°C e 5% de CO₂ durante 4 horas.

A fluorescência do reagente foi medida em um leitor (Millipore CytoFluor 2300, EUA) em 560 de excitação a 590nm de emissão, após 24 horas do tempo de exposição ao L-Glu (White, DiCaprio & Greenberg 1996) e foi expressa em porcentagem de células mais desvio padrão.

3.2.6 Imunocitoquímica

A identificação dos tipos celulares, neurônios e astrócitos, presentes nas culturas foi realizada por marcação imunocitoquímica, utilizando anticorpos específicos para cada tipo celular. Para verificarmos a presença de neurônios foi feita imunomarcação para proteína nuclear de neurônios (NeuN), utilizando anticorpo primário monoclonal anti-NeuN produzido em camundongo (diluído na proporção de 1:500; Abcam, EUA).

Para distinguirmos os neurônios das glias foi usada a marcação com proteína fibrilar acídica glial (GFAP), utilizando anticorpo primário anti-GFAP produzido em galinha (diluído na proporção de 1:500; Abcam, EUA). Além disso, também foi feita imunomarcação para proteína associada à microtúbulo (MAP2), utilizando anticorpo monoclonal primário, anti-MAP2 produzido em coelhos (diluído na proporção de 1:1000; Abcam, EUA). Esta é uma proteína estrutural associada à microtúbulos, expressa principalmente em neurônios (Dehmelt & Halpain 2004) e foi utilizada para avaliar a morfologia destas células e, conseqüentemente, seu funcionamento normal.

Após o período de incubação com os anticorpos primários, a cultura foi apresentada aos anticorpos secundários para cada tipo de anticorpo previamente utilizado. Desta forma, foram utilizados os seguintes anticorpos secundários conjugados com fluoróforos excitáveis, por fonte luminosa, com diferentes comprimentos de onda, a saber: anticorpo secundário monoclonal produzido em cabra anti-camundongo (AlexaFluor 594, diluição na proporção de 1:1000 v/v; Abcam, EUA), anticorpo secundário monoclonal produzido em coelho anti-galinha, (AlexaFluor 405, diluição na proporção de 1:1000 v/v; Abcam, EUA) e anticorpo secundário monoclonal produzido em asno anti-coelho (AlexaFluor 488, diluição na

proporção de 1:1000 v/v; Abcam, EUA). Após o término das imunomarcações as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando o meio de montagem Fluoromount (Sigma-Aldrich, EUA) e avaliadas em um microscópio de fluorescência Leica DM5000 (Leica Microsystems, Alemanha).

A aquisição de imagens foi realizada por meio do sistema de câmera (Leica FX300; Leica Microsystems, Alemanha), acoplada ao microscópio, utilizando o software de aquisição e análise de imagens microscopia Leica Application Suite (LAS; Leica Microsystems, Alemanha). O software Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>; EUA) foi utilizado para obter a intensidade da fluorescência (IF) dos neurônios marcados com anti-MAP2. Assim, quanto maior a fluorescência, maior a presença de prolongamentos neuronais.

4- RESULTADOS

4.1 Cromatografia - Isolamento

O protocolo de fracionamento utilizado neste estudo resultou na separação de 18 frações da peçonha de *P. bistrata* (Figura 4), dentre as quais, a RT10, que foi coletada nos primeiros 10 minutos da etapa de fracionamento.

Figura 4. Cromatogramas representativos registrados em 215 e 245nm obtidos no fracionamento do extrato de 6000 glândulas e reservatórios de veneno de *P. bistrata*, em coluna ODS de fase reversa, em CLAE-DAD da Shimadzu (Japão), escala preparativa.

4.2 Imunocitoquímica

Os resultados mostram que a cultura primária mista possui células viáveis, ou seja, neurônios e astrócitos normais, quando essas células foram marcadas com os anticorpos anti-MAP2, anti-NeuN e anti-GFAP (Figura 5).

Figura 5. Fotomicrografias representativas de imunomarcações realizadas nas CPNGs, controles. A) Anti-MAP2; B) Anti-NeuN; C) Anti-GFAP; Aumento de 200x.

Figura 6. Fotomicrografias representativas da imunomarcaço com anti-MAP2, realizadas nas CPNGs. Tratamento de trs horas antes da leso e 12 horas na presena de L-Glu. A) Grupo controle, soluo de Locke; B) com RIL (100M); C) com RT10 (2g/L). D) com L-Glu (5mM); E) com RIL (100M), mais L-Glu (5mM); F) com RT10 2g/L, mais L-Glu (5mM); Aumento de 200x.

Quando comparamos qualitativamente as clulas do grupo controle com as do grupo das clulas que receberam L-Glu, observamos que este, reduziu os dendritos (Fig. 6D). A RT10 e o RIL atenuaram os danos das projees celulares dos neurnios marcados com anti-MAP2 (Figura 6E e 6F). Quanto s clulas que foram expostas a RT10 e ao RIL, sem a adio de L-Glu, essas no apresentaram danos neuromorfolgicos (Figura 6B e 6C). A IF dos neurnios marcados com anti-MAP2 de todos os grupos experimentais foi mensurada (Figura 7). O RIL e a RT10 foram

neuroprotetores com IF de 17 e 38%, respectivamente, em relação ao grupo experimental de células expostas somente ao L-Glu. A diferença de proteção entre os tratamentos foi de 21% para a RT10. Portanto, a RT10 foi mais neuroprotetora que o RIL (Figura 7). As exposições das células somente aos tratamentos não demonstraram diferença significativa da IF, quando comparadas ao grupo controle (Figura 7).

Figura 7. Gráfico representativo da intensidade de fluorescência de MAP2, expresso em porcentagem e desvio padrão, sob 12h de exposição a 5mM de L-Glu, de neurônios e glias de cérebro de ratos Wistar recém-nascidos. Tratamento com RIL (100 µM) e RT10 (2µg/µL) durante 3 horas, previamente a exposição de 5mM de L-Glu e diferenças significativas (***p< 0,001 vs Controle; ##p<0,01 vs L-Glu; +++p<0,001 vs L-Glu e **p<0,01 vs RIL). ANOVA de uma via, seguido pelo teste Student Newman-Keuls

4.3 Quantificação da Viabilidade Celular

Com relação às culturas de células tratadas com *L*-Glu, sob as concentrações de 50, 100, 500 μ M e 1mM em diferentes tempos (Figura 8), não houve diferença significativa quando comparadas com o grupo controle. Contudo, ocorreu morte celular de 33 e 37% das células expostas em 5 e 10mM de *L*-Glu, respectivamente, para o tempo de 12h (Figura 8).

Figura 8. Gráfico representativo da viabilidade celular, em porcentagem de fluorescência e desvio padrão, da exposição a diferentes concentrações de *L*-Glu, em neurônios e glías, do cérebro de ratos Wistar recém-nascidos, em uma hora, 3, 6 e 12 horas de exposição. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni.

O RIL foi neuroprotetor, diminuindo em 5% a morte celular. A fração RT10 na maior concentração testada (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) também reduziu significativamente a toxicidade, provocada pelo L-Glu, com efeito maior que RIL, já que evitou em 10% a morte celular. As demais concentrações avaliadas da RT10, não foram efetivas. Os poços que continham somente RT10 ou RIL não alteraram significativamente a viabilidade celular, em relação ao grupo controle (Figura 9).

Figura 9. Gráfico representativo da viabilidade celular, em porcentagem de fluorescência e desvio padrão, sob 12h de exposição a 5mM de L-Glu, de neurônios e glia de ratos Wistar recém-nascidos. Exposição somente a solução de Locke (Controle), RIL (100 μM) e RT10 (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) Tratamento com RIL (100 μM) e RT10 (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 3 horas, previamente a exposição de 5mM de L-Glu e diferenças significativas (***) $p < 0,001$ vs Controle; *) $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs L-Glu-5mM; + $p < 0,05$ vs RIL+L-Glu 5mM). ANOVA de uma via, seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

5- DISCUSSÃO

As Parawixinas (Pwxs) 1 e 2 compõem a fração RT10, que teve os seus picos registrados e coletados nos perfis de UV (215 e 245 nm) nos primeiros 10 minutos da cromatografia. A RT10 foi neuroprotetora no modelo de CPNGs, contra a toxicidade provocada pela concentração de 5mM de *L*-Glu, seja preservando os dendritos e aumentando a IF de anti-MAP2 nos ensaios de imunocitoquímica, assim como reduzindo a morte celular nos testes com o SSR.

Neste sentido acreditamos que a neuroproteção da RT10 seja devido a presença das Pwxs 1 e 2, pois foi demonstrado que estes compostos possuem atividades neuroprotetoras e anticonvulsivas, em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal e glaucoma agudo *in vivo*. A atividade biológica, por exemplo, da Pwx1, foi responsável pelo aumento da atividade de EAAT2 (expressos em linhagem celular COS-7), sem atuar no transporte reverso deste transportador (Fontana et al. 2007). Ainda, Mortensen et al. 2015 demonstraram que esse aumento da atividade de EAAT2 é devido a seletividade da Pwx1 pelo aminoácido Histidina 71, localizado no domínio transmembrana 2 deste transportador. A Pwx2, em sinaptossomas corticais de roedores, provocou um potente efeito inibitório sobre a recaptação do anti GABA e da glicina, além de não alterar a atividade dos canais de íons de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺, dos receptores de GABA, da enzima GABA transaminase ou do transporte reverso neste neurotransmissor. (Beleboni et al. 2006).

O RIL foi utilizado como tratamento controle, pois além de ser usado por pacientes com ELA, já foi sugerido para o tratamento de outras neuropatologias como Epilepsia e Huntington (Lamanauskas & Nistri 2008). Este fármaco possui diferentes mecanismos de ação contra a neurotransmissão glutamatérgica, já que

é capaz de aumentar a síntese e atividade de transportadores específicos de *L*-Glu nos astrócitos, além de inibir o influxo de Ca^{2+} , em canais iônicos, acoplados a receptores de *L*-Glu (Hubert et al. 1994; Carbone, Duty & Rattray 2012; Nagoshi, Nakashima & Fehlings 2015). Consequentemente, o RIL foi neuroprotetor neste estudo, entretanto, a RT10 demonstrou maior efetividade nos ensaios qualitativos e quantitativos, possivelmente, por ser capaz de atuar no transporte de diferentes neurotransmissores, *L*-Glu e GABA. Além do mais, paradoxalmente foi relatado que o RIL, também pode provocar a liberação de *L*-Glu dos astrócitos para a fenda sináptica, por um mecanismo de ação desconhecido (Yoshizumi, Eisenach & Hayashida 2012). Ainda, como descrito anteriormente, o RIL pode provocar diversos efeitos colaterais indesejados tais como tontura, diarreia, anorexia, dor de cabeça, náusea e vômito (Zarate 2008). Dessa forma, é fundamental buscar novas alternativas de tratamentos, assim proporcionando uma melhor qualidade de vida dos pacientes.

Na literatura tem sido descrito que menores concentrações daquelas utilizadas em nosso estudo causam toxicidade em cultura de neurônios (Figiel & Dzwonek 2006; Mikami & Yamazawa 2015; Xu et al. 2016). Usando 50, 100, 500 μM e 1mM não foram tóxicas para as células? A cultura celular por nós utilizada é composta de neurônios e astrócitos. Essas glias, por sua vez, exercem atividade neuroprotetora por meio da captação de *L*-Glu da fenda sináptica, porque possuem transportadores de *L*-glu, por exemplo do tipo EAAT2. Portanto, protegeu os neurônios, quando esses foram expostos ao *L*-Glu, evidenciando a importância destas células em processos de modulação sobre a excitotoxicidade. Além do que a Pwx1 atua nesse tipo de transportador.

Alem disso, a partir do 7º DIV, culturas primárias de neurônios já apresentam expressão de subunidades do receptor NMDA (NR1, NR2A e NR2B), que é o mais importante para a excitotoxicidade e consequentemente, influxo de íons de Ca^{2+} , em canais dependentes de voltagem (Brewer et al. 2007). Portanto, não podemos descartar a possibilidade de que a RT10 possa estar atuando também nesses receptores. Vale ressaltar que estudos em receptores para o *L*-glu, com moléculas da peçonha da *P.bistriata* são inconclusivos e ainda devem ser continuados.

Nesse sentido, a metodologia experimental de CPNGs, possibilitará a análise em projetos posteriores, de um número maior de compostos com atividade desconhecida, em menor tempo, utilizando uma quantidade menor de animais, em relação aos modelos de epilepsia ou glaucoma *in vivo*. Além disso, a análise do efeito neuroprotetor da RT10 foi fundamental, pois introduziu uma nova metodologia experimental em nosso laboratório e foi um passo importante para a prospecção de um novo fármaco, contra doenças neurodegenerativas. Ademais, essa metodologia possibilita maior controle das variáveis, para estudos de mecanismo de ação de moléculas isoladas e seus análogos sintéticos.

6- CONCLUSÃO

A fração RT10, foi neuroprotetora das CPNGs, expostas a 5mM de *L-Glu* durante 12 horas. Outrossim, foi significativamente mais eficaz que o RIL, que é usado contra ELA, e pode provocar diversos efeitos colaterais indesejados. Estes resultados estão de acordo com os da literatura, cujas Paraxiwinas 1 e 2 presentes na RT10 são anticonvulsivantes e neuroprotetoras, em modelos experimentais *in vivo* ou *in vitro*. Portanto, podemos considerar que a RT10 é uma importante ferramenta para a concepção de novos fármacos, contra doenças neurodegenerativas. Além disso, um modelo experimental de CPNGs foi padronizado. Esse, por sua vez será essencial para desvendar potenciais efeitos neuroprotetores de compostos da peçonha de *P.bistriata*, bem como auxiliar na elucidação dos mecanismos de ação.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bai, N., Aida, T., Yanagisawa., Katou, S., Sakimura, K., Mishina, M., 2013. NMDA receptor subunits have different roles in NMDA-induced neurotoxicity in the retina. *Molecular Brain*, 6(1), pp.1–9.
- Beleboni, O. et al., 2006. Neurochemical Characterization of a Neuroprotective Compound from *Parawixia bistriata* Spider Venom That Inhibits Synaptosomal Uptake of GABA and Glycine □. , 69(6), pp.1998–2006.
- Brewer, L.D. et al., 2007. Increased vulnerability of hippocampal neurons with age in culture: Temporal association with increases in NMDA receptor current, NR2A subunit expression and recruitment of L-type calcium channels. *Brain Research*, 1151(1), pp.20–31.
- Cairrão, M.A.R., Guizzo, R., dos Santos, W.F., Cairasco, N.G., 2001. A comparative neuroethological study of limbic seizures induced by *Parawixia bistriata* venom and kainic acid injections in rats. , 55(1), pp.79–86.
- Cairrão, M.A.R., Ribeiro, A.M., Pizzo, A.B., Fontana, A.C.K., Beleboni, R.O., Coutinho-Netto, J., Miranda, A., Santos, W.F., 2002. Anticonvulsant and GABA Uptake Inhibition Properties of Venom Fractions from the Spiders *Parawixia bistriata* and *Scaptocosa*. *Pharmaceutical Biology*, 40(6), pp.472–477.
- Carbone, M., Duty. S., Rattray, M., 2012. Europe PMC Funders Group Riluzole elevates GLT-1 activity and levels in striatal astrocytes. , 60(1), pp.31–38.
- Carrier, R.L. et al., 2006. A sensitive and selective assay of neuronal degeneration in cell culture. *Journal of neuroscience methods*, 154(1-2), pp.239–244.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. , 65, pp.1–105.
- Dehmelt, L. & Halpain, S., 2004. Protein family review The MAP2 / Tau family of microtubule-associated proteins. , pp.1–10.
- Dennys, C.N. et al., 2015. Chronic inhibitory effect of riluzole on trophic factor production. *Experimental Neurology*, 271, pp.301–307.
- Dringen, R. & Hamprecht, B., 1992. Glucose, insulin, and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures. *Journal of neurochemistry*, 58(2), pp.511–517.
- Dugan, L.L., Bruno, V.M.G. & Amagasu, S.M., 1995. Glia Modulate the Response of Murine Cortical Neurons to Excitotoxicity: Glia Exacerbate AMPA Neurotoxicity. , 15(6), pp.4545–4555.
- Fachim, H.A. et al., 2011. Neurobiological activity of Parawixin 10, a novel anticonvulsant compound isolated from *Parawixia bistriata* spider venom

- (Araneidae: Araneae). *Epilepsy & behavior : E&B*, 22(2), pp.158–164.
- Figiel, I. & Dzwonek, K., 2006. TNF α and TNF receptor 1 expression in the mixed neuronal – glial cultures of hippocampal dentate gyrus exposed to glutamate or trimethyltin. *Brain Research*, 31, pp.17–28.
- Fontana, A.C.K., 2015. Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *Journal of Neurochemistry*, p.n/a–n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.13200>.
- Fontana, A.C.K. et al., 2007. Enhancing glutamate transport: mechanism of action of Parawixin1, a neuroprotective compound from Parawixia bistriata spider venom. *Molecular pharmacology*, 72(5), pp.1228–1237.
- Fontana, A.C.K. et al., 2003. Purification of a neuroprotective component of Parawixia bistriata spider venom that enhances glutamate uptake. *British journal of pharmacology*, 139(7), pp.1297–1309.
- Gähwiler, B.H. et al., 1997. Organotypic slice cultures : a technique has come of age. *Trends in Neurosciences*, 20(10), pp.471–477.
- Garcia, M.L., 2004. Gate expectations - The opening and closing — gating — of ion channels in response to specific stimuli is crucial for cell function. The membrane-partitioning activities of two venom toxins give insights into the mechanisms involved. *Nature*, 430, pp.153–155.
- Gelfuso, E.A. et al., 2007. Neuropharmacological profile of FrPbAll, purified from the venom of the social spider Parawixia bistriata (Araneae, Araneidae), in Wistar rats. *Life sciences*, 80(6), pp.566–572.
- Gonzalez, J. et al., 2014. NMDARs in neurological diseases: a potential therapeutic target. *The International journal of neuroscience*, pp.1–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25051426> [Accessed October 16, 2014].
- Hubert, J.P. et al., 1994. Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratridine in rat cultured granule cells : evidence for a dual action. *Br. J. Pharmacol.*, 113, pp.261–267.
- Lamanauskas, N. & Nistri, A., 2008. Riluzole blocks persistent Na⁺ and Ca²⁺ currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 27, pp.2501–2514.
- Levi, H.W., 1992. SPIDERS OF THE ORB-WEAVER GENUS PARAWIXIA AMERICA (ARANEAE : ARANEIDAE). *Bulletin Museum of Comparative Zoology*, 153(1), pp.1–46.
- Lewis, R.J. & Garcia, M.L., 2003. THERAPEUTIC POTENTIAL OF VENOM PEPTIDES. *Nature reviews*, 2, pp.790–802.

- Liberato, J.L. et al., 2006. Anticonvulsant and anxiolytic activity of FrPbAll, a novel GABA uptake inhibitor isolated from the venom of the social spider *Parawixia bistriata* (Araneidae: Araneae). *Brain research*, 1124(1), pp.19–27.
- liu, X., Albano, R., Lobner, D., 2014. FGF-2 induces neuronal death through upregulation of system xc-. *Brain Research*, 1547, pp.25–33. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.018>.
- Mehta, A. et al., 2013. Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*, 698(1-3), pp.6–18.
- Mikami, Y. & Yamazawa, T., 2015. Chlorogenic acid , a polyphenol in coffee , protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sciences*, 139, pp.69–74.
- Molz, S. et al., 2008. GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. *Brain research*, 1231, pp.113–120.
- Molz, S. et al., 2005. Neurotoxicity Induced by Glutamate in Glucose-Deprived Rat Hippocampal Slices is Prevented by GMP. *Neurochemical Research*, 30(1), pp.83–89.
- Mortari, M.R. et al., 2007. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. *Pharmacology & therapeutics*, 114(2), pp.171–183.
- Mortensen, O.V., Liberato, J.L., Coutinho-Netto, J., dos Santos, W.F., Fontana, A.C.K., 2015. Molecular determinants of transport stimulation of EAAT2 are located at interface between the trimerization and substrate transport domains. *Journal of Neurochemistry*, 133, pp.199–210.
- Nagoshi, N., Nakashima, H., Fehlings, M.G., 2015. Riluzole as a Neuroprotective Drug for Spinal Cord Injury: From Bench to Bedside. *Molecules*, 20, pp.7775–7789.
- Nimmerjahn, A. & Bergles, D.E., ScienceDirect Large-scale recording of astrocyte activity. *Current Opinion in Neurobiology*, 32, pp.95–106. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.015>.
- de O Beleboni, R. et al., 2004. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *European journal of pharmacology*, 493(1-3), pp.1–17.
- Ouyang, Y.-B. et al., 2014. Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia: importance of microRNAs. *Neuroscience letters*, 565, pp.53–58.
- Pereira, F. & Oliveira, C.R. De, 2000. Oxidative glutamate toxicity involves mitochondrial dysfunction and perturbation of intracellular Ca²⁺ homeostasis.

, 37, pp.227–236.

- Sanacora, G., Zarate, C.A., Krystal, J.H., Manji, H.K., 2008. Targeting the glutamatergic system to develop novel , improved therapeutics for mood disorders. *Nature reviews*, 7(April), pp.426–437.
- Seibenhener, M.L., Wooten, M.W., 2012. Isolation and Culture of Hippocampal Neurons from Prenatal Mice. *Journal of Visualized Experiments*, pp.4–9.
- Stoppelkamp, S., Riedel, G. & Platt, B., 2010. Culturing conditions determine neuronal and glial excitability. *Journal of neuroscience methods*, 194(1), pp.132–8.
- Storch, A. et al., 2000. Protective Effects of Riluzole on Dopamine Neurons : Involvement of Oxidative Stress and Cellular Energy Metabolism. *Journal of Neurochemistry*, 75, pp.2259–2269.
- Takahashi, K., Foster, J.B. & Lin, C.-L.G., 2015. Glutamate transporter EAAT2: regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-015-1937-8>.
- Tayeboon, G.S. & Tavakoli, F., 2013. Effects of Cymbopogon citratus and Ferula assa-foetida extracts on glutamate-induced neurotoxicity. , pp.706–715.
- Usherwood, P.N.R., 1972. Transmitter release. *J. Physiol.*, 227, pp.527–551.
- Vandenberg, R.J. & Ryan, R.M., 2013. Mechanisms of glutamate transport. *Physiological reviews*, 93(4), pp.1621–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24137018> [Accessed February 24, 2015].
- White, M.J., DiCaprio, M.J. & Greenberg, D. a., 1996. Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 70(2), pp.195–200. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027096001185> [Accessed October 21, 2014].
- Xu, D. et al., 2016. Neurochemistry International Neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity and induction of neurite outgrowth by T-006 , a novel multifunctional derivative of tetramethylpyrazine in neuronal cell models. *Neurochemistry international*, 99, pp.194–205.
- Xu, S.-Y. et al., 2012. A Modified Technique for Culturing Primary Fetal Rat Cortical Neurons. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012(c), pp.1–7.
- Yoshizumi, M. Eisenach, J.C. Hayashida, K., 2012. Riluzole and gabapentinoids activate glutamate transporters to facilitate glutamate-induced glutamate release from cultured astrocytes. *European journal of pharmacology*, 677, pp.87–92.

- Zarate, C., 2008. NIH Public Access. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4(9), pp.1223–1234.
- Zhou, Y., Danbolt, N.C., 2013. GABA and glutamate transporters in brain. *Frontiers in Endocrinology*, 4, pp.1–14.
- Zhou, Y., Danbolt, N.C., 2014. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm*, 121, pp.799–817.