UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO
PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO

**ANÁLISE NEUROETOLÓGICA E ESTUDO DA ATIVIDADE PRÓ-
CONVULSIVANTE E ANTICONVULSIVANTE *IN VIVO* DA
PEÇONHA BRUTA DA ARANHA *Parawixia bistriata* EM RATOS:
INJEÇÃO CENTRAL E PERIFÉRICA**

MARCELO CAIRRÃO ARAUJO RODRIGUES

Orientador: Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Dissertação de mestrado
apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto – USP, como parte
dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.
Área: Psicobiologia

Ribeirão Preto - 1999

Dedicado à:

Andrezza Neves Rodrigues: minha esposa, minha inspiração.

Aos meus pais Nadir Cairrão Rodrigues e Geraldo Araujo Rodrigues.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Wagner Ferreira, chefe do Laboratório de Neurobiologia e Peçonhas (Depto. Biologia, FFCLRP-USP), pela amizade, apoio, orientação, e pela oportunidade de trabalho a mim oferecida;
- Ao Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco, chefe do Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental (Depto. Fisiologia, FMRP-USP), pela leitura crítica dos projetos e da proforma desta dissertação, discussões proveitosas, amizade, apoio e pelo uso do programa ETHOMATIC.
- Ao Prof. Dr. José Roberto Giglio (Depto. Bioquímica, FMRP-USP), pelo uso do liofilizador.
- Ao Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto chefe do Laboratório de Neuroquímica (Depto. Bioquímica, FMRP-USP), pelas discussões proveitosas e uso das centrífugas.
- Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão, e seus orientandos Nelson Ribeiro dos Santos e José Eduardo Pandóssio, pelas discussões proveitosas e uso do aparelho ROTA-ROD.
- Aos integrantes da banca de qualificação desta dissertação: Profa. Dra. Eliana C. A. Braga, Profa. Dra. Maria Regina Sandoval e Prof. Dr. Sílvio Morato pela leitura atenciosa e valiosas críticas e sugestões a respeito do trabalho.
- À Profa. Dra. Elisabeth Spinelli de Oliveira, chefe do Laboratório de Fisiologia (Depto. Biologia, FFCLRP-USP), e seus orientandos pelas discussões proveitosas, amizade, e pelo uso do equipamento de captura de imagens.
- À Profa. Dra. Maria Regina Sandoval e Prof. Dr. Cristóforo Scavone, pela discussões a respeito da purificação de peçonhas, durante a FESBE, 1998, que auxiliaram em muito o direcionamento não só deste trabalho, mas também dos experimentos futuros.
- A todos os integrantes dos laboratórios de Neurobiologia e Peçonhas, do Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental e do Laboratório de Neuroquímica, bem como aos alunos da Psicobiologia, pelo companheirismo, amizade e discussões muito proveitosas.
- Aos meus primeiros orientadores: Profa. Dra. Mariana da Silva Araújo (Depto. Bioquímica, Disciplina de Química Geral e Analítica-UNIFESP/EPM); Dra. Míriam Aparecida Boin (Depto. Medicina, Disciplina de Nefrologia-

UNIFESP/EPM); Prof. Dr. Cristóforo Scavone (Depto. Farmacologia-ICB/USP). Como presente, carrego em mim experiências valiosas provindas de cada um dos senhores.

- Ao apoio técnico fornecido pelos senhores Amauri Ramos Pinhal e Antônio José Colusso (Laboratório de Neurobiologia e Peçonhas), pela amizade e presença, principalmente sob o sol escaldante das coletas; Flávio Del Vecchio, José Antônio Cortes de Oliveira (Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental), Vera Lúcia Aguilar Epifânio e Sílvia Helena Epifânio (Laboratório de Neuroquímica), sempre prontos a estenderem a mão amiga.
- Ao Sr. Antônio José Colusso, pela confecção das lâminas histológicas.
- Aos funcionários da Biblioteca Central, pela permanente colaboração em todas as etapas do presente trabalho.
- Aos secretários Renata Beatriz Vicentini, Míriam Cristina Osório de Souza, Carlos Augusto C. de C. Almada e Neifla Masson, pela grande colaboração e amizade.
- A todos os funcionários da FFCLRP, pelo constante apoio.
- À Sra. Leomina de Jesus Silva de Souza, pela presença constante e amiga em todo o decorrer do trabalho.
- Ao Sr. Paulo Márcio Sobreira Villela, dono da Fazenda Boa Vista (Tambaú-SP), que com tanto carinho e hospitalidade nos recebeu, permitindo a coleta de aranhas em sua propriedade.
- Ao corpo técnico e administrativo da Fire Informática, pela persistência na resolução dos problemas com computador.
- Aos animais de experimentação –aranhas e ratos- que humildemente (e contra a própria vontade) cederam suas vidas ao presente trabalho.
- À CAPES, pela bolsa de estudos fornecida.
- À FAPESP (processo número 98/0367) pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

"A desgraça é que o pensamento científico sobre a criação, quer queira, quer não, será finalmente reduzido à procura de 'células' ou 'centros' condutores da faculdade criadora. E, depois, um alemão obtuso descobrirá essas células em algum lugar da região temporal do cérebro; um outro alemão não concordará com ele e um terceiro concordará. Um russo, então, dará uma olhada no artigo sobre as células e mandará um resumo para o 'Séverni Véstnik'. O 'Vestnik Evrópi' começará a analisar esse resumo e, durante uns três anos, o ar russo ficará impregnado de uma epidemia absurda, que dará salário e popularidade aos imbecis e provocará apenas irritação nas pessoas inteligentes".

Anton P. Tchekhov- Carta 32 (1860-1904)

(apud Folha de São Paulo, 25/02/1996)

ABREVIATURAS

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AP	Acilpoliamina
Arg-636	Argiotoxina 636
$[Ca^{2+}]_i$	Concentração do cálcio intracelular
CLAP	Cromatografia líquida de alta pressão
χ^2	Chi-quadrado
DL ₅₀	Dose letal 50%, dose de substância capaz de matar 50 % dos animais ensaiados.
exp.	Experimento
FTX	<i>Funnel web toxin</i>
GABA	Ácido γ -amino butírico
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.v.	Intravenosa
i.p.	Intraperitonal
JSTX	Toxina extraída da aranha <i>Joro (Nephila clavata)</i>
1-Na-spm	1-naftilacetil espermina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PhTX	Philantotoxina
PPBL	Peçonha bruta de <i>Parawixia bistriata</i> liofilizada
PPBF	Peçonha bruta de <i>Parawixia bistriata</i> fervida
PTZ	Pentileno tetrazol
RAMPA	Receptor glutamatérgico tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
RCAINATO	Receptor glutamatérgico tipo cainato
RNMDA	Receptor glutamatérgico tipo N-metil-D-aspartato
SNP	Sistema nervoso periférico
SNC	Sistema nervoso central
s.c.	Subcutânea
TS-8F	Toxina isolada da peçonha do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> (CARVALHO <i>et al.</i> , 1998)
WAR	<i>Wistar Audiogenic Rats</i> , (GARCIA-CAIRASCO <i>et al.</i> , 1996)
U	Unidade arbitrária de concentração da peçonha

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. PEÇONHAS DE ARTRÓPODOS.....	10
1.2. COMPORTAMENTO COMO INDICADOR DE FUNÇÃO DO SNC.....	15
1.3. ARANHA <i>Parawixia bistriata</i>.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. COLETA E EXTRAÇÃO DAS GLÂNDULAS E RESERVATÓRIOS DE PEÇONHA.....	21
3.2. IMPLANTAÇÃO DE CÂNULA-GUIA INTRACEREBRO-VENTRICULAR.....	22
3.2.1. ANIMAIS.....	22
3.2.2. IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA-GUIA NO VENTRÍCULO LATERAL.....	22
3.2.3. ADMINISTRAÇÃO DA PEÇONHA I.C.V.....	24
3.3. METODOLOGIA NEUROETOLÓGICA.....	24
3.4. EXPERIMENTOS.....	29
3.4.1. ABORDAGEM CENTRAL.....	29
3.4.1.1. INJEÇÃO CENTRAL (i.c.v.) DE PPBL (DOSES 0,4 E 0,04 mg DE PEÇONHA/ANIMAL).....	29
3.4.1.1.1.DOSE 0,4 mg	29
3.4.1.1.2. DOSE 0,04 mg	30
3.4.2. ABORDAGEM PERIFÉRICA.....	30
3.4.2.1. INJEÇÃO PERIFÉRICA (i.v.) DE PPBL (DOSE 2,26 mg DE PEÇONHA/ANIMAL).....	30
3.4.3. ABORDAGEM ANTICONVULSIVANTE: PPBF E PTZ.....	31
3.4.3.1. INJEÇÃO i.c.v. DE PPBF 0,1 U: ANÁLISE NEUROETOLÓGICA.....	31
3.4.3.2. INJEÇÃO i.c.v. DE PPBF 0,1 U: EXPERIMENTO COM ROTA-ROD.....	31
3.4.3.3. INJEÇÃO i.p. DE PTZ (80 mg/kg).....	31

3.4.3.4. INJEÇÃO i.c.v. DE PPBF 0,1 U SEGUIDA DE PTZ i.p. (80 mg/kg).....	32
3.5. TESTE DE CONFIABILIDADE DAS OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. ABORDAGEM CENTRAL.....	34
4.1.1. CONTROLES i.c.v.....	34
4.1.2. INJEÇÃO CENTRAL (i.c.v.) DE PPBL (DOSES 0,4 E 0,04 mg DE PEÇONHA/ANIMAL).....	36
4.1.2.1.DOSE 0,4 mg	36
4.1.2.1.1. CRISES GRAVES.....	36
4.1.2.1.2. CRISES LEVES.....	42
4.1.1.2. DOSE 0,04 mg.....	47
4.2. ABORDAGEM PERIFÉRICA.....	48
4.2.1. INJEÇÃO PERIFÉRICA (i.v.) DE PPBL (DOSE 2,26 mg DE PEÇONHA/ANIMAL).....	48
4.3. ABORDAGEM ANTICONVULSIVANTE: PPBF E PTZ.....	50
4.3.1. INJEÇÃO i.c.v. DE PPBF 0,1 U: ANÁLISE NEUROETOLÓGICA.....	50
4.3.2. INJEÇÃO i.c.v. DE PPBF 0,1 U: EXPERIMENTO COM ROTA-ROD.....	51
4.3.3. INJEÇÃO i.p. DE PTZ (80 mg/kg).....	51
4.3.4. INJEÇÃO i.c.v. DE PPBF 0,1 U SEGUIDA DE PTZ i.p. (80 mg/kg).....	52
4.9. TESTE DE CONFIABILIDADE DAS OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	52
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES.....	61
7. RESUMO.....	63
8. SUMMARY.....	65
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
10. ANEXO.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 PEÇONHAS DE ARTRÓPODOS

Animais peçonhentos de diferentes filos desenvolveram poderosas peçonhas, arsenais químicos com substâncias capazes de atordoar, paralisar ou matar outros organismos (MCCORMIC & MEINWALD, 1993). A peçonha pode ter várias funções como ataque, captura, digestão do alimento, ou contribuir para a defesa do animal contra predadores ou agressores (RUSSELL, 1996). Na imensa variedade de animais peçonhentos e venenosos existentes na natureza, entre répteis, anfíbios, poríferos, cnidários, moluscos e peixes, os artrópodos estão envolvidos em um número muito maior de acidentes humanos do que todos os outros filos somados (RUSSELL, 1996). Muitos componentes das peçonhas funcionam como neurotoxinas, tendo notável especificidade e afinidade de ligação por receptores ou canais iônicos neuronais (USHERWOOD, 1994). Existem toxinas utilizadas para estudar as propriedades funcionais de diferentes subtipos de canais de cálcio em neurônios, como por exemplo as toxinas de moluscos predadores do gênero *Conus*, como a ω -conotoxina, que bloqueia seletivamente alguns tipos de canais de cálcio dependentes de voltagem; a μ -conotoxina, que bloqueia canais de sódio musculares, e discrimina entre canais de sódio neuronais e musculares; a δ -conotoxina, que aumenta a condutância de canais de sódio inibindo sua inativação, e a α -conotoxina, que possui alta afinidade por receptores nicotínicos; e a conantoquina, que interage com RNMDA (para revisão, vide UCHITEL, 1997). A clorotoxina é uma molécula ligante a canais de cloreto encontrada na peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus*, que bloqueia canais de cloreto de pequena condutância (DEBIN & STRICHARTZ, 1991; DEBIN *et al.*, 1993). A toxina DTX9.2 isolada da peçonha da aranha tecedora *Diguetia canities* bloqueia os canais de sódio dependentes de voltagem em insetos (BLOOMQUIST *et al.*, 1996). O estudo de um grande número de canais de potássio clonados recentemente e seus papéis fisiológicos tem sido grandemente auxiliados pela descoberta de bloqueadores específicos, como os peptídeos isolados da peçonha da aranha *Heteropoda venatoria* (SANGUINETTI *et al.*, 1997), e a kapa-conotoxina PVIIA, isolada da peçonha do molusco *Conus purpurascens* (SAVARIN *et al.*, 1998). Consequentemente, estes compostos estão sendo usados como ferramentas úteis para pesquisa neuroquímica, pois o bloqueio seletivo permite não só a descoberta de subtipos de receptores ou canais iônicos, como o estudo do papel fisiológico desses subtipos (UCHITEL, 1997), e posterior aplicação destes como potenciais fármacos neuroprotetores na clínica de seres humanos (MILJANICH, 1997).

Há ainda outra razão para o estudo de neurotoxinas. As aranhas são animais carnívoros, que muitas vezes só conseguem capturar insetos através da paralisia induzida pela inoculação da peçonha. Um dos locais de ação da peçonha para obter a paralisia do inseto é sem dúvida a junção neuromuscular (USHERWOOD & BLAGBROUGH, 1991), que no caso dos insetos é glutamatérgica (USHERWOOD, 1994). Desta forma, a evolução selecionou componentes antagonistas de receptores glutamatérgicos de insetos, que mostraram também possuir ação em receptores glutamatérgicos de mamíferos (USHERWOOD & BLAGBROUGH, 1991; USHERWOOD, 1994).

No SNC de mamíferos, o glutamato (principal neurotransmissor excitatório), atua em receptores que podem ser divididos em duas famílias: a primeira está associada a canais iônicos (ionotrópicos), subdivididos e denominados segundo seus respectivos agonistas em receptores RNMDA, RAMPa e RCANATO (MONAGHAN *et al.*, 1989; WATKINS *et al.*, 1990; HOLLMAN & HEINEMANN, 1994). A segunda família está associada a proteínas G (receptores metabotrópicos) (MONAGHAN *et al.*, 1989; WATKINS *et al.*, 1990; HOLLMAN & HEINEMANN, 1994).

Muitas patologias do SNC de mamíferos tem por etiologia distúrbios no funcionamento de receptores e canais iônicos neuronais ou gliais, como a hiperativação de receptores glutamatérgicos, que está relacionada com a morte celular na isquemia cerebral (CHOI, 1988a; CHOI, 1988b; ALBERS *et al.*, 1989; CHOI, 1990; CHOI & ROTHMAN, 1990; SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991), doença de Alzheimer, coreia de Huntington (GREENAMYRE, 1986; YOUNG *et al.*, 1988; CHOI, 1990; MELDRUM & GARTHWAITE, 1990), e epilepsia (SCHWARTZKROIN & WYLER, 1980; PRINCE & CONNORS, 1986; DINGLELINE *et al.*, 1990).

O bloqueio dos receptores de aminoácidos excitatórios por componentes da peçonha de artrópodos tem motivado muitos pesquisadores a investigar estas substâncias como potenciais drogas neuroprotetoras (USHERWOOD & BLAGBROUGH, 1991; MCCORMIC & MEINWALD, 1993; SCOTT *et al.*, 1993). A procura por novas drogas anticonvulsivantes justifica-se, dado que uma a cada três crises são resistentes aos medicamentos disponíveis atualmente aos pacientes epiléticos (LÖSCHER, 1988).

Neste contexto, as peçonhas de aranhas e vespas solitárias estão recebendo considerável atenção. As primeiras neurotoxinas identificadas na peçonha de aranhas durante a década de cinquenta foram as proteínas de alto peso molecular e peptídeos e, nas décadas de sessenta e setenta,

neurotransmissores já bem conhecidos como serotonina, GABA e glutamato (DUFFIELD *et al.*, 1979; MACCORMIC & MEINWALD, 1993).

Até aquele momento, havia um consenso na literatura de que a maioria das neurotoxinas presentes nas peçonhas de aranhas seriam moléculas de alto peso molecular (USHERWOOD & BLAGBROUGH, 1991). Já nos anos 80, porém começam a surgir dados na literatura a respeito da existência de componentes de baixo peso molecular (menor que 1 KDa), altamente polares, contendo um grupo terminal acil aromático (compostos do tipo R-CO, onde R é um grupo orgânico) e um esqueleto ou cadeia policatiônica carbônico-poli-amínica. Estes compostos receberam o nome de APs (figuras 1 e 2A, B e C), poliaminas amidas ou arilalquilpoliaminas (MCCORMIC & MEINWALD, 1993; USHERWOOD & BLAGBROUGH, 1991; MOE, *et al.*, 1998). Algumas APs receberam denominação devido ao seu peso molecular, como a Arg-636, isolada da peçonha das aranhas com teias orbitais do gênero *Argiope* (*A. trifasciata* e *A. lobata*) (BATEMAN *et al.*, 1985; GRISHIN *et al.*, 1986; GRISHIN *et al.*, 1989), enquanto outras foram denominadas segundo o número de átomos de carbono entre os átomos de nitrogênio, como a PhTX-433 (USHERWOOD & BLAGBROUGH, 1991).

Fig. 1. Estrutura básica das acilpoliaminas descritas em peçonhas de aranhas e vespas solitárias. Extraído de USHERWOOD & BLAGBROUGH (1991).

Primeiramente descritas por KAWAI e colaboradores (1982), as APs são potentes antagonistas não-competitivos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos no SNC de mamíferos, bloqueando os póros dos canais iônicos dos RNMDA (figura 2C), RAMPA e RCANATO (BRACKLEY *et al.*, 1993; WASHBURN & DINGLEDINE, 1996; MOE *et al.* 1998). A vespa solitária *Phlanthus triangulum*, um himenóptero que necessita manter sua presa viva, mas paralisada por um longo período para que suas larvas tenham uma rica e inescapável fonte de proteína (USHERWOOD & BLAGBROUGH, 1991), possui também APs, denominadas PhTX (PIEK, 1982). A PhTX-343, à semelhança das APs das peçonhas de aranhas, também possui atividade antagonista dos receptores glutamatérgicos do SNC de mamíferos (RAGSDALE *et al.*, 1989; ELDEFRAWI *et al.*, 1988; GREEN *et al.*, 1996).

FIGURA 2– Modelos estruturais da acilpoliamina Arg-636. (A) (B) Duas estruturas representativas da Arg-636. (C) Ilustração esquemática do bloqueio do canal do receptor glutamatérgico NMDA. Extraído de RADITSCH e colaboradores (1996).

Demonstrou-se efeito neuroprotetor das poliaminas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A exposição de neurônios a agonistas glutamatérgicos (como o glutamato, N-metil-D-aspartato ou ácido caínico) causa um aumento na $[Ca^{2+}]_i$ (CHOI, 1988a), evento ao qual atribui-se papel decisivo na cascata de alterações que levam à morte celular, chamada excitotoxicidade (CHOI, 1988b). Em culturas de células granulares do cerebelo de rato, a Arg-636 e a PhTX-343 inibiram o aumento na concentração de cálcio intracelular causado pela adição do NMDA (GREEN *et al.*, 1996). Estes autores também verificaram que a Arg-636 e a PhTX-343 foram neuroprotetoras no mesmo tipo de cultura celular, inibindo a liberação da enzima lactato-desidrogenase estimulada pelo NMDA, glutamato e ácido caínico (GREEN *et al.*, 1996). A presença desta enzima no meio é indicadora de morte neuronal (KOH & CHOI, 1987). HIMI & SAITO (1990) verificaram que a AP JSTX e seu análogo sintético, o 1-Na-spm, também diminuíram a liberação da lactato desidrogenase em cultura de neurônios expostos ao excesso de glutamato e seus análogos (ácido caínico, quisqualato e NMDA).

Já *in vivo*, há vários relatos de que as APs possuem efeitos anticonvulsivos quando injetadas em roedores. JACKSON & PARKS (1987, 1990), relatam que uma AP isolada da peçonha da aranha *Agelenopsis aperta*, denominada AG2 -que possui a capacidade de bloquear correntes de cálcio em estudos eletrofisiológicos- suprimiu, após inoculação i.v., os comportamentos de crise induzidos pela injeção de ácido caínico (12 mg/kg; i.v.), picrotoxina (3,6 mg/kg; i.v.) e bicuculina (0,5 mg/kg; i.v.). A injeção s.c. (10 mg/kg) e i.p. (32 mg/kg) de Arg-636¹ produziu proteção total contra as crises induzidas por intensa estimulação sonora (crises audiogênicas) em camundongos DBA/2 (SEYMOUR & MENA, 1989). Na dose de 32 mg/kg (i.p.), a Arg-636 produziu significativo antagonismo das crises convulsivas induzidas pela injeção de NMDA (56 mg/kg; i.p.) (SEYMOUR & MENA, 1989).

¹ Comercializada pela NPS, Inc.

A estimulação elétrica inicialmente não-convulsivante (chamada sublimiar) através de eletrodos profundos implantados em diversas áreas límbicas como a amígdala e hipocampo, é capaz de produzir um quadro denominado de abrasamento (“*kindling*”), onde o animal, após alguns dias de estimulação, passa a apresentar um quadro comportamental e eletroencefalográfico caracterizado como crises límbicas (GODDARD, 1967; RACINE, 1972; PINEL & ROVNER, 1978). O estímulo inicial geralmente não desencadeia nenhuma resposta comportamental ou eletroencefalográfica (EEG). No entanto, estímulos subsequentes iniciam uma crise elétrica focal (pós-descarga) sem nenhuma crise comportamental. Uma das escalas da intensidade do abrasamento do animal, baseada no tipo de crise comportamental, foi proposta por RACINE (1972), e posteriormente adaptada por PINEL & ROVNER (1978). Esta última escala varia de 0 a 8, onde na marca 8 o animal apresenta o quadro mais grave de crise (PINEL & ROVNER, 1978). O 1-naftilacetil espermina (1-Na-spm), injetado no ventrículo lateral de ratos Wistar já abrasados (eletrodos implantados na amígdala), previne as crises induzidas pela estimulação elétrica da amígdala e diminui a duração da pós-descarga (TAKAZAWA *et al.*, 1996). Esse efeito foi duradouro, desaparecendo apenas 4 dias após a injeção do 1-Na-spm (TAKAZAWA *et al.*, 1996).

Na literatura, existem relatos onde a injeção central de peçonhas desencadeia comportamentos semelhantes às crises convulsivas límbicas descritas por RACINE (1972). Um peptídeo isolado da peçonha da serpente *Dendroaspis angusticeps*, denominado α -dendrodotoxina (α -DTX), quando injetado i.c.v. em ratos, causa o surgimento deste tipo de crise convulsiva (VELLUTI, *et al.*, 1987). Com a metodologia de registros elétricos, observou-se que o α -DTX possui afinidade pelo sistema límbico (VELLUTI, *et al.*, 1987). Mais tarde, descobriu-se ser o α -DTX um bloqueador de canal de potássio voltagem dependente (WU *et al.*, 1989) com capacidade de estimular a liberação de neurotransmissores (DORANDEU *et al.*, 1997), que é utilizado desde então na neurofarmacologia deste tipo de canal iônico.

Muito interessante também é o quadro comportamental observado após a injeção intrahipocampal da peçonha bruta do escorpião *Tityus serrulatus* (5 μ g; SANDOVAL & DORCE, 1993), inicialmente caracterizado por ranger de dentes, mioclonias, tremores, ataxia, automatismos orofaciais e sacudidelas de corpo (WDS), evoluindo-se, em 15 a 20 minutos, para crises tônico-clônicas e morte. Este quadro comportamental (que contém componentes límbicos) praticamente repetiu-se (com exceção das crises tônico-clônicas) após injeção intrahipocampal da neurotoxina TS-8F, isolado da peçonha do mesmo escorpião (CARVALHO *et al.*, 1998).

As peçonhas de artrópodos geralmente contêm vários componentes, com diferentes mecanismos de ação. Apesar disto, estes componentes agem em sinergismo, possibilitando a captura da presa. Como exemplo, temos a grande capacidade paralizante de insetos da peçonha da aranha *Agelenopsis aperta*, que sabe-se hoje dever-se a pelo menos quatro compostos: duas APs (FTX e α -agatoxina), e dois peptídeos (ω -agatoxina e μ -agatoxina) (UCHITEL, 1997). Os mecanismos de ação destes compostos são: bloqueio do canal iônico dos receptores glutamatérgicos (α -agatoxina); antagonismo seletivo de canais de cálcio ativados por voltagem (FTX e ω -agatoxina) e ativação de canais de sódio neuronais (μ -agatoxina). Esta variedade de toxinas, direcionadas a diferentes alvos parece ser a estratégia para uma paralisia mais eficiente de insetos, pois a μ -agatoxina, aumentando a liberação de glutamato pela ativação de canais de sódio pré-sinápticos, agirá em conjunto com a α -agatoxina, bloqueando o canal do receptor glutamatérgico. Estas duas toxinas causam uma paralisia rápida, mas reversível. Talvez visando impedir que o inseto recupere-se desta paralisia inicial e escape, a peçonha da aranha, através dos componentes FTX e ω -agatoxina, bloqueiam os canais de cálcio pré e pós-sinápticos, garantindo assim um efeito de paralisia duradouro (UCHITEL, 1997).

1.2 COMPORTAMENTO COMO INDICADOR DE FUNÇÃO DO SNC

Uma corrente filosófica básica da neurociência consiste em considerar todo o comportamento como consequência da função do SNC (KANDEL, 1985). Alterações comportamentais em animais causadas pela exposição a uma substância neurotóxica (como peçonhas animais, por exemplo) podem ser sensíveis indicadores de distúrbio de função no sistema nervoso (EISENBRANDT *et. al*, 1994). A etofarmacologia (que pode ser definida como o estudo dos efeitos de drogas no SNC através da análise comportamental; KRSLAK, 1991), não objetiva apenas descrever detalhadamente o comportamento do animal após a injeção de certa droga, mas sim assume que os mecanismos do SNC geradores do padrão comportamental são alvos em potencial da ação de drogas (KRSLAK, 1991).

A literatura tem mostrado que as peçonhas de artrópodos, quando injetadas em roedores, causam alterações comportamentais que podem ser, entre outras, pró-concussivantes ou anticonvulsivantes, dependendo da molécula extraída da peçonha. Assim, enquanto a neurotoxina TS-8F, isolada da peçonha do escorpião

Tytius serrulatus injetado no hipocampo dorsal de ratos induz crises límbicas (CARVALHO *et al.*, 1998), a acilpoliamina AG2 (isolada da aranha *Agelenopsis aperta*), aplicada i.v. ou i.c.v. produz supressão dose-dependente das convulsões induzidas por ácido caínico, picrotoxina e bicuculina (JAKSON & PARKS, 1990). Dessa forma, o estudo comportamental é de grande valia na determinação dos efeitos biológicos de peçonhas animais, tanto para o isolamento de compostos pró-convulsivantes quanto para os anticonvulsivantes, buscando-se novas ferramentas farmacológicas.

A metodologia neuroetológica de observação e quantificação comportamental descrita por GARCIA-CAIRASCO & SABBATINI (1983), foi utilizada para a avaliação da expressão de alterações comportamentais epileptogênicas em modelos de estimulação sensorial (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1992), elétrica (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1993) e química (TERRA & GARCIA-CAIRASCO, 1992; TERRA & GARCIA-CAIRASCO, 1994; FURTADO, 1996).

Essa metodologia permite a descrição etofarmacológica da injeção central de peçonhas de artrópodos no SNC de roedores. RIBEIRO (1996), utilizando a mesma metodologia, identificou crises comportamentais com giros e saltos, semelhante a crises convulsivas do mesencéfalo acústico, em ratos Wistar após a injeção i.c.v. da peçonha bruta da aranha *Scaptocosa raptoria*. CASTRO (1998), também utilizando a mesma análise neuroetológica, verificou que a injeção i.c.v. (em ratos) da peçonha bruta da aranha *Phoneutria nigriventer*, causa quedas e comprometimento motor do animal, conseguindo discriminar com esta metodologia efeitos centrais dos periféricos.

Apesar das alterações comportamentais terem se mostrado importantes no estudo do comprometimento cerebral em modelos de epilepsia experimental, e apesar das peçonhas de artrópodos conterem substâncias biologicamente ativas, não existem estudos sobre os efeitos comportamentais após a injeção central e periférica da peçonha da aranha *Parawixia bistrata* em roedores.

1.3 A ARANHA *Parawixia bistrata*

Parawixia bistrata (figura 3), encontrada na América Central, Amazônia, Nordeste e Sudeste do Brasil (LEVI, 1993), é uma aranha colonial de teias orbitais. Seu comportamento alterna-se ritmicamente em quiescência diurna (onde os indivíduos agrupam-se no ninho, que geralmente contém um número muito grande de indivíduos), e atividade caçadora noturna, onde cada aranha constrói

uma teia individual (que é reabsorvida pela manhã), formando uma gigantesca teia caçadora (GOBBI *et al.*, 1979). Esta aranha possui um sistema de cooperação na caça, pois as vibrações de uma presa (insetos, como a broca do café) de massa maior que a própria aranha em uma teia individual, atraem aranhas de teias vizinhas, que ajudam na imobilização, e dividem a presa sem hostilidade (GOBBI *et al.*, 1979; FOWLER, 1993).

Fig 3- *Parawixia bistriata* fêmea

Ensaios com a peçonha da *P. bistriata* em uma metodologia desenvolvida em nosso laboratório (em colaboração com o grupo do Dr. Coutinho, FMRP) demonstraram potente ação paralisante em térmitas, quando injetada via retal (FONTANA, 1997).

FONTANA (1997) observou que a peçonha bruta fervida de *P. bistriata* inibiu a recaptação de GABA e estimulou a recaptação de glutamato dependente de Na^+ em sinaptosomas do córtex cerebral de ratos, onde esta mesma peçonha deslocou o glutamato radioativo de seus sítios específicos em membranas sinaptosomais. Aumentar a disponibilidade de GABA e diminuir a de glutamato na fenda sináptica, como foi visto com os efeitos desta peçonha, pode significar uma ação potencialmente anticonvulsivante *in vitro*. NIELSEN e colaboradores (1991), observaram que a tiagabina (i.p.), que é um composto inibidor de recaptação de GABA, teve efetivo anticonvulsivante em vários modelos experimentais de indução de crises convulsivas, entre estes o teste audiogênico em camundongos DBA/2, e a injeção i.p. de PTZ (120 mg/kg) e bicuculina (4 mg/kg).

Resultados neuroquímicos com a peçonha bruta fervida de *P. bistriata* demonstram, então, efeitos potencialmente anticonvulsivantes *in vitro* (FONTANA, 1997). No entanto, não há estudos *in vivo* a respeito destes efeitos.

2.OBJETIVOS

Dado que as alterações comportamentais em roedores podem fornecer indícios do mecanismo de ação de drogas no SNC de mamíferos; que a peçonha de *P. bistrata* apresenta potencial efeito anticonvulsivante *in vitro* (FONTANA, 1997); e que componentes não-proteicos isolados das peçonhas de aranhas (APs) têm mostrado efeitos anticonvulsivantes em diversos modelos de indução de convulsões em roedores, os objetivos deste trabalho são:

- Estudar os efeitos comportamentais da injeção i.c.v. e i.v. da peçonha bruta de *Parawixia bistrata* em ratos Wistar, através da adaptação de uma metodologia neuroetológica (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1992).
- Verificar se a peçonha bruta fervida de *P. bistrata* possui efeito anticonvulsivante em um modelo químico de indução de crises clônicas e tônicas agudas em ratos Wistar (PTZ).

Estes conhecimentos representam base para futuros experimentos onde, através de fracionamento bioquímico da peçonha, haverá a tentativa de isolamento e determinação da estrutura de toxinas biologicamente ativas.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. COLETA E EXTRAÇÃO DAS GLÂNDULAS E RESERVATÓRIOS DE PEÇONHA.

Os espécimens foram coletados sempre nos mês de janeiro na região de Serrana, Cajuru e Tambaú, estado de São Paulo, em veículo cedido pela FFCLRP-USP. Recolheram-se os ninhos de *P. bistrata* com o auxílio de pulsares. Apesar desta espécie não constar da lista de animais em extinção do Estado de São Paulo (informação obtida junto ao IBAMA- SP), adquirimos a postura de nunca coletar todos os animais de um ninho. Em alguns locais (como Serrana), coletamos apenas de um lado da estrada, para permitir a continuidade daquela comunidade.

Após a coleta, as aranhas (acondicionadas em sacos plásticos), são sacrificadas por congelamento em freezer -20°C. A retirada das glândulas e reservatórios de peçonha é feita com pinça fina, após a secção da porção superior e rostral do cefalotórax. Macera-se o material manualmente (com pistilho de vidro sob ambiente de gelo) em água deionizada, e centrifuga-se² (8000xg; 12 min; 4°C). Retira-se e liofiliza-se³ o sobrenadante, por 24h. A peçonha liofilizada, padronizada em nossos experimentos como PPBL, é então diluída em volume conhecido de salina, a partir de seu peso sêco, em quatro soluções estoque: solução A (133 mg/ml); solução B (13,3 mg/ml) e solução C (22,6 mg/ml), que foram aliquotadas e congeladas a -20°C até o dia do experimento. As soluções A e B foram utilizadas em experimentos i.c.v., com volume 3µl, o que resulta nas doses 0,4 e 0,04 mg de peçonha bruta por animal, respectivamente. A solução C foi utilizada nos experimentos i.v., no volume 0,1 ml, resultando na dose 2,26 mg de peçonha por animal. Desta forma, denominaremos o tipo de solução de peçonha utilizada nos experimentos simplesmente como dose 0,4; dose 0,04 e dose 2,26 mg de peçonha por animal⁴.

Padronizou-se como PPBF o resultado do preparo de peçonha diluindo-a na proporção de 0,1 U⁵, centrifugando-se⁶ (3000xg; 4 min; 4°C) e fervendo-se (98°C, 10 min) (FONTANA, 1997). Após a fervura, centrifuga-se novamente (9000xg; 4 min na mesma centrífuga *Eppendorf*) e utilizava-se o sobrenadante. Preparou-se a PPBF em cada dia de experimento.

² Centrífuga *DuPont - Sorwal 5B* utilizada no laboratório do Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto, Depto. Bioquímica, FMRP-USP

³ Liofilizador *Virtis - Freezemobile 8 ES*; lab. Prof. Dr. José Roberto Giglio, Dep. Bioquímica, FMRP-USP

⁴ Mais uma dose (4 mg) de PPBL foi utilizada em um único animal. Vide resultados.

⁵ U: peçonha de uma glândula e reservatório macerados e diluídos em 1 µl

⁶ Centrífuga *Eppendorf*, laboratório do Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto.

Para comparação, efetuou-se a dosagem da concentração de proteínas (em mg/ml) nas soluções obtidas com a peçonha bruta seca, pelo método de LOWRY e colaboradores (1951), modificado por HARTREE (1972), utilizando-se como padrão solução de albumina sérica. A PPBL solução C apresenta $\cong 8$ mg/ml de proteínas, enquanto que a PPBF 0,1 U contém $\cong 14,2$ mg/ml de proteínas (dosagem executada antes da fervura).

Não descarta-se a possibilidade de o material denominado como peçonha, conter também debris celulares e membranas biológicas, provenientes da glândula e reservatório de peçonha.

3.2. IMPLANTAÇÃO DE CÂNULA-GUIA INTRACEREBROVENTRICULAR

3.2.1. ANIMAIS

Utilizaram-se ratos Wistar machos, pesando entre 200 e 250g, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto. Mantem-se os animais no biotério de manutenção do Departamento de Biologia, sob ventilação e temperatura controladas (25 ± 1 °C) e ciclo claro/escuro (período de 12 h, luz entre 7:00 e 19:00 h). Água e comida *ad libitum*.

3.2.2. IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA-GUIA NO VENTRÍCULO LATERAL

Anestesia-se o rato com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.). Após a raspagem dos pêlos, imobiliza-se a cabeça do animal em um aparelho estereotáxico. Após injeção de xilocaína (2%) e exposição cirúrgica do crânio do animal, executa-se a perfuração da calota craniana em um ponto, situado 1,6 mm lateralmente à sutura sagital, e 1,0 mm posteriormente à sutura coronária (coordenadas do ventrículo lateral direito, segundo o atlas de PAXINOS & WATSON (1986) a fim de permitir a introdução da cânula intraventricular.

Confecciona-se a cânula a partir de um segmento de agulha hipodérmica com 10 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro. Introduce-se a cânula com o auxílio do aparelho estereotáxico através da perfuração já efetuada, a uma profundidade onde a cânula atinja o ventrículo lateral (entre 3,2 e 3,7 mm), que é

verificada através da observação de uma pequena variação no nível de salina em um manômetro modificado (pipeta graduada de 0,1 ml mantida na vertical e conectada à cânula por um tubo de polietileno). Esta pequena variação de nível se dá pelo escoamento da salina através do ventrículo do animal, e permite-nos supor termos encontrado o lugar correto. No entanto, após cada experimento, verifica-se o posicionamento da cânula através de análise histológica (coloração hematoxilina/eosina ou cresil violeta, figura 4) com retirada dos cérebros após perfusão intracardíaca dos animais (15 min salina, 30 min paraformaldeído). Utilizou-se também a injeção de 3 µl de azul de toluidina. Este corante, injetado no ventrículo lateral com o mesmo aparato e na mesma velocidade utilizadas na injeção da peçonha, após a perfusão transcardíaca dos ratos, possibilita visualizar se a cânula estava corretamente posicionada.

Fixa-se a cânula ao crânio utilizando-se um polímero odontológico e um pequeno parafuso de aço inox. Insere-se então um mandril (fio metálico) na cânula, a fim de impedir sua obstrução até o momento do experimento.

Após a cirurgia, aplica-se antibiótico intraperitoneal, e permite-se 5 dias de recuperação ao animal, antes do experimento.

Fig 4- Corte transversal em cérebro de rato Wistar, altura dos ventrículos laterais, mostrando localização da cânula guia. Notar a presença da peçonha no ventrículo lateral direito. Corte de espessura 7 µm, coloração cresil violeta, técnica histológica convencional (imersão em parafina). O animal foi perfundido com salina e paraformaldeído 24 h após a injeção. Esta cristalização da peçonha foi vista apenas neste animal. VLD- ventrículo lateral direito. VLE- ventrículo lateral esquerdo.

3.2.3. ADMINISTRAÇÃO DA PEÇONHA I.C.V.

Executa-se a administração i.c.v. através de um sistema de injeção manual, utilizando-se seringa Hamilton (10 µl) conectada a um tubo de polietileno (PE-10), à uma cânula de injeção de 10 mm, confeccionada a partir de agulha odontológica (G-30).

Utilizou-se 3 µl de volume de injeção em 2 minutos, com observação de movimento do menisco como confirmação de injeção do líquido. Os animais recebem salina 0,9% estéril, sendo então filmados (controles) e, após 24 h, recebem o mesmo volume de peçonha, em velocidade idêntica. A filmagem é realizada através de câmera LG acoplada a um controlador de movimento (*Pan-tiler GAC-PT1- LG*), com direção e foco regulados pelo experimentador em sala anexa. Registra-se a filmagem através de video-cassete (*PANASONIC NV-HD635* - 6 cabeças de gravação).

3.3. METODOLOGIA NEUROETOLÓGICA

Após a administração da peçonha, filma-se o animal sempre no mesmo período (das 7:00 às 10:00 h) no interior de uma arena circular de acrílico (altura 30 cm, diâmetro 60 cm), colocada em uma sala de experimentação isolada e refrigerada com aparelho de ar condicionado. Ilumina-se a arena através de lâmpada incandescente (60 W) situada aproximadamente a 1,5 m acima da arena. Padronizou-se que o tempo transcorrido após a injeção teria contagem iniciada assim que as quatro patas do animal tocassem o solo no interior da arena (tempo= zero). Classifica-se, nos períodos de análise, todos os comportamentos do animal (segundo a segundo) segundo o código contido na tabela 1, referente ao dicionário de comportamentos modificado de FURTADO (1996) e GARCIA-CAIRASCO e colaboradores (1996). Maiores detalhes sobre os itens comportamentais mais freqüentemente observados em nossos experimentos encontram-se no anexo.

Com a observação dos animais nos intervalos que julgam-se convenientes, obtém-se uma relação comportamento-tempo, exemplificada na tabela 2.

Tabela 1. Dicionário de comportamentos observados em nossos animais experimentais após a injeção de salina ou peçonha Adaptado de FURTADO (1996) e GARCIA -CAIRASCO e colaboradores (1996).

CÓDIGO	DESCRIÇÃO	CÓDIGO	DESCRIÇÃO
ALD	Auto-limpeza lateral direita	LG	Limpar garras frontal
ALE	Auto-limpeza lateral esquerda	LG2D	Limpar garras da pata posterior esquerda
ALG	Auto-limpeza dos genitais	MIO1	Mioclonias das patas anteriores
BC	Bocejar	MIO2	Mioclonias das patas posteriores
BL	Alargamento de base	MIOG	Mioclonias generalizadas
CBC	Cabeceio	MIOO	Mioclonias de orelhas
CCD	Coçar lado direito do corpo	MIOT	Mioclonias do tronco
CCE	Coçar lado esquerdo do corpo	MOV	Movimento de vibrissas
CHP	Cheirar exploratório	MT	Mastigar
CM	Caminhar	PIV	Pivoteio
DEI	Deitar	PR	Parado
DEID	Deitar à direita	QUED	Queda após elevação (classe 5 límbica)
DEIE	Deitar à esquerda	QTE	Queda atônica à esquerda
ELE	Elevação (classe 4 límbica)	WDS	Sacudidelas de corpo inteiro (Wet Dog Shakes)
HP2E	Hiperextensão da pata posterior esquerda	SAC1	Sacudidela de cabeça
ER	Postura ereta	SQ	Esquadrinhar
LCB	Lavar cabeça	TQ	Taquipnéia
LVF	Lavar fucinho	TR	Tremor.

Tabela 2. Exemplo de relação comportamento-tempo, em 8 hipotéticos segundos de análise. Fornece-se uma relação semelhante a esta ao programa ETHOMATIC, que verifica a frequência e duração média de cada comportamento, bem como quais relações sequenciais são estatisticamente significantes, calculando o log do χ^2 entre elas.

INTERVALO	DE	CÓDIGO	INTERVALO	DE	CÓDIGO
TEMPO (s)			TEMPO (s)		
0-1		CHP	4-5		CM
1-2		CHP	5-6		CM
2-3		CHP	6-7		SQ
3-4		ER	7-8		TR

O ítem tremor (TR) recebeu esta denominação devido á falta de outro termo mais específico. Ao descrever este comportamento, estamos relatando movimentos laterais rápidos de pequena amplitude, observados no corpo todo do animal. Este ítem não deve ser confundido com os tremores conseqüentes à disfunção do sistema extrapiramidal, geralmente acometendo extremidade dos membros (STANDAERT & YOUNG, 1996).

Pivoteio (PIV) representa o ato do animal realizar movimentos laterais apenas com a cabeça. No anexo 1, encontram-se descrições mais detalhadas sobre os ítems comportamentais da tabela 1. Cabeceio (CBC) foi definido como o ato do animal estender o pescoço levantando e abaixando a cabeça rapidamente, sem os movimentos latero-laterais que caracterizam o esquadrinhar (SQ).

Quantifica-se a relação comportamento-tempo através do programa ETHOMATIC (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1992), que calcula a freqüência e a duração média de cada comportamento. O programa analisa também as seqüências de díades comportamentais (grupos de dois comportamentos), calculando o número de vezes que determinado comportamento antecedeu-se ou sucedeu-se a outro (por exemplo, quantas vezes caminhar antecedeu cheirar exploratório, ou então, esquadrinhar antecedeu caminhar). Às díades, o programa atribui um peso estatístico (χ^2), baseado no número de ocorrências em relação ao valor esperado. Pode-se calcular os parâmetros descritos utilizando-se os comportamentos de vários animais, onde o programa soma as freqüências, durações e calcula as associações estatísticas. Graficamente, os cálculos do ETHOMATIC possibilitam a construção de um etograma, onde os códigos comportamentais são associados a retângulos de altura e comprimento proporcionais à freqüência e duração do comportamento, respectivamente. Os comportamentos são ligados entre si por setas cuja orientação e espessura indicam a seqüência e significância estatística, respectivamente. As cores dos retângulos associados aos códigos comportamentais, bem como a cor das setas nos fluxogramas, foram adaptadas de FURTADO (1996), e indicam o tipo de comportamento observado. Os retângulos associados aos comportamentos tidos como “normais”, isto é, observados nos animais controle, estão representados em azul. Se os comportamentos observados assemelham-se às convulsões límbicas (seguindo a classificação de PNEL & ROVNER, 1978), representa-se os retângulos na cor verde. Caso observe-se comportamentos tidos como convulsivos não-límbicos, representa-se os retângulos na cor vermelha.

Importante salientar que a metodologia neuroetológica em questão foi desenvolvida para o estudo de crises convulsivas observadas em modelos experimentais de epilepsias, não havendo estudos sobre os efeitos comportamentais da injeção central da peçonha bruta da aranha *P. bistriata* em roedores. No entanto, experimentos piloto realizados em nosso laboratório indicaram que a injeção central desta peçonha originava alterações comportamentais muito semelhantes aos modelos límbicos de epilepsia experimental, como a injeção de pilocarpina (TURSKI *et al*, 1984; FURTADO, 1996) ou o abrasamento da amígdala (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1993). Desta forma, por analogia, decidiu-se adotar a metodologia neuroetológica como ferramenta para o estudo das alterações comportamentais consequentes à administração central e periférica de *P. bistriata* em ratos.

Na figura 5 observa-se o fluxograma de calibração, que exemplifica os códigos gráficos utilizados em nossos experimentos. Na tabela 3 exemplifica-se a matriz de cálculos do valor de χ^2 para as díades comportamentais, segundo a fórmula:

$$\chi^2 = \frac{[(AB)(CD)-N/2]^2 N^*}{(A+B) (C+D) (A+C) (B+D)}$$

ESTRUTURA E CALIBRAÇÃO DOS FLUXOGRAMAS

CÓDIGO DE CORES UTILIZADO NOS FLUXOGRAMAS

- comportamentos experimentais (não límbicos e não vistos nos controles)
- comportamentos límbicos
- outros comportamentos

Fig 5. Padrão de calibração dos etogramas usados para representar seqüências comportamentais, adaptado de GARCIA-CAIRASCO *et al.*, (1992) e FURTADO (1996). A altura dos retângulos é proporcional à freqüência, e a base é proporcional a duração observada do comportamento. A espessura das setas representa valores estatisticamente (χ^2), que medem os graus de associação entre pares de comportamento (díades) numa dada seqüência. A cor azul (das setas e retângulos) representa os comportamentos observados nos animais controle. Verde: comportamentos límbicos. Vermelho: comportamentos experimentais, porém não-límbicos.

Tabela 3. Exemplo do cálculo da significância (χ^2), entre as díades comportamentais. (extraído de WAKAMATSU *et al.*, 1994).

		Item subsequente	Outros itens	Margem
		SN	não-SN	
Item precedente	CM	118 (A)	14 (B)	132
Outros itens	Não-CM	27 (C)	45 (D)	72
Margem da coluna		145	59	204 *

Adotaram-se dois métodos de amostragem comportamental para a análise neuroetológica: janelas arbitrárias (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1992) e gatilho comportamental (FURTADO, 1996). No primeiro método, intervalos temporais de observação são pré-fixados, e somente os comportamentos contidos nestes intervalos recebem análise. Já no gatilho comportamental, analisa-se os comportamentos apenas após o animal emitir um sinal pré-estabelecido, como uma mioclonia, por exemplo. Neste caso, a mioclonia corresponderia ao comportamento “gatilho”.

Este último tipo de análise (gatilho comportamental) mostrou-se mais eficaz na descrição neuroetológica das crises convulsivas induzidas por pilocarpina em ratos (FURTADO, 1996) porque, embora os animais apresentem os mesmos comportamentos após certo tratamento ou estímulo, às vezes a latência entre estes comportamentos varia, prejudicando assim a análise baseada apenas em tempos pré-fixados.

No presente trabalho, utilizou-se dois tipos de análise: janelas arbitrárias e uma forma mista de janelas arbitrárias com gatilho comportamental. Para janelas arbitrárias, foram escolhidos três intervalos de tempos constantes (0-1 min; 15-16 min e 58-59 min após a injeção) nos quais realizou-se 1 minuto de análise comportamental. Já segundo o gatilho comportamental misto, esperou-se que o animal apresentasse os comportamentos definidos como gatilhos (vide resultados) e, a partir deste ponto, executaram-se seis observações de 30 s de duração,

realizadas a cada cinco minutos. Quando não observou-se, nos animais injetados com algum tratamento, nem gatilho ou qualquer alteração comportamental visível em relação aos animais controle, padronizou-se que a metodologia de análise seria a de janelas arbitrárias, com tempo de observação fixado no intervalo de 15 a 16 min após a injeção.

Os resultados das observações, foram representados graficamente em fluxogramas. Tanto para as janelas arbitrárias quanto o gatilho comportamental misto, construiu-se um fluxograma para cada intervalo de análise. Neste último tipo de análise, construiu-se um fluxograma chamado de “resultante” ou “somatório”. Este fluxograma corresponde aos resultados da análise do programa ETHOMATIC sobre os comportamentos de todos os intervalos temporais, visando fornecer um padrão geral do quadro observado. Importante ressaltar que, no fluxograma somatório, algumas associações de seqüências comportamentais estatisticamente significantes nos intervalos de análise individuais foram recalculadas pelo programa, podendo apresentar-se diferente no fluxograma somatório.

3.4. EXPERIMENTOS

3.4.1. ABORDAGEM CENTRAL

3.4.1.1. INJEÇÃO CENTRAL (i.c.v.) DE PPBL (DOSES 0,4 E 0,04 mg DE PEÇONHA/ANIMAL)

3.4.1.1.1 DOSE (0,4mg)

Ratos (n=22) com cânula implantada no ventrículo lateral, receberam i.c.v. 3µl de salina e, após 24 h, o mesmo volume da solução A de PPBL (dose total de 0,4 mg de PPBL por animal). Filmou-se por 1 h e 30 min. Utilizou-se janelas arbitrárias (intervalos 0-1; 15-16 e 58-59 min após a injeção) para os controles e experimentais, e gatilho comportamental para os experimentais. Embora todos os 22 animais tenham recebido salina 24 h antes da peçonha, utilizou-se o comportamento de dez ratos na análise do programa ETHOMATIC.

Como experimentos piloto haviam indicado que a injeção da peçonha talvez induzisse o surgimento de crises límbicas, realizou-se também a análise dos índices de crises segundo a escala de severidade proposta por PINEL & ROVNER (1978), tabela 4, durante os 6 tempos de observação após o gatilho comportamental.

TABELA 4. Escala comportamental de avaliação de crises convulsivas límbicas (PINEL & ROVNER, 1978).

Índice límbico	Comportamento
0	Imobilidade
1	Automatismos faciais
2	Mioclonias da cabeça, pescoço
3	Mioclonias das patas anteriores
4	Elevação sobre as patas posteriores
5	Elevação e queda
6	Várias classes 5 (n>3)
7	Comportamentos anteriores + corridas
8	Comportamentos anteriores + corridas + convulsão tônico-clônica

3.4.1.1.2. DOSE (0,04mg)

Injetaram-se i.c.v. 3µl de solução C de PPBL (dose total de 0,04 mg de PPBL, dez vezes mais diluída do que a do exp.1; n=6). A análise neuroetológica escolhida foi a de janelas arbitrárias, com 1 minuto de transcrição comportamental no intervalo 15-16 min após a injeção.

3.4.2. ABORDAGEM PERIFÉRICA

3.4.2.1. INJEÇÃO PERIFÉRICA (i.v.) DE PPBL (DOSE 2,26 mg DE PEÇONHA/ANIMAL)

Injetou-se i.v. (veia caudal) 0,1ml de solução D de PPBL (dose total de 2,26 mg de PPBL; n=6). Utilizaram-se janelas arbitrárias (intervalos 0-1; 60-61 e 180-

181 min após a injeção). Os controles receberam apenas salina (0,1 ml; N=4), e foram filmados e analisados da mesma forma que os animais experimentais.

3.4.3. ABORDAGEM ANTICONVULSIVANTE: PPBF E PTZ

3.4.3.1 INJEÇÃO i.c.v. DE PPBF 0,1 U: ANÁLISE NEUROETOLÓGICA

Para verificar se a dose 0,1 U de PPBF causaria algum tipo de alteração comportamental *per se*, injetaram-se 3µl desta solução i.c.v. (n=5). A análise neuroetológica escolhida foi a de janelas arbitrárias, com 1 minuto de transcrição comportamental no intervalo 15-16 min após a injeção.

3.4.3.2. INJEÇÃO i.c.v. DE PPBF 0,1 U: EXPERIMENTO COM ROTA-ROD

Injetaram-se i.c.v. 3 µl de solução salina e, após 24 h, 0,1 U de PPBF (n=7). Executou-se, 20 min após cada injeção, o teste de ROTA-ROD (*Ugo Basile 7750*, utilizado no laboratório do Prof. Dr. Marcus Lira Brandão, Dep. Psicologia e Educação, FFCLRP) para verificação de possível alteração motora nos ratos devido ao efeito da peçonha fervida.

O experimento consiste em posicionar o animal sobre um tubo giratório (impulsionado por motor elétrico com aceleração constante), e cronometrar o tempo de queda. Cada animal foi colocado apenas uma vez (por experimento) no aparelho, para evitar-se a habituação.

3.4.3.3. INJEÇÃO i.p. DE PTZ (80 mg/kg)

Injetou-se i.p. PTZ (80 mg/kg; n=10). Sabe-se que esta dose de PTZ causa crises clônicas e tônicas em ratos (para revisão veja LÖSCHER & SCHMIDT, 1988). Observou-se a presença ou ausência de crises clônicas e tônicas nos animais, registrando-se as latências.

3.4.3.4. INJEÇÃO i.c.v. DE PPBF 0,1 U SEGUIDA DE PTZ i.p. (80 mg/kg)

Injetaram-se i.c.v. 3 µl de solução 0,1 U de PPBF (n=10), e após 20 minutos, PTZ i.p. (80 mg/kg). Observou-se a presença ou ausência de crises clônicas e tônicas nos animais, registrando-se as latências.

3.5. TESTE DE CONFIABILIDADE DAS OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Buscando-se confirmar se as observações comportamentais são reprodutíveis, três filmagens de um minuto cada foram analisadas três vezes, em dias diferentes. O teste de confiabilidade (adaptada a partir de GARCIA-CAIRASCO, 1982), consiste em comparar três vezes os comportamentos observados em uma mesma filmagem. Cada filmagem foi observada por 3 vezes, em dias diferentes. Escolheu-se 1 minuto de comportamento de um animal controle i.c.v., um animal com crises leves e um com crises graves, pois estes foram os três tipos básicos de padrões comportamentais observados nos experimentos 1, 2, 3, 4 e 5. Nos outros experimentos não utilizou-se a metodologia neuroetológica, ou por terem sido utilizados aparelhos (como o ROTA-ROD, experimento 6), ou por envolverem a simples observação de presença ou ausência de crises induzidas pelo PTZ (experimentos 7 e 8).

Calculou-se o índice de confiabilidade (Ic), através da fórmula:

$$Ic = \frac{Nc}{Nc + Nd + No}$$

Onde **Ic**: Índice de confiabilidade (grau de reprodução das observações, medido em porcentagem); **Nc**: Número de concordâncias (comportamentos iguais foram atribuídos, no mesmo instante nas três observações, com 1 s de tolerância); **Nd**: número de discordâncias (comportamentos diferentes foram atribuídos no mesmo instante, com no máximo 1 s de tolerância); **No**: número de omissões (quando em uma transcrição atribui-se um comportamento em determinado instante, e em outra transcrição, não atribui-se nenhum). Aceita-se que um índice de confiabilidade satisfatório seja 0,75 (WEICK, *apud* GARCIA-CAIRASCO, 1982).

4.RESULTADOS

4.1. ABORDAGEM CENTRAL

4.1.1. CONTROLES *i.c.v.*

Os animais controle, após a injeção de salina, apresentaram duas classificações comportamentais, descritas na literatura como consequência da exposição do rato a um ambiente novo (SILVERMAN, 1978): exploração e autolimpeza.

1- Exploração: verificação visual, olfativa e auditiva do ambiente, mais intensa nos primeiros momentos após a colocação do animal na arena. Como exemplo temos os comportamentos cabeceio (CBC), cheirar exploratório (CHP), caminhar (CM), ereto (ER), pivoteio (PIV), parado (PR) e esquadrinhar (SQ) (tabela 1). O comportamento parado (PR) aqui descrito representa as pequenas pausas entre os comportamentos exploratórios, diferenciando-se da imobilidade com relativamente maior duração temporária observada, por exemplo, quando o animal está deitado (DEI).

2- Autolimpeza: lambidas e mordidas na pele, garras, pêlos, ou nos órgãos genitais autolimpeza lateral direita e esquerda (ALD e ALE), coçar lado direito do corpo (CCE), lavar cabeça (LCB), limpar garras frontal (LG).

Após determinado tempo na arena, o animal apresenta gradativa diminuição de resposta a exposição ao ambiente novo, com diminuição da exploração. Observa-se aumento no número e interações entre os comportamentos da autolimpeza e de outros comportamentos, como bocejar (BC) e mastigar (MT), geralmente relacionados com imobilidade (deitar –DEI ou deitar à esquerda-DEIE). Acreditamos que estes comportamentos decorrentes da diminuição de resposta possam ser consequência da habituação dos animais. Para a melhor visualização dos fluxogramas, inserimos arbitrariamente círculos ao redor dos comportamentos exploratório e autolimpeza. Algumas vezes, inseriu-se círculos também ao redor dos comportamentos que provavelmente intensificaram-se com a habituação. Obtivemos assim agrupamentos comportamentais denominados *clusters* (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1992), como o *cluster* exploratório e o *cluster* de autolimpeza. Embora, por definição, não pode-se definir comportamentos de habituação porque habituação significa diminuição de resposta ao estímulo, denominamos o grupo de comportamentos que provavelmente originaram-se deste fenômeno como *cluster* de habituação. No intervalo temporal 0-1 min após a injeção de salina (figura 6A), observou-se

predomínio de comportamentos do *cluster* exploratório, contendo ereto (ER), esquadrinhar (SQ) e cheirar exploratório (CHP). Vê-se que cheirar exploratório (CHP) contém forte interação estatisticamente significativa com ereto (ER), esquadrinhar (SQ) e cabeceio (CBC). Na porção inferior de todos os fluxograma dos animais controle (figuras 6A, B e C), observa-se o *cluster* de autolimpeza. Aqui, o comportamento lavar cabeça (LCB) associa-se fortemente ao limpar garras frontal (LG), e este com associação recíproca ao lavar fucinho (LVF).

No intervalo 15-16 minutos, percebe-se na figura 6B que a duração de PR (base do retângulo aumentou, estabelecendo forte associação com SQ. Diminuíram de uma forma generalizada as interações (setas) comportamentais no *cluster* exploratório, havendo um aumento no número de comportamentos e de díades estatisticamente significantes no *cluster* de autolimpeza. Há também o surgimento de um novo *cluster*, com comportamentos de habituação do animal, como deitado (DEI) e mastigação (MT).

No intervalo 58-59 min após a injeção de salina (figura 6C), percebe-se aumento na duração do comportamento deitado (DEI), bem como no número de comportamentos do *cluster* de habituação. Observou-se que a interação estatística mais forte observada neste tempo foi a recíproca limpar garras frontal (LG) com lavar fucinho (LVF).

Fig. 6. Fluxogramas controle i.c.v.. Ratos Wistar (N=10) injetados com salina 0,9% i.c.v. (3 µl). A análise comportamental foi realizada com a observação de 1 minuto, nos intervalos 0-1 (A), 15-16 (B) e 58-59 (C) min após a injeção.

4.1.2. INJEÇÃO CENTRAL (i.c.v.) DE PPBL (DOSES 0,4 E 0,04 mg DE PEÇONHA/ANIMAL).....

4.1.2.1. DOSE 0,4 mg

4.1.2.1.1. CRISES GRAVES

Após a injeção de 3 µl da solução A de PPBL (dose 0,4 mg/animal) observou-se alterações comportamentais importantes nos animais. Pela semelhança fenotípica com as crises límbicas descritas por RACINE (1972), e posteriormente por PINEL & ROVNER (1978), identificamos os comportamentos como crises convulsivas. Os animais apresentam, após certo período de latência (tabela 5), sacudidela de corpo (WDS) ou mioclonia de cabeça (MIOC). Por este motivo, estes comportamentos foram eleitos como o gatilhos comportamentais marcadores do início do registro deste tipo de crise. Deste ponto em diante, o quadro tende a agravar-se, evoluindo para mioclonias (principalmente de cabeça e patas anteriores), geralmente apresentando hiperextensão de pata posterior esquerda (HP2E) e intensa salivação do animal. Os animais com este quadro de crises límbicas foram caracterizados como possuidores de **crise grave**⁷.

Os fluxogramas representativos dos comportamentos dos animais com crises graves (figuras 7, 9 e 10) demonstram o quadro observado. Nas figuras 7 e 9, temos a análise tipo gatilho comportamental, e na figura 10, temos as janelas arbitrárias (intervalos 0-1 min fig. 10A; 15-16 min fig 10B e 58-59 min, fig 10C). A figura 7 mostra a somatória de todas as observações tipo gatilho comportamental (a partir da primeira sacudidela de corpo –WDS- ou mioclonia de cabeça –MIOC- observada nestes animais). Percebe-se, neste fluxograma, que os comportamentos sacudidela de corpo (WDS) e mioclonia de cabeça (MIOC) são centrais no quadro clínico dos animais. A sacudidela de corpo (WDS) possui fortes associações estatísticas com comportamentos como o ereto (ER), o parado (PR) e o cheirar exploratório (CHP). O outro comportamento aceito como fundamental para a instalação do quadro comportamental é a mioclonia de cabeça (MIOC). Uma interpretação a partir do cluster límbico é de que este último comportamento

⁷ Em experimento piloto onde injetou-se uma dose dez vezes mais concentrada (mesmo volume de PPBL 4mg/animal, i.c.v.) em um rato Wistar, observou-se que o animal apresentou também o quadro descrito aqui como grave, após o mesmo tempo de latência (dados não mostrados).

parece iniciar o *cluster* límbico. Os comportamentos límbicos repetem a escala de PINEL & ROVNER (1978; tabela 4), tendo interação estatística entre mioclonia de cabeça (MIOC) (classe 2 de PINEL & ROVNER), mioclonia de membros anteriores (MIO1; classe 3), elevação (ELE: classe 4) e queda límbica (QUED, classe 5). No entanto, percebe-se que a queda límbica (QUED) também associa-se com elevação (ELE) e com mioclonia de cabeça (MIOC). A "saída" do *cluster* límbico mostra-se ser, principalmente, a hiperextensão de pata posterior esquerda (HP2E), a sacudidela de corpo (WDS) e a mioclonia de tronco (MIOT). Importante associação estatística é notada entre o cheirar exploratório CHP e o tremor TR.

O comportamento deitado (DEI), ligado à mioclonia de orelhas (MIOO), assim como a interação entre alargamento de base (BL) e parado (PR), parece reforçar esta dificuldade motora ou de equilíbrio dos animais. Interessante que, neste fluxograma, percebe-se forte associação entre comportamentos exploratórios (ER) e de autolimpeza (LG), não visto nos controles. Também diferente dos controles, é a menor gama de comportamentos exploratórios e de autolimpeza.

Fig. 7- Fluxograma representativo dos comportamentos crise grave. Injeção i.c.v. de PPBL, dose 0,4 mg. Análise tipo gatilho comportamental, realizada em 6 observações de 30 segundos, espaçadas 5 minutos entre si. Este fluxograma é a somatória de todas as observações.

Fig. 8- Gráfico dos índices de severidade límbica (PINEL e ROVNER, 1978) dos ratos com crise grave. Tratamento: injeção i.c.v. de PPBL (0,4 mg). Seis observações comportamentais de 1 minuto, espaçadas de 5 minutos entre si, a partir do gatilho comportamental (MIOC ou WDS).

Ainda na análise tipo gatilho comportamental dos animais com crise grave, percebe-se, na figura 9, que os comportamentos vão, gradativamente, sendo exibidos pelos animais, nos tempos posteriores ao gatilho comportamental. Na primeira observação (figura 9A), o comportamento límbico com maior frequência e duração é mioclonia de cabeça (MIOC). No entanto, pode-se perceber a existência de mioclonia de patas anteriores (MIO1), elevação (ELE) e queda límbica (QUED). Também no gráfico de índices de crises límbicas do mesmo período (figura 8), vê-se o predomínio de mioclonia de cabeça (MIOC) nesta observação. Tal fato relaciona-se com o aparecimento de mioclonia de cabeça MIOC como o primeiro comportamento de crise em alguns animais. Este primeiro tempo, parece contribuir para as fortes associações entre o cheirar exploratório (WDS) e comportamentos exploratórios, como cheirar exploratório (CHP) e ereto (ER).

A referida dificuldade motora (figura 9A) intensifica-se e, no segundo tempo de observação das crises graves (figura 9B), observa-se o surgimento da associação entre alargamento de base (BL), tremor (TR) e parado (PR), a comportamentos exploratórios, como cheirar exploratório (CHP). O número de comportamentos límbicos reduz-se somente a mioclonia de cabeça (MIOC) (crise

classe 2, tabela 4), que assume a maior porcentagem de crises por tempo de observação (próximo a 60% dos animais- figura 8).

O terceiro tempo de observação das crises graves (figura 9C) caracteriza-se por uma diminuição na frequência de mioclonia de cabeça (MIOC) (menor altura do retângulo), bem como uma inédita associação deste comportamento com o parado (PR), que por sua vez, liga-se reciprocamente à sacudidela de corpo (WDS). Aumentam a gama de comportamentos límbicos observados, como mioclonia de patas anteriores (MIO1), elevação (ELE) e queda límbica (QUED), mas sem associações estatisticamente significativas. A única sequência límbica observada foi entre mioclonia de cabeça (MIOC) e mioclonia de patas anteriores (MIO1). As crises classe 3 e 4 (mioclonia de patas anteriores -MIO1- e elevação -ELE, figura 8 e tabela 4) ocorreram em igual porcentagem de animais, pouco mais elevadas do que a classe 5 (queda límbica -QUED).

A sequência límbica (mioclonia de cabeça -MIOC- mioclonia de patas anteriores -MIO1- elevação -ELE- e queda límbica -QUED) está presente no quarto, quinto e sexto tempos de observação (figura 9D, 9E e 9F). Percebe-se que nestes tempos de observação há um predomínio da classe 2 sobre as outras crises (figura 8), e que a classe de crise 3 encontra-se sempre pouco inferior à classe 4, sendo estas duas, porém, mais freqüentemente observadas do que a crise da classe 5 (figura 8). No quarto tempo de observação (figura 9D) pode-se, pela única vez em todo o experimento, observar-se uma crise classe 6 (número de quedas maiores a 3, tabela 4). No entanto, no fluxograma deste tempo (figura 6), esta classe 6 não ficou evidenciada, podendo-se observar apenas o *cluster* límbico, e as fortes interações entre cheirar exploratório (WDS) com ereto (ER), parado (PR) e cheirar exploratório (CHP). Este último possui, também, forte díade comportamental com tremor (TR).

No quinto e sexto tempos de observação das crises graves (figura 9E e 9F), estão praticamente ausentes as interações comportamentais fóra do *cluster* límbico, caracterizando o *status epilepticus* (crises contínuas observadas por mais de 30 min). Após 2 ou 3 h, os animais vão lentamente retornando à normalidade, estando completamente recuperados em 24 h. A mortalidade é muito baixa (cerca de 2 a cada 10 animais com crises graves, em observação após 24 h).

Interessante também é a comparação entre o fluxograma representativo da somatória das seis observações comportamentais após o gatilho comportamental das crises graves (figura 7), com o de cada observação (figuras 9A a F). Percebe-se que o *cluster* límbico, com fortes interações estatísticas no fluxograma total (figura 7), encontra-se presente em todos os tempos de observação (figuras 9A a

F). Nos três primeiros tempos de observação (figuras 9A a C), há fracas associações estatisticamente significantes entre os comportamentos deste *cluster*.

Nos três tempos de observação seguintes (figuras 9D a F) observa-se intensificação nas associações comportamentais dentro deste *cluster*.

A interação entre queda límbica (QUED) e mioclonia de cabeça (MIOC), vista no primeiro e quarto tempos de observação (figuras 9A e D), manteve-se estatisticamente significativa no fluxograma total (figura 7), o mesmo não acontecendo com a associação mioclonia de cabeça (MIOC) → elevação (ELE) (figura 9E).

Fig. 9. Fluxograma representativo dos comportamentos crise grave. Injeção i.c.v. de PPBL (0,4 mg) Análise tipo gatilho comportamental, realizada em seis observações (A, B C D E e F) de 30 segundos, espaçadas 5 minutos entre si.

Na figura 10, representa-se também a análise neuroetológica das crises graves, porém com a metodologia de janelas arbitrárias. No intervalo 0-1 min após a injeção, percebe-se que o fluxograma (figura 10A) é muito semelhante ao fluxograma controle i.c.v. de memo período de observação (figura 6A), com os *clusters* exploratório e de autolimpeza bem definidos. No período 15-16 min (figura 10B), é evidente a presença do *cluster* límbico, no entanto sem as associações sequenciais observadas no fluxograma do quarto tempo de observação (figura 9D). Presentes também o tremor (TR) e a sacudidela de corpo (WDS), mas sem associação estatística com outro comportamento. No período 58-59 min (figura 10C), vê-se que a frequência e duração de mioclonia de cabeça (MIOC) aumentou

muito, este comportamento já apresentando associação com mioclonia de patas anteriores (MIO1). No entanto, elevação (ELE) e queda límbica (QUED) ainda permanecem sem associação estatisticamente significativa.

Fig. 10. Fluxograma representativo dos comportamentos crise grave. Injeção i.c. v. de PPBL (0,4 mg). Análise tipo janelas arbitrárias, períodos 0-1 min (A), 15-16 (B) e 58-59 min (C).

4.1.2.1.2. CRISES LEVES

Verificou-se que alguns animais, apesar de não apresentarem as crises límbicas características do quadro grave, exibiram comportamentos não observados nos animais controle. Após certa latência (tabela 5), observaram-se tremores de corpo (TR), geralmente associados a comportamentos exploratórios (como o cheirar exploratório- CHP; ou o ereto- ER), e possuindo também a hiperextensão de pata posterior esquerda (HP2E). Como estes comportamentos também foram observados nos ratos com crise grave antes das crises límbicas, e como os animais não mais entravam em *status epilepticus*, denominou-se este quadro de **crises leves**.

Importante ressaltar que o comportamento sacudidela de corpo (WDS), escolhido (junto com mioclonia de cabeça – MIOC) como gatilho comportamental das crises graves, não é exclusivo deste tipo de crise. Os animais com crise leve

também o apresentaram, em dados momentos de observação. A diferença está no tipo de crise apresentada pelo rato (se límbica: crise grave; se não límbica: crise leve). Uma vez determinada o tipo de crise sofrida pelo animal, reobservava-se a filmagem, aguardando o surgimento do gatilho comportamental. Comum a ambas as crises é o comportamento de alargamento de base (BL), onde o animal afasta suas patas posteriores e verte o corpo em direção ao solo, como que para manter sob maior controle seu centro de gravidade. A figura 11 mostra o fluxograma resultante de todas as observações tipo gatilho comportamental. Neste fluxograma, vê-se que o tremor (TR) e o alargamento de base (BL) são os principais pontos de interação comportamental. Do tremor (TR) partem importantes associações estatisticamente significantes com os comportamentos exploratórios, como ereto (ER), esquadrinhar (SQ) e o cheirar exploratório (CHP). Existe, assim, relação entre a tentativa de exploração do meio e o surgimento das crises.

Tabela 5. Latência (min) observada até o surgimento dos gatilhos comportamentais: MIOC ou WDS (crises graves), e TR (crises leves). Não houve diferença na latência entre os dois tipos de crises (verificado com teste t de Student bicaudal).

CRISE OBSERVADA (experimento 1)	Latência (média e desvio- padrão), min	n
CRISES GRAVES	27,9 ± 18,1	14
CRISES LEVES	30,4 ± 7,1	8

O comportamento parado (PR) liga-se fortemente ao alargamento de base (BL) e à hiperextensão da pata posterior esquerda (HP2E), mostrando um possível comprometimento da motricidade ou do equilíbrio do animal, que permanece parado ou deitado (ver a grande altura do retângulo do comportamento parado – PR- e grande base do retângulo deitado -DEI- figura 11). Uma interpretação é de que ao tentar mover-se, acaba com sua pata posterior esquerda em hiperextensão, e alargando sua base de sustentação. Os comportamentos tremor (TR) e alargamento de base (BL) também foram observados com alta frequência. As crises leves mostram-se diferentes do controle i.c.v. (figura 6), pela ausência de associações entre os comportamentos exploratórios e pela gama e associação entre os comportamentos de autolimpeza.

Fig. 11- Fluxograma representativo dos comportamentos crise leve. Injeção i.c.v. de PPBL (0,4 mg). Análise tipo gatilho comportamental, realizada em 6 observações de 30 segundos, espaçadas 5 minutos entre si. Este fluxograma é a somatória de todas as observações.

Na figura 12, apresentam-se os fluxogramas dos animais com crises leves, segundo a metodologia de gatilho comportamental, em 6 tempos de observação. Já no primeiro tempo, as interações comportamentais giram ao redor de tremor (TR) - o gatilho comportamental. Estas interações acontecem com os comportamentos exploratórios, como ereto (ER), cheirar exploratório (CHP) e esquadrinhar (SQ). Alguns animais exibiram queda atônica à esquerda (QTE). Este último comportamento merece consideração especial. A definição do comportamento queda atônica foi inicialmente baseada nas convulsões audiogênicas, onde o rato achava-se inicialmente em postura ereta ou pulando, durante as crises mesencefálicas (*“wild running”*) (GARCIA-CAIRASCO, comunicação pessoal; GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996). Em nossos experimentos, os animais não exibiram *wild running*, nem pulos. O animal, às vezes após certo tempo de imobilidade, tem uma queda lateral, geralmente ao iniciar o movimento de marcha (caminhar -CM), cheirar exploratório (CHP) ou ereto (ERE). Mesmo assim, achou-se prudente manter a mesma nomenclatura para o referido comportamento.

No segundo tempo de observação (FIGURA 12B), surge o comportamento hiperextensão da pata posterior esquerda (HP2E), associado ao parado (PR). Além destes, a única interação se dá entre tremor (TR) e cheirar exploratório (CHP).

No terceiro tempo (figura 12C), os animais já exibem o alargamento de base (BL), associado ao parado (PR). Mantém-se as interações exploratórias (cheirar exploratório -CHP e esquadrinhar -SQ) com tremor (TR), bem como a hiperextensão da pata posterior esquerda (HP2E) ao deitado (DEI).

No quarto tempo de observação das crises leves (figura 12D), destaca-se a forte associação entre a hiperextensão da pata posterior esquerda (HP2E) e parado (PR), e deste último com o alargamento de base (BL). Pode-se ver um maior número de comportamentos exploratórios, e entre estes, o esquadrinhar (SQ) liga-se ao tremor (TR). No entanto, a duração de deitado (DEI) (base do retângulo- figura 12D) continuou maior em relação a maioria dos comportamentos. Presença de quedas atônicas à esquerda (QTE).

No quinto tempo de observação (figura 12E), somente cheirar exploratório (CHP) associa-se (fracamente), com tremor (TR). Não se observa a presença de hiperextensão da pata posterior esquerda (HP2E), nem de comportamentos de autolimpeza. Alguns animais exibiram queda atônica à esquerda (QTE).

No sexto tempo de observação (figura 12F), tremor (TR) e alargamento de base (BL) continuam ligados a comportamentos exploratórios (esquadrinhar -SQ e cheirar exploratório -CHP). Observa-se um aumento na frequência de tremor (TR). Também queda atônica à esquerda (QTE) e sacudidela de corpo (WDS) indicam a anormalidade do estado dos animais. O quadro leve, então, vai normalizando-se, e em 24 h os animais apresentam-se completamente recuperados, não tendo sido constatado morte neste período.

Fig. 12. Fluxograma representativo dos comportamentos crise leve (experimento 1). Análise tipo gatilho comportamental, realizada em 6 observações (A, B C D E e F) de 30 segundos, espaçadas 5 minutos entre si.

Na figura 13, representa-se a análise neuroetológica de janelas arbitrárias dos animais com crises leves. No intervalo 0-1 min após a injeção (figura 13A), percebe-se que o fluxograma é muito semelhante ao fluxograma controle i.c.v. de mesmo intervalo (figura 6A), com os *clusters* exploratório e de autolimpeza bem definidos, apesar do cheirar exploratório (CHP) ter perdido relativa importância no *cluster* exploratório (sua frequência e duração diminuíram, em relação ao controle). No intervalo de tempo 15-16 min após a injeção (figura 13B), percebe-se também a associação de tremor (TR) com comportamentos de imobilidade, como deitar à esquerda (DEIE). No intervalo 58-59 min (figura 13C), vê-se que a duração de alargamento da base (BL) aumentou muito, e o tremor (TR), à semelhança do intervalo anterior, associa-se com o comportamento de imobilidade deitar (DEI).

Fig. 13. Fluxograma representativo dos comportamentos crise leve (experimento 1). Análise tipo janelas arbitrárias, períodos 0-1 min (A), 15-16 (B) e 58-59 min (C).

4.1.1.2. DOSE 0,04 mg

A injeção i.c.v. da dose 0,04 (n=5) de PPBL não causou nenhuma crise observável comportamentalmente. Realizou-se o fluxograma deste grupo de animais com janela arbitrária de 1 minuto de observação definido no intervalo 15-

16 min após a injeção. À semelhança dos controles i.c.v. 15 min (figura 6B), observa-se relativamente poucas interações entre os comportamentos exploratórios, mas intensas associações no *cluster* de autolimpeza, e presença do *cluster* de habituação. No entanto, observa-se a sacudidela de corpo (WDS), mas que, diferente dos casos de crises leves e graves, não é seguida por tremores nem mioclonias de qualquer natureza. O comportamento parado (PR), no entanto, apresentou diferentes associações comportamentais. Enquanto nos animais controle (figura 6B), PR é observado preferencialmente após ereto (ER), nos animais do presente experimento este comportamento segue-se limpar garras da pata posterior esquerda (LG2D) e antecede-se a SAC2 (figura 15). Observa-se que o comportamento parado (PR) também apresentou associação recíproca com mastigar (MT).

Fig. 15. Fluxograma representativo dos comportamentos dos animais com injeção i.c.v. de 3 µl da dose 0,04 de PPBL (n=5). Análise tipo janelas arbitrárias, período 15-16 (B).

4.2. ABORDAGEM PERIFÉRICA

4.2.1. INJEÇÃO PERIFÉRICA (i.v.) DE PPBL (DOSE 2,26 mg DE PEÇONHA/ANIMAI)

Após a injeção i.v. de 0,1ml da solução de PPBL dose (2,26 mg peçonha/animal), observou-se que no intervalo 0-1 min (figura 16), há uma verdadeira explosão comportamental, inclusive com MIO1 e WDS. Mas, chama atenção a intensificação de associação estatística entre os comportamentos

exploratórios e de autolimpeza. Uma comparação com o controle i.v., mostra que os comportamentos exibidos são praticamente os mesmos (figura 16). No entanto, a espessura das setas experimentais (figuras 16D, E e F) é muito maior do que as do controle (figuras 16A, B e C). Como exemplos temos as interações comportamentais do primeiro intervalo de observação (figuras 16A e D) entre ereto (ER) ↔ cheirar exploratório (CHP), ereto (ER) ↔ caminhar (CM), lavar fucinho (LVF) → lavar cabeça (LCB) e limpar garras frontal (LG) → lavar fucinho (LVF). Este quadro repete-se também nos intervalos de observação tempos 60-61 (figuras 16 B e E) e 180-181 min (figuras 16C e F). A observação destes animais não revelou nenhuma crise aparente.

Fig. 16. Fluxogramas representativos do comportamento de ratos injetados i.v. com salina (A, B e C; n=4) e solução de dose 2,26 mg/animal de PPBL (D, E e F; n=6). A análise comportamental foi realizada com 3 observações de 1 min, nos intervalos 0-1 min (A, D); 60-61 min (B, E) e 180-181 min (C, F) após a injeção. Não foram detectadas crises aparentes nos animais do grupo experimental.

4.3. ABORDAGEM ANTICONVULSIVANTE: PPBF E PTZ

4.3.1. INJEÇÃO i.c.v. DE PPBF 0,1 U: ANÁLISE NEUROETOLÓGICA

Com o objetivo de verificar se a dose 0,1 U de PPBF utilizada no experimento anticonvulsivante não seria capaz de induzir crises *per se*, injetou-se esta dose i.c.v. (n=5). A observação destes animais por 1 h não revelou nenhuma crise aparente. A figura 17 representa o fluxograma comportamental dos animais do presente experimento, analisados através de janelas arbitrárias, com 1 minuto de observação no intervalo temporal 15-16 min após a injeção da peçonha. Pode-se perceber grande semelhança entre o fluxograma da figura 17 e o controle i.c.v (figura 6B).

Fig. 17. Fluxograma comportamental de ratos injetados com PPBF 0,1 U i.c.v. (3 µl). A análise comportamental foi realizada com janela arbitrária (uma observação), no intervalo tempo de 15-16 min após a injeção. Não observou-se crises aparentes.

4.3.2. INJEÇÃO i.c.v. DE PPBF 0,1 U: EXPERIMENTO COM ROTA-ROD.

Não observou-se alteração motora estatisticamente significativa (teste t de Student, bicaudal, com $\alpha = 0,05$) nos ratos Wistar após a injeção i.c.v. de PPBF 0,1 U (n=7), em comparação ao grupo controle. Os tempos de queda estão representados na tabela 6.

Tabela 6. Tempo de queda observado no experimento com ROTA-ROD. Ratos Wistar (N=7), receberam solução salina i.c.v. (3µl) e 24 h depois, 3µl i.c.v. de PPBF 0,1U. Após cada injeção, os animais foram colocados no aparelho ROTA-ROD. Os dados representam as médias e desvios padrão dos tempos de queda. Está representado também o valor do p (não significativo, teste t-de Student).

	Controle	Experimental
Tempo de queda (média + desvio padrão)	11,1 ± 2,4 min	11,6 ± 1,9 min
Teste t de Student		0,65

4.3.3. INJEÇÃO i.p. DE PTZ (80 mg/kg)

A injeção i.p. de PTZ 80 mg/kg em dez animais, determinou o surgimento de crises clônicas em 9 animais, e tônicas nos 10 animais, seguidos de morte. As latências estão representadas na tabela 7.

Experimentos piloto mostraram não haver diferença no tipo e latência das crises, quando injeta-se PTZ i.p. na mesma dose em ratos vinte minutos após injeção de salina i.c.v. (dados não mostrados).

4.3.4. INJEÇÃO i.c.v. DE PPBF 0,1 U SEGUIDA DE PTZ i.p. (80 mg/kg

A administração i.c.v. de 3 µl de solução 0,1 U de PPBF (n=10), seguida vinte minutos depois pela injeção i.p. de PTZ (80 mg/kg), resultou em efeito anticonvulsivante. Observou-se que seis animais não apresentaram crises clônicas e tônicas, e quatro ratos apresentaram crises clônicas e tônicas seguido de morte, de forma semelhante ao observado com o experimento 7. As latências estão representadas na tabela 7. A diferença quanto ao aparecimento de crises mostrou-se estatisticamente significativa em teste de FISHER (p< 0,05; bicaudal).

Tab 7. Valores de latência (média e desvio padrão) das crises clônicas e tônicas observadas em ratos após a injeção i.p. de PTZ (80 mg/kg), e após a injeção i.c.v. de PPB fervido 0,1 U (3µl) ou salina. N= número de animais que apresentaram crise em cada caso. * p< 0, 05; teste de FISHER (bicaudal).

PTZ (n=10)			PPB 0,1 U + PTZ (n=10)		PTZ + SALINA	
N	c. clônica 9	c. tônica 10	c. clônica 4*	c. tônica 4*	c. clônica 10	c. tônica 10
Latência (s)	43,1 ± 4,8	104,4 ± 23,9	55 ± 6	211,5 ± 114,4	50,2 ± 7,1	130,2 ± 30,3

4.4 TESTE DE CONFIABILIDADE DAS OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS.

A tabela 8 mostra o índice de confiabilidade (Ic) calculado para 1 minuto de análise da filmagem de um animal controle i.c.v., um animal com crises leves e um com crises graves. Observa-se que houve grande repetitibilidade na observação e descrição comportamental tanto dos controles quanto dos animais em crise.

Tab. 8. Índice de confiabilidade das observações comportamentais (Ic), calculado para 1 minuto de análise, em um rato controle (i.c.v.), um com crises leves e um com crises graves. Adaptado de GARCIA-CAIRASCO (1982).

	Filmagem Controle	Filmagem Crises Leves	Filmagem Crises Graves
Ic	0,85	0,90	0,90

5.DISSCUSSÃO

Verificou-se, em nossos experimentos, que a injeção i.c.v. de PPBL (3μl, dose 0,4 mg peçonha/animal) em ratos Wistar, determina o surgimento de crises muito semelhantes às crises límbicas descritas por RACINE (1972). Estes dados assemelham-se aos resultados com a injeção i.c.v (ratos) de α -DTX (VELLUTI, *et al.*, 1987), com a injeção intrahipocampal da peçonha bruta do escorpião *Tityus serrulatus* (5μ g; SANDOVAL & DORCE, 1993) e da neurotoxina TS-8F, isolada da peçonha do mesmo escorpião (CARVALHO *et al.*, 1998). Acredita-se que esta neurotoxina possa estar atuando no cérebro através do aumento da liberação de neurotransmissores (como o α -DTX), provavelmente aminoácidos excitatórios, via bloqueio da inativação de canais de sódio ou de potássio (CARVALHO *et al.*, 1998). A partir destes relatos, e das observações comportamentais nos presentes experimentos, pode-se supor que talvez a peçonha de *Parawixia bistriata* possua, em sua composição, neurotoxinas capazes de afetar canais iônicos como o de potássio ou sódio. No entanto, estas suposições requerem a purificação bioquímica da peçonha, e testes de frações em experimentos neuroetológico e posteriormente eletrofisiológico *in vitro* (como o *patch clamp*).

A interação mioclonia de cabeça (MIOC) → elevação (ELE), observada no quinto tempo de análise das crises graves (figura 9E), que não se manteve estatisticamente significativa no fluxograma total (figura 7), pode representar uma alteração central ocorrida apenas em um determinado instante após o surgimento do gatilho comportamental sacudidela de corpo (WDS) ou mioclonia de cabeça (MIOC) (25 minutos, pois esta é a quinta observação), que desta forma, “diluiu-se” na análise comportamental global. O sistema de registros elétricos encefálicos (EEG) talvez possa evidenciar esta alteração central naquele instante, caracterizando-a quanto a uma possível estrutura ou núcleo cerebral.

Escolheram-se dois comportamentos como gatilho comportamental das crises graves porque, dentre os animais que exibiram crises límbicas (experimento 1), a maioria dos ratos (n=10) apresentaram inicialmente sacudidela de corpo (WDS), seguidos de tremor (TR), evoluindo então para as mioclonias. No entanto, alguns animais (n=4), apresentaram diretamente mioclonia de cabeça (MIOC) e os outros comportamentos límbicos. Mesmo estes últimos tiveram sacudidela de corpo (WDS) após mioclonia (MIOC), no entanto julgamos inoportuno ignorar tão claro sinal de crise comportamental como mioclonia de cabeça (MIOC). Talvez o fato de alguns animais terem “ultrapassado” o quadro comportamental sacudidela de corpo (WDS) e exibido diretamente a mioclonia de cabeça (MIOC) com crises límbicas, reforce as hipóteses descritas anteriormente a respeito de diferença de susceptibilidade às crises, ou diferença na concentração de subcomponentes da peçonha.

A peçonha de *P. bistrata* pode possuir componentes com ação sobre o sistema límbico, devido aos comportamentos de crise límbica observados após a injeção i.c.v. (experimentos 1 e 2). Pretende-se verificar a veracidade desta hipótese através de futuros experimentos eletrofisiológicos, com a implantação de eletrodos monopolares ou bipolares e registro elétrico de estruturas límbicas antes e depois da injeção central da peçonha. Os registros elétricos cerebrais fornecerão dados bastante relevantes se associados à metodologia neuroetológica. No fluxograma do experimento 3 (figura 15), por exemplo, os animais poderiam estar apresentando descargas elétricas anormais, mas com pouco reflexo comportamental. O registro se justifica pois ele permite um monitoramento da atividade elétrica de estruturas encefálicas complementando a análise comportamental onde, apesar do animal às vezes permanecer parado após a injeção de uma substância convulsivante, ele pode estar apresentando intensa atividade epileptiforme em regiões específicas do encéfalo, detectável com eletrodos profundos (SANDOVAL & DORCE, 1993). A injeção intrahipocampal da peçonha bruta do escorpião *Tityus serrulatus*, por exemplo, determinou inicialmente atividades rápidas de alta voltagem no hipocampo e córtex. Após 25 a 40 minutos da injeção, enquanto o animal permanecia imóvel, era possível verificar a presença de “explosões” eletroencefalográficas de alta voltagem (“*spike bursts*”) (SANDOVAL & DORCE, 1993).

Em nossos experimentos, conclui-se que o SNC de roedores aparentemente apresenta boa tolerabilidade biológica em relação à peçonha de *P. bistrata*. As doses que se mostraram efetivas em causar alterações comportamentais i.c.v., onde o cérebro é diretamente exposto à peçonha, foram de grande ordem de concentração (miligramas; experimentos 1 e 2); em experimentos iniciais, várias doses de PPBL foram injetadas i.p. em camundongos com o objetivo da determinação da DL₅₀, mas não obtivemos resultados satisfatórios (dados não apresentados). Talvez estes fatos relacionem-se às poucas descrições de acidentes humanos com esta aranha, nunca fatais (LEVI, 1993), apesar da abundância destes espécimens. Durante as coletas, dois integrantes de nosso grupo sofreram picadas e, após certa dor e reação local, não relataram nenhuma alteração maior. Observou-se (na região de Tambaú) presença de grandes ninhos desta aranha em escolas. A não retirada destes ninhos pelos funcionários da escola talvez signifique, também, a relativa inocuidade desta espécie para o homem.

Nossa amostragem temporal, mesmo na análise tipo gatilho comportamental mista, registra apenas 30 segundos a cada 5 minutos, a partir do gatilho. Desta forma, muitos comportamentos foram certamente excluídos. No

caso da análise das crises convulsivas límbicas após a injeção de pilocarpina, as mioclonias apareciam sempre na mesma seqüência, facilitando assim a definição dos gatilhos comportamentais (FURTADO, 1996). Em nossos experimentos, observou-se que, apesar dos animais apresentarem comportamentos semelhantes às crises convulsivas límbicas, a regularidade e a seqüência não eram tão repetitivas como no caso da injeção de pilocarpina, aumentando grandemente o tempo a ser analisado. Isto nos levou a adotar o gatilho comportamental misto (pois seis observações espaçadas cinco minutos entre si cobrem trinta minutos de crises convulsivas). Talvez isto deva-se ao fato de estarmos estudando um conjunto de substâncias biologicamente ativas dentro da peçonha bruta de *P. bistriata*, em oposição à pilocarpina, uma substância com o modo de ação já conhecido (agonista colinérgico muscarínico). Estes fatos mostram que, embora a metodologia neuroetológica tenha, em analogia aos modelos de epilepsia experimental, mostrado-se capaz de descrever as alterações comportamentais em roedores após a injeção de peçonhas de artrópodos, existem claras diferenças entre os experimentos que devem ser respeitadas, sobretudo na definição da forma de análise escolhida (janelas arbitrárias, gatilhos comportamentais ou o gatilho comportamental misto). Aconselha-se que experimentos futuros nesta área (etofarmacologia de peçonhas) contenham também uma análise mais simplificada dos comportamentos, estudando-os separadamente.

As alterações comportamentais denominadas crises graves e leves, observadas após a injeção (no mesmo local do SNC) de peçonha com idênticos preparo e dose, podem ter ocorrido devido a vários fatores, como: 1- diferença na concentração de subcomponentes da peçonha bruta, oriunda de extrações do material de glândulas e reservatórios de espécimens diferentes. Apesar da PPBL ser confeccionada sempre a partir do mesmo peso seco de peçonha, não há como garantir igualdade nas concentrações de subcomponentes. Isto pode ser resolvido com isolamento bioquímico do (s) composto (s) ativo (s) e/ou com a confecção de *pool* da peçonha, no início dos experimentos. 2- diferença na susceptibilidade dos ratos às crises, como ocorre com a população geral do Biotério do Campus da USP de Ribeirão Preto que responde diferentemente a estímulos sonoros convulsivos (GARCIA-CAIRASCO, 1982), ou mesmo na linhagem de ratos WAR geneticamente sensíveis ou resistentes às convulsões audiogênicas (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996).

RACINE (1972) associou, com muito sucesso, uma seqüência de mioclonias à presença de fenômenos epileptogênicos do sistema límbico, em uma escala variando de 0 a 5, fornecendo assim importantes ferramentas para pesquisa. A simples observação externa dos comportamentos desta escala

passou a ser, até o presente momento, indício de ativação do sistema límbico. Até aquele momento, no entanto, acreditava-se que quando um animal atingisse a escala 5 em experimentos de abrasamento, ele estaria totalmente abrasado. No entanto, PINEL E ROVNER (1978), descobriram que, caso se continuasse a estimular os animais ditos totalmente abrasados, novos comportamentos eram observados, extendendo assim a escala de 5 para 8 ítems. Uma grande vantagem do uso da neuroetologia pode ser, então, possibilitar que se descubram interações comportamentais representativas do mecanismo de ação de substâncias químicas sobre o SNC. Em nossos experimentos, não consideramos a sacudidela de corpo (WDS) como convulsivo límbico pelo fato deste comportamento não pertencer à escala descrita por PINEL & ROVNER (1978). No entanto, sabe-se que a sacudidela de corpo (WDS) está classicamente associada à crises límbicas, como no caso da injeção i.p. e i.c.v. de ácido caínico (NADLER, 1981).

A contribuição da neuroetologia pode ser percebido através da comparação do gráfico contendo os índices límbicos (figura 8) com os fluxogramas representativos das seis observações dos animais com crise grave (figura 9). Embora o gráfico contenha toda a informação sobre as crises límbicas nos mesmos intervalos de observação dos fluxogramas, ele não consegue relacionar as mioclonias límbicas com os outros comportamentos como o cheirar exploratório (WDS) (figura 9D) ou com a hiperextensão da pata posterior esquerda (HP2E) (figuras 9 A a F). E estas associações podem revelar, após maior número de estudos, uma expressão “macroscópica” do mecanismo de ação da substância injetada no SNC. Caso esta hipótese concretize-se, ela ofereceria uma ferramenta barata e precisa de análise do impacto de diversas substâncias sobre o SNC, em ensaios que não desprezem a complexidade do organismo como um todo (*in vivo*), diferentemente do observado nos estudos *in vitro*.

Durante o comportamento de hiperextensão da pata posterior esquerda (HP2E), esta pata permanece rígida, lembrando muito uma crise convulsiva tônica. No entanto, tal afirmação só poderia ser comprovada através de eletromiografia.

Nos presentes experimentos, verificou-se que a dose de PPBL utilizada para a produção de crises límbicas (0,4 e 4 mg) é muito elevada em relação à utilizada pela α -DTX (20 μ g, i.c.v.; VELLUTI, *et al.*, 1987) e pelo TS-8F (2 μ g, intrahipocampal; CARVALHO *et al.*, 1998). Esta alta concentração pode estar determinando um aumento na pressão osmótica local, causando assim um desarranjo generalizado no sistema límbico, situado no assoalho do corno inferior do ventrículo. Muito importante para a verificação desta hipótese será, em futuros experimentos, realizarmos um grupo controle recebendo a injeção i.c.v. de uma

solução de mesma osmolaridade com uma substância pouco metabolizável, e verificarmos se observa-se os mesmos efeitos comportamentais.

Outra hipótese para o mesmo fato é que a alta dose efetiva indique que o (s) componente (s) responsável (eis) pelas crises encontra(m)-se em baixa concentração na peçonha, ou tenha sofrido perda de atividade no preparo da peçonha. Talvez a injeção em núcleos específicos do encéfalo (em oposição à injeção i.c.v. utilizada em nossos protocolos) e isolamento bioquímico das neurotoxinas presentes nesta peçonha, elevem a potência biológica, diminuindo a dose efetiva.

Desconhece-se se a peçonha de *P. bistriata* peçonha possui atividade proteolítica. Em nossas lâminas histológicas, confeccionadas 24 h após a injeção, não se observa lise nas paredes do ventrículo. No entanto, futuros experimentos de verificação de atividade proteolítica, a serem executados, esclarecerão a questão.

Acreditamos ser pouco provável que a peçonha esteja sofrendo perda de atividade generalizada. No experimento anticonvulsivante, a peçonha continuou biologicamente ativa mesmo após fervura por 10 minutos a 98 °C e inoculação a 0,1 U⁸.

Comparando-se os resultados da injeção da peçonha i.c.v. e i.v., conclui-se também que o possível componente pró-convulsivante pode ter ação mais seletiva sobre o SNC que o SNP, uma vez que a injeção i.v., em uma dose relativamente alta, não produziu crises, nem salivação. Comportamentalmente, a observação de sacudidela de corpo (WDS) sugere que talvez este (s) componente (s) encontre-se em baixa concentração ou que, de forma semelhante ao já observado em outras peçonhas, este (s) componente (s) tenha (am) maior atividade em insetos do que em mamíferos (ZLOTKIN, 1983). Interessante ressaltar os resultados da injeção i.v.. Embora nenhum quadro de crises tenha se instalado nos animais, houve uma "explosão" comportamental. Tanto os comportamentos quanto as associações diádicas estatisticamente significativas exibidos pelos ratos experimentais, são muito semelhantes aos animais controle. No entanto, a intensidade das interações comportamentais (graficamente, a espessura das setas), é na maioria das vezes muito mais forte nos animais experimentais (figura 16), sobretudo no intervalo de tempo 0-1 min após a injeção (figura 16D). Neste intervalo, surgem comportamentos classicamente relacionados ao acometimento límbico: sacudidela de corpo (WDS) e leve mioclonia de patas anteriores (MIO1). Talvez o (s) componente (s) pró-convulsivante (s) talvez esteja tendo dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica, para então agir sobre o sistema límbico.

---

⁸ Cada µl injetado no ventrículo lateral do rato contendo um décimo do conteúdo de 1 glândula de peçonha.

Esta “explosão” talvez signifique uma **atividade de deslocamento** comportamental. Segundo SILVERMAN (1978), quando um animal parece “querer” fazer algo mas não o consegue por ser fisicamente impossível, ou porque ele também quer fazer outra coisa, o animal geralmente apresenta uma breve porém vigorosa forma de um terceiro comportamento. Acredita-se que a atividade de deslocamento possa representar um mecanismo homeostático do SNC, cuja função seria diminuir o “excesso de ativação” (*arousal*) cerebral (DELIUS, *apud* SILVERMAN, 1978), ou talvez também o contrário, elevar a “ativação” cerebral (SILVERMAN, 1978). Em nossos experimentos, talvez a “explosão comportamental” vista no grande aumento da espessura das setas (figuras 16 D, E e F) nos animais que receberam peçonha i.v. seja um tipo de atividade de deslocamento. SILVERMAN (1978) relata que a atividade de deslocamento em ratos pode ser vista, entre outros, nos comportamentos de autolimpeza, o que assemelha-se muito ao observado em nossos experimentos, onde o *cluster* de autolimpeza apresenta o referido aumento da associação comportamental (figuras 16 E e F). No momento, não conseguimos explicar este fato, e mais experimentos são necessários para a confirmação desta hipótese. Importante salientar que também neste experimento (injeção i.v.) só temos acesso ao comportamento “externo” do animal, sem o acompanhamento da atividade elétrica cerebral, o que pode estar mascarando possíveis efeitos da peçonha sobre o SNC, sem correspondência comportamental.

Sabe-se que a comparação da ação de drogas nos ambientes *in vivo* e *in vitro* deve ser executada sempre com muita cautela. Muitas variáveis na cinética da ação da droga, presentes na complexidade do cérebro, estão simplesmente ausentes em estudos com sinaptosomas ou membranas sinaptosomais isoladas. Entretanto, acreditamos ser válido todo o esforço visando a extrapolação e comparação dos dois referidos ambientes.

Assim, com o objetivo de verificar se os resultados neuroquímicos da peçonha de *P. bistriata* com relação ao sistema gabaérgico (inibição da recaptação e estimulação da liberação de GABA; FONTANA, 1997), apresentariam alguma relação com um modelo químico gabaérgico de indução de crises agudas em ratos (PTZ, antagonista dos receptores GABA), utilizou-se, nos experimentos 5 a 8, o preparo da peçonha (fervida) segundo (FONTANA, 1997). A dose utilizada em nossos experimentos não causou crises observáveis comportamentalmente (experimento 5), nem alterações motoras detectáveis no modelo de ROTA-ROD (experimento 6).

A abolição das crises de PTZ pela peçonha bruta fervida de *P. bistriata* verificada em nossos experimento estão em relativa concordância com os dados

neuroquímicos descritos por FONTANA (1997). Talvez o aumento da disponibilidade de GABA na fenda sináptica (devido ao bloqueio da recaptação e estimulação da liberação deste neurotransmissor) tenha revertido o antagonismo dos receptores gabaérgicos pelo PTZ. Sabe-se que o receptor gabaérgico GABAA é, na verdade, um conjunto de subunidades proteicas transmembranais (denominadas α , β e γ), com ligantes específicos e complexas regulações alostéricas. O GABA liga-se à subunidade α , enquanto a β e as subunidades γ , são os locais de ligação de barbitúricos e benzodiazepínicos, respectivamente. Acredita-se que o PTZ atue principalmente na subunidade (X), ou seja, ele seria um antagonista não-competitivo do GABA. Esta informação anularia, a princípio, a hipótese levantada sobre o mecanismo de ação anticonvulsivante da peçonha de *P. bistrata*. No entanto, uma droga que acredita-se promover a liberação de GABA –a gabapentina- o que se assemelha muito aos resultados neuroquímicos obtidos por FONTANA (1997) com a peçonha de *P. bistrata*, bloqueia as crises clônicas induzidas pelo PTZ (MCNAMARA, 1996). Acreditamos que mais experimentos neuroquímicos e comportamentais são necessários para a confirmação desta hipótese.

Ao utilizarmos peçonha fervida, imaginamos estarmos trabalhando com o material relativamente deproteinizado. Após a fervura, observa-se a formação de precipitado branco, retirado com centrifugação, ao qual atribuímos tratar-se de proteínas denaturadas. No entanto, não podemos afirmar que todo o material proteico tenha sido retirado com a fervura. Utilizou-se esta estratégia com o intuito de se obter um indício da presença de componentes anticonvulsivantes não-proteicos como as acilpoliaminas, que sabe-se bloquearem convulsões em vários modelos experimentais.

Conclui-se, pelo efeito anticonvulsivante *in vivo* de peçonha fervida (relativamente deproteinizada), pela a ação paralisante da peçonha de *P. bistrata* em térmitas observada por nós em experimentos prévios (semelhante aos efeitos das APs isoladas) e pelo fato esta aranha pertencer à família *Araneidae*, que talvez a peçonha de *Parawixia bistrata* contenha componentes APs. Para verificação desta hipótese, é necessário isolamento bioquímico em CLAP, que já encontra-se em andamento.

6.CONCLUSÕES

- A peçonha bruta de *Parawixia bistrata*, quando injetada em altas doses no ventrículo lateral de ratos, ocasiona o surgimento de um quadro comportamental semelhante às crises límbicas descritas por RACINE (1972).
- A peçonha bruta fervida de *P. bistrata*, quando injetada i.c.v. em ratos, abole as crises agudas induzidas pela injeção i.p. de PTZ (80 mg/kg). Esta peçonha bruta pode, aparentemente, conter componentes pró-convulsivantes e anticonvulsivantes não-proteicos, como APs. O isolamento bioquímico, em futuras etapas desta pesquisa, pode contribuir para a caracterização de novas substâncias biologicamente ativas.
- A análise neuroetológica mostrou-se ser realmente importante no estudo das alterações comportamentais da peçonha de *P. bistrata* sobre o SNC do rato, permitindo a visualização das interações entre as mioclonias convulsivas límbicas e os outros comportamentos, dados não fornecidos pelas escalas de medição de intensidade das crises límbicas.

7.RESUMO

Durante a evolução, alguns animais desenvolveram toxinas que são capazes tanto de paralisar quanto de matar suas presas, através de ação seletiva sobre receptores ou canais iônicos. As acilpoliaminas, por exemplo, são componentes não-proteicos antagonistas dos receptores glutamatérgicos acoplados a canais iônicos, que mostraram-se anticonvulsivantes em diversos modelos animais.

Apesar do estudo das alterações comportamentais em animais após a injeção de substâncias químicas (etofarmacologia) ter auxiliado a estudar o mecanismo de ação destas substâncias no SNC, não há relatos sobre os efeitos comportamentais da injeção i.c.v. e i.v. da peçonha da aranha *Parawixia bistriata*. Descobriu-se recentemente na peçonha bruta da aranha *Parawixia bistriata* uma ação potencialmente anticonvulsivante *in vitro*: ela potencia a neurotransmissão gabaérgica e desloca receptores glutamatérgicos de seus sítios específicos em sinaptossomos do cérebro de rato (FONTANA, 1997). O objetivo do presente trabalho é estudar as alterações comportamentais causadas pela injeção central e periférica da peçonha bruta de *P. bistriata* através de uma metodologia quantitativa (método neuroetológico), e verificar se esta peçonha possui ação anticonvulsivante *in vivo* em um modelo químico de indução de crises agudas - o pentilenotetrazol (PTZ, 80 mg/kg, i.p.).

Os resultados mostram que a injeção i.c.v. da peçonha bruta origina nos ratos dois quadros comportamentais, identificados como crises convulsivas, denominados de crises graves e leves. Nas crises graves, observou-se, entre outros, mioclonias semelhantes às crises convulsivas límbicas descritas por Racine (1972). As crises leves são caracterizadas por tremores generalizados, e sacudidelas de corpo (*wet dog shakes*). A injeção da peçonha i.v. não origina crises nos animais mas, no entanto, causa um intenso aumento nas interações estatísticas das seqüências comportamentais, que lembram em muito as atividades de deslocamento. Tanto nas crises graves, leves, e na injeção i.v., a neuroetologia permitiu a visualização das interações entre as mioclonias convulsivas límbicas e os outros comportamentos, dados não fornecidos pelas escalas de medição de intensidade das crises límbicas.

Buscando indícios da presença de componentes anticonvulsivantes não-proteicos (como acilpoliaminas), injetou-se i.c.v. a peçonha de *P. bistriata* fervida (numa dose que não causa crises nem alteração motora *per se*), seguida da injeção i.p. de PTZ. Verificou-se que este tratamento abole as crises clônicas e tônicas induzidas por PTZ.

Conclui-se que a peçonha bruta de *P. bistriata* provavelmente possui componentes pró-convulsivantes com possível ação sobre o sistema límbico. Esta peçonha pode conter, também, componentes anticonvulsivantes não-proteicos, possivelmente acilpoliaminas.

8.SUMMARY

Spider venoms have high affinity and specificity for neuronal receptors, transporters and ion channels, therefore been important tools to characterize mammal and insect nervous system. However, behavioural alterations in mammals caused by injections of spider venoms have not been studied in detail. In this work we describe the rat behavioural alteration caused by central injection of the crude venom of the spider *Parawixia bistriata*, using a neuroethological methodology. There were seen two types of seizures, named mild and severe. Neuroethological flowcharts showed that in mild seizures, there was a strong statistical correlation (χ^2) between tremor followed by laying or by laying left, which indicates that the venom, perhaps, is difficulting central coordination of movements. In severe seizures, this effect is enworsed, with the animal falling. This type of seizure are similar to those described by Racine (1972).

Since the crude venom of *P. bistriata* showed a potencial anticonvulsant activity *in vitro*, we tested if it would indeed inhibit clonic and tonic convulsions induced by pentilenetetrazole (PTZ; 80 mg/kg, i.p.). Boiled crude venom of *P. bistriata* was i.c.v. injected, and 20 minutes later, animals (n=10) received PTZ. A control group (n=10) received only PTZ. The results were: central injection of the venom abolished clonic and tonic convulsions induced by PTZ, in 60% of the animals.

In conclusion, the crude spider venom of *P. bistriata*, centrally injected, causes central loss of movement coordination, and elicits limbic seizures similar to those described by Racine (1972), but, when boiled and injected in lower doses, it blocks clonic and tonic convulsions induced by PTZ (80 mg/kg).

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERS, G.W.; GOLDBERG, M.P.; CHOI, D.W. N-methyl-D-aspartate antagonists: ready for clinical trial in brain ischemia? **Ann. Neurol.** v.25, n.4, p.398-403, 1989.
- ARAMAKI, Y.; YASUHARA, T.; HIGASHIJIMA, T.; YOSHIOKA, M.; MIWA, A.; KAWAI, N.; NAKAJIMA, T. Chemical characterization of spider toxin, JSTX and NSTX. **Proc. Jpn. Acad. Ser.** v. B62, p. 359-362, 1986.
- BATEMAN, A.; BODEN, P.; DELL, A.; DUCE, I.R.; QUICKE, D.L.J.; USHERWOOD, P.N.R. Postsynaptic block of a glutamatergic synapse by low molecular weight fractions of spider venom. **Brain Res.** v. 339, n. 2, p. 237-244, 1985.
- BERTRAM, E.H.; WILLIAMSON, J.M.; CORNETT, J.F.; SPRADLIN, S.; CHEN, Z.F. Design and construction of a long-term continuous video-EEG monitoring unit for simultaneous recording of multiple small animals. **Brain Res. Brain Res. Protoc.** v. 2, p. 85-97, 1997.
- BLOOMQUIST, J.R.; KINNE, L. P.; DEUTTSCH, V.; SIMPSON, S. F. Mode of action of an insecticidal peptide toxin from the venom of a weaving spider (*Diguetia canities*). **Toxicon.** v. 34, n. 9, p. 1072-1075, 1996.
- BRACKLEY, P.T.H.; BELL, D.R.; CHOI, S.K.; NAKANISHI, K.; USHERWOOD, P.N.R. Selective antagonism of native and cloned kainate and NMDA receptors by polyamine-containing toxins. **J. Pharm. Exp. Ther.** v. 266, p.1573-1580, 1993.
- BRADFORD, H.F. Glutamate, GABA and epilepsy. **Prog. Neurobiol.** v. 47, p.477-511, 1995.
- BUDD, T.; CLINTON, P.; DELL, A.; DUCE, I.R.; JOHNSON, S.J.; QUICKE, D.L.J.; TAYLOR, G.W.; USHERWOOD, P.N.R.; USOH, G. Isolation and characterisation of glutamate receptor antagonists from venoms of orb-web spiders. **Brain Res.** v. 448, p. 30-39, 1988.
- CAIRRÃO, M.A.R; SANTOS, W.F.; COLUSSO, A.J.; GARCIA-CAIRASCO, N. Estudo do efeito comportamental da administração intracerebroventricular da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* (ARANEIDAE, ARANEAE) em ratos Wistar. In XIII REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, Caxambu/MG, 1997. **Programa e resumos.** Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 1997, p. 307.
- CARVALHO, F.F.; NENCIONI, A.L.; LEBRUN, I.; SANDOVAL, M.R.; DORCE, V.A.. Behavioral, electroencephalographic, and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Pharmacol Biochem Behav** v.60, n.1, p. 7-14, 1998.
- CASTRO, M.A.T. **Análise neuroetológica de ratos Wistar e bioensaios em insetos injetados com a peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*.** Ribeirão Preto, 1998. 54p. Monografia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- CHOI, D.W. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. **Trends in Neurosci.** v. 11, p. 465-469, 1988a.
- CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron.** v. 1, p. 623-634, 1988b.
- CHOI, D.W. Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. **J. Neurosci.** v.10, n.8, p.2493-2501, 1990.
- CHOI, D.W.; ROTHMAN, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Ann. Rev. Neurosci.** v.13, p.171-182, 1990.
- DEBIN, J. A.; STRICHARTZ, G. R. Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. **Toxicon.** v. 29, n. 11, p. 1403-1408, 1991.
- DEBIN, J.A.; MAGGIO, J.E.; STRICHARTZ, G.R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. **Am J Physiol.** v. 64, n. Pt 1, p. C361-C369, 1993.
- DINGLEDINE, R.; MCBAIN, C.J.; MCNAMARA, J.O. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. **Trends Pharmacol. Sci.** v.11, n.8, p.334-338, 1990.
- DONEVAN, S.D.; ROGAWSKI, M.A. Multiple actions of arylalkilamine arthropod toxins on the N-methyl-D-aspartate receptor. **Neuroscience** v.70, n.2, p.361-375, 1996.

- DORANDEU, F.; WETHERELL, J.; PERNOT MARINO, I.; TATTERSALL, J.E.; FOSBRAEY, P.; LALLEMENT, G. Effects of excitatory amino acid antagonists on dendrotoxin-induced increases in neurotransmitter release and epileptiform bursting in rat hippocampus in vitro. **J Neurosci Res.** v. 48, n. 6, p. 499-605, 1997.
- DUFFIELD, P.H.; DUFFIELD, A.M.; CARROLL, P.R.; MORANS, D. Analysis of the venom of the Sydney funnel-web spider, *Atrax robustus* using gas chromatography mass spectrometry. **Biomed. Mass. Spectrom.** V.6, p.105-108, 1979.
- ELDEFRAWI, A.T.; ELDEFRAWI, M.E.; KONNO, K.; MANSOUR, N.A.; NAKANISHI, K.; OLTZ, E.; USHERWOOD, P.N.R. Structure and synthesis of a potent glutamate receptor antagonist in wasp venom. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.85, p. 4910-4913, 1988.
- EISENBRANDT, D.L.; ALLEN, S.L.; BERRY, P.H.; CLASSEN, W.; BURY, D.; MELLERT, W.; MILLISCHER, R.J.; SCHUH, W.; BONTINK, W.J. Evaluation of the neurotoxic potential of chemicals in animals. **Fd. Chem. Toxic.** v.32, n.7, p.655-669, 1994.
- FONTANA, A.C.K. **Caracterização química e biológica parcial da peçonha da aranha *Parawixia bistrata*.** Ribeirão Preto, 1997. 118p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- FOWLER, H.G. Phylogenetic inertia and the limits of evolution of social behavior in spiders. **Ciência e Cultura** v.45, n.2, p.148-150, 1993.
- FUJITA, T.; ITAGAKI, Y.; NAOKI, H.; NAKAJIMA, T. Structural characterization of glutamatergic blocker spider toxins by high energy collision charge remote fragmentations. **Rap. Commun. Mass Spectrom.** v. 9, p.365-371, 1995.
- FURTADO, M. A. **Análise neuroetológica quantitativa das fases aguda e crônica das crises límbicas induzidas por pilocarpina em ratos Wistar.** Ribeirão Preto, 1996. 50p. Monografia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- GARCIA-CAIRASCO, N. **Análise neuroetológica e quantitativa de mecanismos neurais envolvidos nas convulsões audiogênicas no rato albino.** Ribeirão Preto, 1982. 169p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; SABBATINI, R.M. Role of the substantia nigra in audiogenic seizures: a neuroethological analysis in the rat. **Braz J Med Biol Res.** v. 16, n.2, p.171-183, 1983.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M.C.; PRADO, P.R.; JORGE, B.P.D.; TERRA, V.C.; OLIVEIRA, J.A.C. New insights into behavioral evaluation of audiogenic seizures: comparison of two ethological methods. **Behav. Brain Res.** v. 48, p.49-56, 1992.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; WAKAMATSU, H.; BUENO, S.T.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; OLIVEIRA, J.A.C. Behavioral evaluation of audiogenic kindling and amygdala kindling in Wistar audiogenic rats. **Soc. Neurosci. Abstr.** v. 19, p.1468, 1993.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; WAKAMATSU, H.; OLIVEIRA, J.A.C.; GOMES, E.L.T.; Del Bel, E.A.; MELLO, L.E.A.M. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Res.** v.26, n.1, p.177-192, 1996.
- GOBBI, N.; ZUCCHI, R.; SAKAGAMI, S.F. General behavioral patterns and life-cycle of the colonial spider, *ERIOPHORA BISTRATA* (Araneida:Argiopidae). **Bolm. Zool. Univ. S. Paulo.** v.4, p.65-74, 1979.
- GODDARD, G.V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature.** v. 214, p. 1020-1021, 1967.
- GREENAMYRE, J.T. The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease. **Arch. Neurol.** v.43, n.10, p.1058-1063, 1986.
- GREEN, A.C.; NAKANISHI, K.; USHERWOOD, P.N.R. Polyamine amides are neuroprotective in cerebellar granule cell cultures challenged with excitatory amino acids. **Brain Res.** v.717, p.135-146, 1996.
- GRISAR, T.; LAKAYE, B.; THOMAS, E. Molecular basis of neuronal biorythms and paroxysms. **Arch. Physiol. Biochem.** v. 104, n.6, p. 770-774, 1996.

- GRISHIN, E.V.; VOLKOVA, T.M.; ARSENIYEV, A.S.; RESHETOVA, O.S.; ONOPRIENKO, V.V.; MAGAZANIK, L.G.; ANTONOV, S.M.; FEDOROVA, I.M. Structure-functional characterization of argiopine: an ion channel blocker from the venom of spider *Argiope lobata*. **Bioorg. Khim.** v. 12, p.1121-1124, 1986.
- GRISHIN, E.V.; VOLKOVA, T.M.; ARSENIYEV, A.S.; Isolation and structure analysis of components from venom of the spider *Argiope lobata*. **Toxicon.** v. 27, n. 5, p.541-549, 1989.
- GULLAK, M.F.; PAGNOZZI, M.J.; RICHTER, K.E.; MENA, E.E. Effects of polyamine spider venom components of [3H]GLU and [3H]GLY binding to rat CNS membranes. **Soc. Neurosci. Abstr.** v.15, p.463, 1989.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.** v. 48, p. 422-477, 1972.
- HISADA, M.; FUJITA, T.; NAOKI, H.; ITAGAKI, Y.; IRIE, H.; MIYASHITA, M.; NAKAJIMA, T. Structures of spider toxins: hydroxyindole-3-acetylpolyamines and a new generalized structure of type-E compounds obtained from the venom of the Joro spider, *Nephila clavata*. **Toxicon.** v. 36, n.8, p.1115-1125, 1998.
- HIMI, T.; SAITO, H. Joro spider toxin (JSTX-3) and its analogue, 1-Naphtylacetylspermin (NpAc), inhibit glutamate toxicity on mice brain *in vivo* and *in vitro*. **Eur. J. Pharmacol.** v.183, p.474, 1990.
- HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annu. Rev. Neurosci.** v.17, p.31-108, 1994.
- ITAGAKI, Z.; Characterization of spider venom by mass spectrometry, construction of analytical system. **Yakugaku Zasshi.** v. 117, n. 10-11, p. 715-728, 1997.
- ITAGAKI, Z.; FUJITA, T.; NAOKI, H.; YASUHARA, T.; ADRIANTSIFERANA, T.; NAKAJIMA, T. Detection of new spider toxins from a *Nephilengys borbonica* gland using on-line μ -column HPLC continuous flow (Frit) FAB LC/MS and MS/MS. **Nat. Toxins.** v. 5, p. 1-13, 1997.
- JACKSON, H.; PARKS, T.N. Suppression of chemically-induced behavioral seizures in rats by a novel spider toxin. **Soc. Neurosci. Abstr.** v.13, p.1078, 1987.
- JACKSON, H.; PARKS, T.N. Anticonvulsant action of an arylamine-containing fraction from *Agelenopsis* spider venom. **Brain Res.** v.526, n.2, p.338-341, 1990.
- KAISER, I.I.; GRIFFIN, P.R.; AIRD, S.D.; HUDIBURG, S.; SHABANOWITZ, J.; FRANCIS, B.; JOHN, T.R.; HUNT, D.F.; ODELL, G.V. Primary structures of two proteins from the venom of the mexican red knee tarantula (*Brachypelma smithii*). **Toxicon.** v. 32, n. 9, p.1083-1093, 1994.
- KANDEL, E.R. Brain and behavior. In KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H. (eds.) **Principles of Neural Science**, 2.ed., New York, Academic Press, 1985. Cap.1, p. 3-12.
- KAWAI, N.; NIWA, A.; ABE, T. Spider venom contains specific receptor blocker of glutaminergic synapses. **Brain Res.** v.247, n.1, p.169-171, 1982.
- KOH, J.Y.; CHOI, D.W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. **J. Neurosci. Methods.** v. 20, n. 1, p. 83-90, 1987.
- KRSIAK, M. Ethopharmacology: a historical perspective. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v.15, p. 439-445, 1991.
- LEVI, H.W. Spiders of the orb-weaver genus *Parawixia* in America (Araneae: Araneidae). **Bull. Mus. Comp. Zool.** v.153, n.1, p.1-46, 1993.
- LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **Eur. J. Pharmacol.** v.342, n.1, p. 1-13, 1998.
- LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res.** v. 2, p. 145-181, 1988.

- LOWRY, O.H.; ROSENBROUCH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.
- MCCORMICK, K.D.; MEINWALD, J. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. **J. Chem. Ecology** v.19, n.10, p.2411-2451, 1993.
- MCNAMARA, J.O. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In Hardman, J.G.; Limbird, Lee E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W., Goodman, A.G. (eds.) **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**, 9.ed., New York, McGraw-Hill, 1996. Cap.20, p. 461-486.
- MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. **Trends Pharmacol. Sci.** v.11, n.9, p.379-387, 1990.
- MILJANICH, G.P. Venom peptides as human pharmaceuticals. **Science & Medicine**, p. 6-15, 1997.
- MOE, S.T.; SMITH, D.L.; CHIEN, Y.E.; RASZKIEWICZ, J.L.; ARTMAN, L.D.; MUELLER, A.L. Design, synthesis and biological evaluation of spider toxin (argiotoxin-636) analogs as NMDA receptor antagonists. **Pharm. Res.** V. 15, n.1, p.31-38, 1998.
- MONAGHAN, D.T.; BRIDGES, R.J.; COTMAN, C.W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v.29, p.365-402, 1989.
- NADLER, J.V. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. **Life Sci.** v. 29, p. 2031-2042, 1981.
- NIELSEN, E.B.; SUZDAK, P.D.; ANDERSEN, K.E.; KNUTSEN, L.J.; SONNEWALD, U.; BRAESTRUP, C. Characterization of tiagabine (NO-328), a new potent and selective GABA uptake inhibitor. **Eur. J. Pharmacol.** v. 196, n. 3, p. 257-266, 1991.
- PALMA, M.S.; ITAGAKI, Y.; FUJITA, T.; NAOKI, H.; NAKAJIMA, T. Structural characterization of a new acylpolyaminetoxin from the venom of Brazilian garden spider *Nephilengys cruentata*. **Toxicon.** v.36, n.3, p.485-493, 1998.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 2.ed., California, Academic Press, 1986.
- PIEK, T. δ -philanthotoxin, a semi-irreversible blocker of ion-channels. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 72C, p. 311-315, 1982.
- PINEL, J.P.; ROVNER, L.I. Experimental epileptogenesis; kindling-induced epilepsy in rats. **Exp. Neurol.** v. 58, n. 2, p. 190-202, 1978.
- PRINCE, D.A.; CONNORS, B.W. Mechanisms of interictal epileptogenesis. **Adv. Neurol.** v.44, p.275-299, 1986.
- QUISTAD, G.B.; REUTER, C.C.; SKINNER, W.A.; DENNIS, P.A.; SUWANRUMPHA, S.; FU, E.W. Paralytic and insecticidal toxins from the funnel web spider, *Hololena curta*. **Toxicon.** v. 29, n. 3, p. 329-336, 1991.
- RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II, motor seizure. **Electroencephal. Clin. Neurophysiol.** v. 32, p.281-294, 1972.
- RADITSCH, M.; GEYER, M.; KALBITZER, H.R.; JAHN, W.; RUPPERSBERG, J.P.; WITZEMANN, V. Polyamine spider toxins and mammalian N-methyl-D-aspartate receptors. Structural basis for channel blocking and binding of argiotoxin636. **Eur. J. Biochem.** v.240, p. 416-426, 1996.
- RAGSDALE, D.; GANT, D.B.; ANIS, N.A.; ELDEFRAWI, A.T.; ELDEFRAWI, M.E.; KONNO, K.; MILEDI, R. **J. Pharmac. Exp. Ther.** v. 251, p. 156-163, 1989.
- REYNOLDS, I.J. The spider toxin argiotoxin636 binds to a Mg^{2+} site on the N-methyl-D-aspartate receptor complex. **Br. J. Pharmacol.** v. 103, n. 2, p. 1373-1376, 1991.
- RIBEIRO, A.M. **Atividade biológica e purificação parcial de alguns componentes do veneno da aranha *Scaptosa raptoria***. Ribeirão Preto, 1996. 79p. Monografia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

- RUSSELL, F.E. Toxic effects of animal toxins. In: Klassen, C.D., ed. Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons.: Ed. McGraw-Hill, New York, 1996. P. 801-839.
- SANDOVAL, M.R.L.; DORCE, V.A.C. Behavioural and electroencephalographic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Toxicon**. v. 31, n. 2, p. 205-212, 1993.
- SANGUINETTI, M.C.; JOHNSON, J.H.; HAMMERLAND, L.G.; KELBAUGH, P.R.; VOLKMANN, R.A.; SACCOMANO, N.A.; MUELLER, A.L. Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. **Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.** v.51, p.491-498, 1997.
- SAVARIN, P.; GUENNEUGUES, M.; GILQUIN, B.; LAMTHANH, H.; GASPARINI, S.; ZINNJUSTIN, S.; MENEZ, A. Three-dimensional structure of kappa-conotoxin PVIIA, a novel potassium channel-blocking toxin from cone snails. **Biochemistry**. v. 37, p. 5407-5416, 1998.
- SCOTT, R.H.; SUTTON, K.G.; DOLPHIN, A.C. Interactions of polyamines with neuronal ion channels. **Trends Neurosci.** v.16, n.4, p.153-160, 1993.
- SCHMIDT-KASTNER, R.; FREUND, T. F.; Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience** v.40, n.3, p.599-636, 1991.
- SCHWARTZKROIN, P.A.; WYLER, A.R. Mechanisms underlying epileptiform burst discharge, **Ann Neurol.** v.7, N.2, p.95-107, 1980.
- SEYMOUR, P.A. ; MENA, E.E. *In vivo* NMDA antagonist activity of the polyamine spider venom component, argitoxin-636. **Soc. Neurosci. Abstr.** v.15, p.463, 1989.
- SHRINER, R.L.; FUSON, R.C.; CURTIN, D.Y.; MORRIL, T.C. Identificação e sistemática dos compostos orgânicos. Manual de laboratório. Traduzido por Horácio Macedo. Sexta edição. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983. 520 páginas.
- SILVERMAN, P. **Animal behaviour in the laboratory**, London, Chapman and Hall, 1978.
- SKINNER, W.S.; DENNIS, P.A.; LUI, A.; CARNEY, R.L.; QUISTAD, G.B. Chemical characterization of acylpolyamine toxins from venom of a trap-door spider and two tarantulas. **Toxicon**. v. 28, n.5, p. 541-546, 1990.
- STANDAERT, D.G.; YOUNG, A.B. Treatment of central nervous system degenerative disorders. In Hardman, J.G.; Limbird, Lee E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W., Goodman, A.G. (eds.) **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**, 9.ed., New York, McGraw-Hill, 1996. Cap.22, p. 503-519.
- TAKAZAWA, A.; YAMAZAKI, O.; KANAI, H.; ISHIDA, N.; KATO, N.; YAMAUCHI, T. Potent and long-lasting anticonvulsant effects of 1-naphthylacetyl spermine, an analogue of Joro spider toxin, against amygdaloid kindled seizures in rats. **Brain Res.** v.706, n.1, p.173-176, 1996.
- TERRA, V.C.;GARCIA-CAIRASCO, N. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. II Effects of nigral clobazam microinjections. **Behav. Brain. Res.** v. 52, n.1, p. 19-28, 1992.
- TERRA, V.C.;GARCIA-CAIRASCO, N. NMDA-dependent audiogenic seizures are differentially regulated by inferior colliculus subnuclei. **Behav. Brain. Res.** v. 62, n.1, p. 29-39, 1994.
- TURSKI, W.A. ; CAVALHEIRO, E. A.; BORTOLOTO, Z.A.; MORAES MELLO, L.E.A. ; SCHWARZ, M.; TURSKI, L. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res.** v. 321, p. 237-253, 1984.
- UCHITEL, O. D. Toxins affecting calcium channel in neurons. **Toxicon**. v.35, n.8, p. 1161-1191, 1997.
- USHERWOOD, P.N. Insect glutamate receptors. **Adv. Insect Physiol.** v.24, p.309-341, 1994.
- USERWOOD, P.N.; BLAGBROUGH, I.S. Spider toxins affecting glutamate receptors: polyamines in therapeutic neurochemistry. **Pharmacol Ther.** v.52, n.2, p.245-248, 1991.

- VELLUTI, J.C.; CAPUTI, A.; MACADAR, O. Limbic epilepsy induced in the rat by dendrotoxin, a polypeptide isolated from the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*) venom. **Toxicon**. v. 25, n. 6, p. 649-657, 1987.
- YOSHIOKA, M. Diversity of joro spider toxins. **Yakugaku Zasshi**. v. 117, n. 10-11, p.700-714, 1997.
- YOUNG, A .B.; GREENAMYRE, J.T.; HOLLINGSWORTH, Z.; ALBIN, R.; D'AMATO, C.; SHOULSON, I.; PENNEY, J.B. NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. **Science** v.241, p.981-983, 1988.
- WAKAMATSU, H.; BUENO, S.T.B.; OLIVEIRA, J.A.C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Análise neuroetológica do desenvolvimento de kindling audiogênico em ratos Wistar. **J. Liga Bras. Epilepsia**. v.7, n.3, p.83-93, 1994.
- WASHBURN, M.S.; DINGLEDINE, R. Block of alpha - amino - 3 - hydroxy - 5 - methyl - 4 - isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by polyamines and polyamine toxins. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.278, n.2, p.669-678, 1996.
- WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HONORE, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. **Trends Pharmacol. Sci.** v.11, n.1, p.25-33, 1990.
- WILLIAMS, K. Effects of *Agelenopsis aperta* toxins on the N-methyl-D-aspartate receptors: **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 266, 231-236, 1993
- WU, C.F.; TSAI, M.C.; CHEN, M.L.; ZHONG, Y.; SINGH, S.; LEE, C.Y. Actions of dendrotoxin on K⁺ channels and neuromuscular transmission in *Drosophila melanogaster*, and its effects in synergy with K⁺ channel-specific drugs and mutations. **J Exp Biol**. v. 147, p. 21-41, 1989.
- ZLOTKIN, E. Insect selective toxins derived from scorpion venoms: na approach to insect neuropharmacology. **Insect Biochem**. v. 13, n.3, p. 219-236, 1983.

ANEXO

Relacionam-se abaixo as descrições comportamentais utilizadas neste trabalho, adaptadas de GARCIA-CAIRASCO (1982), SILVERMAN (1978) e FURTADO (1996).

PARADO (PR)

O animal fica totalmente imóvel, com as quatro patas apoiadas no solo e em posição supina, sem se dirigir a parte alguma da arena, com ausência de alterações musculares aparentes.

DEITAR (DEI)

Posição em decúbito ventral ou lateral, com o lado inferior do corpo em contato com o solo. Os comportamentos DEID e DEIE são definidos para o animal igualmente deitado, mas em decúbito lateral.

CAMINHAR (CM)

Locomoção em marcha para a frente movendo alternativamente os membros, num movimento quadrúpede. Extensão da pata anterior ipsilateral e flexão da pata posterior ipsilateral, acompanhado de uma extensão da pata posterior contralateral e uma flexão da pata anterior contralateral.

CHEIRAR EXPLORATÓRIO (CHP)

Cheirar objetos do ambiente. Aproximação do focinho a um objeto, fazendo movimentos rápidos e curtos de cheirar, afastando e aproximando as narinas.

ESQUADRINHAR (SQ)

O animal estende o pescoço levantando a cabeça no ar, fazendo movimentos latero-laterais da cabeça., possivelmente para investigação visual do ambiente. Considerou-se como também pertencente ao esquadrihar os rápidos movimentos de cheirar, realizados durante levantamento da cabeça.

COÇAR LADO ESQUERDO DO CORPO (CCE)

Esfregar repetidamente as garras das patas traseiras ou dianteiras sobre a pele do lado esquerdo do corpo, em uma série de movimentos rápidos, bruscos e curtos. Analogamente, denomina-se CCD quando o movimento é feito do lado direito do corpo.

LAVAR CABEÇA (LCB)

Movimentos direcionados à cabeça através da compressão lateral dos membros anteriores (esfregando repetitivamente a região entre a orelha e focinho), ou coçar a cabeça com as patas posteriores.

LIMPAR GARRAS DA PATA POSTERIOR ESQUERDA (LGE2)

O animal faz uma torção do tronco com flexão ipsilateral do pescoço, em direção ao lado esquerdo do corpo, e mordisca as garras da pata posterior ipsilateral. Movimento análogo dá-se para LGD2, onde o animal flete a cabeça para o lado direito do corpo.

LAVAR FOCINHO (LVF)

O animal comprime lateralmente o focinho com os membros anteriores, esfregando-o com movimentos rápidos.

AUTO-LIMPEZA DOS GENITAIS (ALG)

Lambe e mordisca o pênis e testículos, geralmente em posição de ventro-flexão

LIMPAR GARRAS FRONTAL (LG)

O animal, geralmente em posição supina, apoiado sobre os quartos traseiros, mordisca e lambe as garras dos membros anteriores.

POSTURA ERETA (ER)

Apoiado nas patas posteriores, o animal eleva as patas anteriores em relação ao nível do solo, podendo apoiar-se ou não na arena de acrílico. O animal pode estar imóvel, ou fazendo movimentos latero-laterais do tronco.

HIPEREXTENSÃO DA PATA POSTERIOR ESQUERDA (HP2E)

Grande extensão da pata posterior esquerda e digital.

ALARGAMENTO DE BASE (BL)

Grande abertura das patas posteriores. O animal flete o tronco em direção ao solo, provavelmente controlando seu centro de gravidade.

MIOCLONIA DE PATAS POSTERIORES (MIO2)

Movimentos repetidos de flexão e extensão da pata posterior, de caráter violento e geralmente ritmado. Observou-se este comportamento apenas em uma das patas traseiras de cada vez (convulsão clônica assíncrona).

MIOCLONIAS DE CABEÇA E PESCOÇO (MIOC)

Movimentos repetidos de flexão e extensão da cabeça, de caráter violento e geralmente ritmado. Corresponde a classe 2 límbica (tabela4).

MIOCLONIA DAS PATAS ANTERIORES (MIO1)

Movimentos repetidos de flexão e extensão da (s) pata (s) anteriores, de caráter violento e geralmente ritmado. Corresponde a classe 3 límbica (tabela 4). Considerou-se dentro desta classificação quando ambas as patas anteriores apresentavam mioclonias ao mesmo tempo (convulsões clônicas síncronas), ou quando apenas uma apresentava a mioclonia (convulsão clônica assíncrona).

ELEVAÇÃO- CLASSE 4 LÍMBICA (ELE)

Elevação das patas anteriores em relação ao nível do solo. Caracteriza a crise classe 4 límbica (tabela 4). Diferencia-se comportamentalmente do ERE devido a presença de mioclonias das patas anteriores. Geralmente o animal não se apoia na arena durante a ELE.

QUEDA LÍMBICA (QUED)

Perda de postura do animal, geralmente visto após ELE. Corresponde a classe 5 límbica (tabela 4). Três ou mais de quedas sucessivas corresponde a classe 6 (tabela 4).

SACUDIDELA DE CORPO (WDS)

O animal, geralmente ereto, executa movimentos rápidos de rotação lateral do tronco e cabeça.