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

HELENE APARECIDA FACHIM

**Estudo da expressão das subunidades GluR1 e GluR2 no
hipocampo de ratos após lesão por NMDA e avaliação do
efeito neuroprotetor da Parawixina 10.**

Ribeirão Preto

2013

HELENE APARECIDA FACHIM

Estudo da expressão das subunidades GluR1 e GluR2 no hipocampo de ratos após lesão por NMDA e avaliação do efeito neuroprotetor da Parawixina 10.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia

Orientador: Wagner Ferreira dos Santos

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Luiza Nunes Mamede Rosa

Ribeirão Preto

2013

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

Fachim, Helene Aparecida

Estudo da expressão das subunidades GluR1 e GluR2 no hipocampo de ratos após lesão por NMDA e avaliação do efeito neuroprotetor da Parawixina 10.

90 p. : il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Psicobiologia.

Orientador: Santos, Wagner Ferreira.

Co-orientadora: Rosa, Maria Luiza Nunes Mamede.

1. Glutamato. 2. Excitotoxicidade. 3. Hipocampo. 4. Receptores AMPA 5. Memória espacial. 6. Labirinto aquático de Morris. 7. *Parawixia bistrata*.

Capa: *Marcação imunofluorescente de células gliais – GFAP (verde) no subcampo CA1 de ratos submetidos à injeção de NMDA após 1 semana. Núcleos celulares marcados com DAPI (azul).*

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Maria Luiza Nunes Mamede Rosa, primeiramente pela orientação, mas principalmente pela dedicação, paciência e amizade, pelas valiosas horas de discussões e ensinamentos, pelo incentivo e perseverança. Por acreditar em mim. Sem seu apoio esse trabalho não existiria.

Ao Prof.Dr. Wagner Ferreira dos Santos, também pela orientação, pelos anos de convivência e amizade no Lab. de Neurobiologia e Peçonhas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, aos Professores e à Universidade de São Paulo, pela oportunidade e o ensino. Especialmente, agradeço a secretária, Renata, pela ajuda, paciência e compreensão.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Fundação Padre Albino pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, pelas correções e sugestões dos relatórios ao longo desses quatro anos.

A todos os amigos do lab, aos que passaram por lá e aos que ainda continuam e compartilham o dia a dia, os sucessos e fracassos nos experimentos, as angústias e conquistas: Drica, Marceli, Bruninha, Marcela, Lucas, Zé, Lívea e Albert.

As amigas e técnicas Thalita e Melina, pelo apoio, disposição, ensinamentos e amizade.

Aos técnicos da Odonto, Fabíola, Roger e Adriana, pela ajuda e insistência com os experimentos de caracterização das IL-s e imunofluorescência.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luis Rosa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por disponibilizar seu laboratório.

Aos queridos amigos que conquistei desde que cheguei em Ribeirão, Rafa e Lucas, pela grande amizade, discussões e ensinamentos, trocas de experiência, por estarem sempre presentes em minha vida e me apoiarem.

As minha amigas e irmãs da vida toda, por estarem presentes mesmo de longe e me apoiarem sempre: Má Phelippe, Aline, Eliza, Má Biselli, Ane, Ana Cláudia e Carol.

Aos meus amados pais João e Haymê, minha irmã Helô e minha princesa Julia, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim e me incentivarem sempre, mesmo sem entender muito bem a carreira que escolhi seguir.

Á todos aqueles que de alguma forma contribuíram e participaram desse trabalho e que não foram aqui citados, meu muito obrigada!

“Acontece com as pessoas. Não sei se vivemos para ser felizes, sei que não vivemos sem aprender, e que quando deixamos de fazê-lo estamos mortos, ainda que continuemos caminhando”.

Ivan Izquierdo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 Neurotransmissão Glutamatérgica	17
1.2 Neurotoxicidade Glutamatérgica	20
1.3 Importância das neurotoxinas no estudo da neurociência	22
2 OBJETIVOS GERAIS	24

Capítulo I - Avaliação histológica e funcional da lesão induzida por NMDA

1 Hipocampo e Memória	25
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Animais	28
3.2 Cirurgia e injeção intraipocampal de NMDA	28
3.3 Labirinto aquático de Morris	29
3.4 Perfusão e processamento do tecido cerebral	31
3.5 Coloração de Nissl	31
3.6 Quantificação dos neurônios	32
3.7 Análise Estatística	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Labirinto Aquático de Morris	34
4.2 Avaliação histológica da lesão hipocampal	36
5 DISCUSSÃO	41

Capítulo II - Alteração na expressão das subunidades dos receptores AMPA e na arquitetura celular do CA1

1 Os receptores AMPA	45
2 OBJETIVOS	49
3 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 Cirurgia e injeção intraipocampal de NMDA	50
3.2 Perfusão do tecido cerebral	50
3.3 Imunoistoquímica	51

3.4 Imunofluorescência	52
3.5 Análise Estatística	54
4 RESULTADOS	56
4.1 Expressão das subunidades GluR1 e GluR2 no hipocampo	56
4.1.1 Expressão da subunidade GluR1	56
4.1.2 Expressão da subunidade GluR2	64
4.2 Expressão de GFAP e NeuN no hipocampo	72
5 DISCUSSÃO	78

Capítulo III - Avaliação da atividade neuroprotetora da Parawixina 10 no modelo de lesão excitotóxica por NMDA em ratos Wistar

1 A aranha <i>Parawixia bistriata</i> (Araneidae: Araneae)	88
2 OBJETIVO	91
3 MATERIAL E MÉTODOS	92
2.1 Cirurgia, injeção intraipocampal de NMDA e tratamento com a Pwx 10	92
3 RESULTADOS	90
3.1 Avaliação histológica após o tratamento com Pwx 10	94
4 DISCUSSÃO	98
5 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Neurotransmissão Glutamatérgica	20
--	----

Capítulo I

Figura 1. Labirinto aquático de Morris	29
---	----

Figura 2. Sequência das etapas experimentais realizadas para a avaliação comportamental e histológica da lesão hipocampal induzida pela microinjeção de NMDA.	32
---	----

Figura 3. Latências de escape dos grupos controle e lesados avaliados nos 4 dias de treinamento no Labirinto Aquático de Morris	34
--	----

Figura 4. Tempo de permanência dos animais controle e lesados no quadrante alvo do LAM durante a sessão de teste após a retirada da plataforma	35
---	----

Figura 5. Secções do hipocampo dorsal submetidas à coloração de Nissl	36
--	----

Figura 6. Coloração de Nissl nos subcampos CA1, CA3 e HGD	37
--	----

Figura 7. Número de neurônios no subcampo CA1 do hipocampo nos grupos controle e NMDA 2 e 4 semanas	38
--	----

Figura 8. Número de neurônios no subcampo CA3 do hipocampo nos grupos controle e NMDA 2 e 4 semanas	38
--	----

Figura 9. Número de neurônios no HGD do hipocampo nos grupos controle e NMDA 2 e 4 semanas	39
---	----

Capítulo II

Figura 1. Sequência das etapas experimentais realizadas para o estudo da expressão de receptores AMPA, GFAP e NeuN no hipocampo após a lesão induzida pela microinjeção de NMDA	52
--	----

Figura 2. Expressão GluR1-IC no subcampo CA1	55
---	----

Figura 3. Expressão GluR1-IC no subcampo CA3	56
---	----

Figura 4. Expressão GluR1-IC no HGD	57
--	----

Figura 5. A) Número de GluR1-IC; B) Densidade óptica, ambos em CA1 nos animais que receberam salina (controle) ou NMDA em todos os períodos pós lesão analisados (24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas)	59
---	----

Figura 6. A) Número de GluR1-IC; B) Densidade óptica, ambos em CA3 nos animais que receberam salina (controle) ou NMDA em todos os períodos pós lesão analisados (24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas)	60
---	----

Figura 7. Número de GluR1-IC no HGD nos animais que receberam salina (controle) ou NMDA em todos os períodos pós lesão analisados (24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas)	61
Figura 8. Expressão de GluR2-IC no subcampo CA1	63
Figura 9. Expressão de GluR2-IC no subcampo CA3	64
Figura 10. Expressão de GluR2-IC no HGD	65
Figura 11. A) Número de GluR2-IC; B) Densidade óptica, ambos em CA1 nos animais que receberam salina (controle) ou NMDA em todos os períodos pós lesão analisados (24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas)	67
Figura 12. A) Número de GluR2-IC; B) Densidade óptica, ambos em CA3 nos animais que receberam salina (controle) ou NMDA em todos os períodos pós lesão analisados (24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas)	68
Figura 13. Número de GluR2-IC no HGD nos animais que receberam salina (controle) ou NMDA em todos os períodos pós lesão analisados (24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas)	68
Figura 14. Omissão dos Ac 1º GluR1(A) e GluR2 (B)	69
Figura 15. Ativação da astroglia nos grupos controle e após injeção de NMDA demonstrada pela imunofluorescência para GFAP	70
Figura 16. Expressão de neurônios maduros nos grupos controle e após injeção de NMDA demonstrada pela imunofluorescência para NeuN	71
Figura 17. Área que recebeu a injeção de NMDA (grupo NMDA 1 semana)	72
Figura 18. Área que recebeu a injeção de NNDA (grupo NMDA 4 semanas)	73

Capítulo III

Figura 1. Sequência das etapas experimentais realizadas para a avaliação da atividade neuroprotetora da Pwx 10	93
Figura 2. Coloração de Nissl nos subcampos CA1, CA3 e HGD nos grupos: Salina 1 semana, NMDA 1 semana, Pwx 10 24 horas e Pwx 10 1 hora	94
Figura 3. Número de neurônios no subcampo CA1 nos grupos: Salina 1 semana, NMDA 1 semana, Pwx 10 24 horas e Pwx 10 1 hora	96
Figura 4. Número de neurônios no subcampo CA3 nos grupos: Salina 1 semana, NMDA 1 semana, Pwx 10 24 horas e Pwx 10 1 hora	97
Figura 5. Número de neurônios no HGD nos grupos: Salina 1 semana, NMDA 1 semana, Pwx 10 24 horas e Pwx 10 1 hora	97

LISTA DE SIGLAS

SNC	Sistema nervoso central
mGluRs	Receptores metabotrópicos de glutamato
iGluRs	Receptores ionotrópicos de glutamato
NMDA	N-metil-D-aspartato
AMPA	ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico
KA	cainato ou ácido caínico
NMDARs	Receptores do tipo NMDA
AMPARs	Receptores do tipo AMPA
EAATs	Transportadores de aminoácidos excitatórios
ROS	Espécies de oxigênios reativos
Pwx 10	Parawixina 10
LAM	Labirinto aquático de Morris
CA1	Corno de Amon 1
CA3	Corno de Amon 3
HGD	Hilus do giro denteado
CP-AMPARs	Receptores AMPA permeáveis ao Ca^{2+}
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
NeuN	Antígeno para núcleo neuronal
GluR1-IC	Células imunopositivas para GluR1
GluR2-IC	Células imunopositivas para GluR2
D.O.	Densidade óptica
DAPI	4,6-diamidina-2-fenilindol- Marcador de núcleo celular

RESUMO

Fachim, H.A. (2013). **Estudo da expressão das subunidades GluR1 e GluR2 no hipocampo de ratos após lesão por NMDA e avaliação do efeito neuroprotetor da Parawixina 10.** Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Tem sido demonstrado o envolvimento do glutamato, através de diferentes receptores, nos mecanismos excitotóxicos que levam à morte neuronal na maioria das doenças neurodegenerativas do Sistema Nervoso Central (SNC). Adicionalmente, a Parawixina 10 (Pwx 10) tem sido demonstrada possuir efeito neuroprotetor em modelos de lesão atuando sobre o transporte de glutamato. Os objetivos gerais deste trabalho foram: i) estudar, em um curso temporal (24h, 1, 2 e 4 semanas), as alterações na expressão dos receptores AMPA no hipocampo de ratos induzidas pela injeção local de NMDA e ii) estudar o efeito neuroprotetor da Pwx 10 neste modelo. Foram utilizados ratos Wistar machos, submetidos à cirurgia estereotóxica para a microinjeção de salina ou NMDA no hipocampo dorsal. Alguns grupos de animais foram tratados com Pwx 10 a partir de 1h ou 24h após NMDA. O teste comportamental no labirinto aquático de Morris (LAM) e a coloração de Nissl foram realizados para verificar a extensão e eficácia da lesão por NMDA e o efeito neuroprotetor da Pwx 10. A expressão dos receptores foi estudada através do método de imunoistoquímica. Foram também realizados experimentos de imunofluorescência para GFAP e NeuN para avaliação da gliose e presença de neurônios na área lesada. Foi observado comprometimento das funções de aprendizado e memória no LAM, além de intensa perda de células neuronais e proliferação glial na região do CA1 que recebeu o NMDA, comprovando a eficiência da lesão pelo agonista. Observamos um curso temporal de diferentes alterações na expressão das subunidades GluR1 e GluR2 dos receptores AMPA no hipocampo, que podem ser relacionadas ao complexo mecanismo que ocorre em resposta à microinjeção de NMDA resultando em uma lesão local e na ativação da plasticidade neuronal. O tratamento com Pwx 10 apresentou efeito neuroprotetor, sendo este mais pronunciado quando a toxina foi administrada a partir de 1h após o agonista.

Palavras-chave: Excitotoxicidade, Hipocampo, Memória, Receptores AMPA, GluR1, GluR2, Neurotoxinas, Parawixina 10.

ABSTRACT

Fachim, H.A. (2013). **Study of the expression of GluR1 and GluR2 in hippocampus of rats after injury by NMDA and evaluation of the neuroprotective effect of Parawixina 10.** Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

It has been shown the involvement of glutamate, through different receptors, on the excitotoxic mechanisms which result on the neuronal death reported in most neurodegenerative disorders of the CNS. In addition, Parawixina 10 (Pwx 10) has been demonstrated to act as neuroprotective in models of injury regulating the glutamatergic neurotransmission through glutamate transporters. The aims of this work were: i) to study, in a time course (24h, 1, 2 and 4 weeks), the changes on the expression of AMPA receptors in rat hippocampus induced by NMDA intrahippocampal injection, and ii) to study the neuroprotective effect of Pwx 10 in this model. Male Wistar rats have been used, submitted to stereotaxic surgery for saline or NMDA microinjection into dorsal hippocampus. Some groups of animals were treated with Pwx 10 from 1h or 24h after NMDA. The behavioral test on Morris water maze (MWM) and the Nissl staining were performed for evaluating the extension and efficacy of the NMDA injury and the neuroprotective effect of the Pwx 10. The expression of the receptors was analyzed by immunohistochemistry. The expression of GFAP and NeuN on the lesioned area has also been investigated by immunofluorescence. It was observed the impairment of learning and memory functions in the MWM, and intense loss of neuronal cells and glial proliferation in CA1 that received the NMDA, confirming the efficiency of the injury by the agonist. We observed a time course of distinct changes on the expression of GluR1 and GluR2 subunits of AMPA receptors in hippocampus, which may be related to the complex mechanism triggered in response to NMDA injection resulting in a local injury and on the activation of neuronal plasticity. The treatment with Pwx 10 showed neuroprotective effect, being most pronounced when the toxin was administered from 1h after NMDA.

Keywords: Excitotoxicity, Hippocampus, Memory, AMPA receptors, GluR1, GluR2, Neurotoxins, Parawixin 10.

1.Introdução Geral

1.1. *Neurotransmissão glutamatérgica*

O glutamato é o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do SNC (sistema nervoso central), participa de importantes funções fisiológicas como os mecanismos envolvidos na aprendizagem e memória, além de exercer um papel fundamental nos processos de proliferação e migração celular, alterações morfológicas dos neuritos, diferenciação neuronal, neurogênese e sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento do SNC (Ozawa et al., 1998; Meldrum, 2000; Ritter et al., 2006; Pires et al., 2006).

O glutamato atua pós-sinapticamente em uma variedade de receptores, os quais são divididos em dois grandes grupos, os metabotrópicos (mGluRs) e os ionotrópicos (iGluRs). Os receptores metabotrópicos de glutamato foram primeiramente descritos por Sladeczek e cols. (1985) e até o momento foram identificados 8 subtipos (mGluR1 a 8). Estes receptores são acoplados a proteínas G e participam dos mecanismos de resposta intracelulares através da ativação de segundos mensageiros (Kubo & Ito, 2004). São divididos em três grupos: grupo I (mGluR1 e 5), grupo II (mGluR2 e 3) e grupo III (mGluR4, 6, 7 e 8). Os receptores ionotrópicos são classificados de acordo com seus agonistas em N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA). São proteínas transmembrana constituídas por um complexo de diferentes subunidades, em diferentes combinações, que conferem ao receptor maior ou menor permeabilidade ao influxo de íons (Hollmann & Heinemann, 1994; Danbolt 2001).

Considerando especificamente os ionotrópicos, os receptores NMDA (NMDARs) ativam canais de Na^+ e K^+ , são altamente permeáveis aos íons Ca^{2+} , dependentes de voltagem e altamente regulados, apresentando três características

peculiares importantes: i) sob condição de repouso permanecem bloqueados pelo íon Mg^{2+} e se abrem em condições de despolarização neuronal; ii) há um influxo significativo de íons Ca^{2+} durante sua ativação; iii) a neurotransmissão mediada por esses receptores ocorre lentamente e permanece ativa por um longo período. Estes receptores são regulados pelo aminoácido glicina como co-agonista, por poliaminas e por fosforilação (Ozawa et al., 1998; Meldrum 2000).

Sete diferentes subunidades de proteínas podem se combinar para formar os NMDARs: NR1, NR2A-D e NR3A e B. A subunidade NR1 é codificada por um único gene, que através do processamento alternativo (splicing) dá origem a 8 diferentes subunidades protéicas. Em contraste, cada uma das subunidades NR2 e NR3 são codificadas por genes distintos. A subunidade NR1 aparece invariavelmente na composição desse receptor, enquanto as subunidades NR2A-D determinam o tempo de abertura do canal e modificam o efeito de vários antagonistas (Meldrum, 2000).

Os receptores AMPA (AMPAARs) possuem menor afinidade ao glutamato, porém apresentam uma cinética mais rápida, são permeáveis ao íon Ca^{2+} e respondem pelo componente inicial do potencial pós-sináptico excitatório. Estes receptores são também permeáveis aos íons Na^{+} e K^{+} (Meldrum, 2000; Segovia et al., 2001). Estruturalmente os receptores AMPA são constituídos pela combinação de 4 subunidades protéicas diferentes conhecidas como GluR1-4 ou GluRA-D, derivadas de um único gene e com diferentes permeabilidades ao íon Ca^{2+} . Os receptores que expressam apenas as subunidades GluR1 e 3 possuem significativa condutância a este íon. Entretanto, a subunidade GluR2 é completamente impermeável e sua presença na composição do receptor modula o influxo de Ca^{2+} nas funções neuronais como plasticidade sináptica, sobrevivência neuronal ou excitotoxicidade (Pellegrini-Giampietro, 2003; Pires et al.,

2006). O processamento alternativo dos genes que codificam as subunidades AMPA dá origem a duas isoformas distintas destas proteínas, flip e flop, que conferem aos receptores diferentes propriedades físicas e químicas. A distribuição destas subunidades e isoformas são diferentes considerando a região cerebral e o estágio de desenvolvimento (Hollmann & Heinemann, 1994; Sommer et al., 1990; Pires, Rebouças, Duvoisin, & Britto, 2000).

Os receptores de KA são também formados pela combinação de 5 subunidades protéicas diferentes, codificadas por genes distintos, GluR5-7 (de baixa afinidade) e KA1 e 2 (de alta afinidade), e que possuem diferente permeabilidade ao íon Ca^{2+} (Meldrum, 2000). As diferentes combinações destas subunidades determinam o influxo de íon através do receptor. Os receptores AMPA e KA são usualmente referidos como receptores AMPA/KA ou receptores não-NMDA.

A concentração extracelular de glutamato é modulada por uma família de proteínas carreadoras sódio-dependentes, os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs). Existem cinco subtipos de transportadores de glutamato estruturalmente distintos: EAAT1 e EAAT2, transportadores gliais; EAAT3, EAAT4 e EAAT5, transportadores neuronais (Danbolt, 2001). Os EAATs contribuem para uma rápida remoção do glutamato liberado no meio extracelular. Embora as células da glia, especialmente os astrócitos circundantes, possuam um papel chave na recaptação do glutamato, os neurônios também contribuem para este mecanismo. Nos astrócitos o glutamato é convertido em glutamina, a qual é transportada de volta ao neurônio pré-sináptico e utilizada na síntese de um novo neurotransmissor (Danbolt, 2001). A figura 1 mostra um esquema da neurotransmissão glutamatérgica onde as características descritas acima estão sucintamente representadas.

Figura 1. Neurotransmissão glutamatérgica demonstrando os processos de: 1) exocitose para a liberação do neurotransmissor, 2) ligação do glutamato aos diferentes receptores (iGluRs e mGluRs), 3) recaptação do glutamato pelos transportadores (EAATs) e 4) reciclagem para a síntese de novo neurotransmissor (Niciu, Kelmendi e Sanacora, 2012).

1.2. Neurotoxicidade glutamatérgica

O estudo de Lucas & Newhouse, realizado em 1957, foi o primeiro a sugerir que o glutamato, além de ser um neurotransmissor imprescindível para inúmeras funções fisiológicas, podia também atuar como uma neurotoxina. O mesmo baseou-se na observação de que injeções subcutâneas desse neurotransmissor em camundongos jovens provocavam destruição das camadas mais internas da retina (Lucas & Newhouse, 1957). Essa observação foi posteriormente reproduzida e expandida por Olney (1978), quando descreveu a ocorrência de lesões cerebrais em resposta às injeções subcutâneas de glutamato em camundongos jovens e adultos. Anteriormente, este pesquisador já

havia proposto o termo “excitotoxicidade” referindo-se à neurodegeneração causada por aminoácidos excitatórios (Olney, 1969).

Concentrações excessivas de glutamato na fenda sináptica resultam em superestimulação dos receptores e consequente aumento do influxo de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico, levando à hiperexcitabilidade desta célula e a um aumento da intensidade da transmissão sináptica através da ativação de cascatas de sinalização intracelulares dependentes deste íon. Adicionalmente, ocorre a liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares que, em conjunto com o influxo aumentado deste íon, elevam a concentração intracelular acima do limiar ativador de mecanismos regulatórios (Sattler & Tymianski, 2001). Essa condição ativa os mecanismos intracelulares de excitotoxicidade, uma cascata de reações enzimáticas que culminam na morte neuronal.

Através dos receptores NMDA, AMPA ou KA, a superestimulação por glutamato causa mobilização do Ca^{2+} citosólico livre, cujo excesso estimula enzimas cálcio-dependentes resultando na produção também excessiva de ROS, os quais levam à modificação estrutural do DNA, proteínas (formação de carbonil proteínas) e lipídeos (peroxidação lipídica), levando a danos no citoesqueleto (Munhoz et al., 2008; Lipton, 1999). Este mecanismo é observado tanto em situações agudas como acidentes vasculares cerebrais, hipoglicemia, hipóxia e trauma, como também nas doenças neurodegenerativas do SNC como Parkinson, Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica, entre outras (Ozawa et al., 1998; Kim & Frank, 2009).

Uma vez que os receptores NMDA apresentam ampla e difusa distribuição no SNC e que todas as subunidades que os compõem são permeáveis ao íon Ca^{2+} , apresentam um papel mais ativo em mecanismos neurotóxicos do que os receptores AMPA e KA (McBain & Mayer, 1994) e tem sido amplamente estudados quanto ao seu envolvimento nos processos neurodegenerativos do SNC (Bowie, 2009). Entretanto, as

características mais específicas apresentadas pelos receptores AMPA relacionadas à sua permeabilidade e distribuição tem despertado o interesse dos pesquisadores em estudar sua participação nestes processos: i) a diferença de permeabilidade ao Ca^{2+} associada às subunidades AMPA, cuja redução seletiva de GluR2 leva ao aumento das subunidades permeáveis ao íon na composição do receptor e ii) a distribuição cerebral menos difusa, embora também ampla destes receptores, podem contribuir para a neurotoxicidade seletiva que ocorre nas diferentes doenças neurodegenerativas, nas quais ocorre a morte celular de grupos de neurônios específicos (Beal, 1992; Weiss & Sensi, 2000).

Assim, embora o envolvimento dos receptores AMPA nos processos neurodegenerativos sejam conhecidos (Ozawa et al., 1998), alterações na expressão de subunidades específicas, avaliadas em um curso temporal após injúria, não foram ainda demonstradas.

1.3. *Importância das neurotoxinas no estudo da neurociência*

Há uma grande carência de ferramentas biológicas específicas para estudar as estruturas neuronais e seus mecanismos. A busca de substâncias seletivas para serem utilizadas nestes estudos pode suprir esta carência. Nesse sentido, as neurotoxinas de peçonhas de animais tem sido isoladas, purificadas e caracterizadas e tem sido demonstradas possuírem grande afinidade pelo tecido nervoso. Estas substâncias tem sido utilizadas como sondas moleculares no estudo de estruturas e mecanismos envolvidos em diversas neurotransmissões (Mellor & Usherwood, 2004; Pizzo, Fontana, Coutinho-Netto & dos Santos, 2000).

As neurotoxinas presentes em peçonhas de artrópodes são compostos capazes de atordoar, paralisar e matar presas e predadores em uma estratégia de autodefesa. Várias

dessas moléculas apresentam grande afinidade e especificidade por canais iônicos, receptores e transportadores de vertebrados e invertebrados (Beleboni et al., 2004).

A análise detalhada da estrutura e da atividade das neurotoxinas, além de permitir um melhor entendimento da organização e do funcionamento do sistema nervoso através da compreensão dos eventos que ocorrem nas transmissões sinápticas, também podem contribuir para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das neuropatologias, bem como para o desenvolvimento de bioinseticidas (Olivera & Cruz, 2001; Mortari, Cunha, Ferreira & Dos Santos, 2007).

Considerando a importância de identificar compostos neuroprotetores que atuem modulando a excitotoxicidade de concentrações excessivas de glutamato, estudos anteriores demonstraram que a Parawixina 10 (Pwx 10), um composto isolado do veneno da aranha *Parawixia bistrata*, possui atividade neuroprotetora regulando a neurotransmissão glutamatérgica. A toxina exerceu sua atividade atuando principalmente no mecanismo de transporte desse neurotransmissor (Fachim et al., 2011). Devido ao envolvimento do glutamato na excitotoxicidade que ocorre nas doenças neurodegenerativas, é de grande relevância o estudo do efeito da Pwx 10 em modelos experimentais de lesão onde há o envolvimento do glutamato, uma vez que estes estudos podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos neurotóxicos e para a identificação de futuros alvos terapêuticos.

2. *Objetivos gerais*

1- Estudar as alterações na expressão dos receptores AMPA, GluR1 e GluR2, no hipocampo dorsal de ratos em diferentes períodos após a microinjeção local do agonista NMDA. Para este estudo foi utilizado o método de imunistoquímica. A eficiência da lesão foi analisada funcionalmente e histologicamente utilizando o teste de memória espacial no Labirinto Aquático de Morris (LAM) e a coloração de Nissl, respectivamente.

2- Estudar o potencial neuroprotetor da Pwx 10 no modelo de lesão excitotóxica induzida pela microinjeção do agonista NMDA no hipocampo dorsal de ratos.

Capítulo I

**Avaliação histológica e funcional da lesão do hipocampo induzida pela
microinjeção de NMDA**

1. Hipocampo e Memória

O hipocampo é a estrutura cerebral responsável por processar informações mais recentes por um período de dias ou meses, transferindo-as mais tardiamente para áreas do córtex cerebral, onde são armazenadas por períodos prolongados (Kandel, 2005). O hipocampo é também essencial nas funções de aquisição e armazenamento da informação espacial, uma vez que esta estrutura é capaz de construir mapas alocléricos do mundo exterior a partir do estímulo visual (O'Keefe & Nadel, 1978).

É de amplo conhecimento a funcionalidade especializada do hipocampo na contribuição do processamento da memória e o envolvimento da mediação glutamatérgica nesse processo (Kugler & Schleyer, 2004), uma vez que o glutamato atua na via tri-sináptica da formação hipocampal, a qual compreende as camadas II e III do córtex entorrinal, giro dentado, CA3, CA1 e subículo (Burwell, 2000; Van Groen, Miettinen, & Kadish, 2003) e exerce seu efeito através dos iGluRs e mGluRs (Itazawa, Isa, & Ozawa, 2011). Os receptores ionotrópicos, NMDA e AMPA/KA, são particularmente importantes nos processos de aprendizagem e memória, uma vez que eles mediam a maior parte da corrente despolarizante responsável pela neurotransmissão glutamatérgica basal e são recrutados durante a plasticidade sináptica (Rosenzweig & Barnes, 2003). Uma série de estudos experimentais demonstraram que animais expostos à lesão hipocampal induzida pela administração local de NMDA apresentavam comprometimento da memória espacial (Bardgett et al., 2003; Bardgett, Jacobs, Jackson, & Csernansky, 1997; Bardgett, Baum, O'Connell, Lee, & Hon, 2006), além de perda substancial de tecido hipocampal e gliose (Bardgett et al., 2006). Esse modelo de lesão tem sido largamente utilizado como modelo experimental de processos neurodegenerativos como a isquemia, doença de Alzheimer e de Parkinson, doenças

como a esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica, epilepsia, envelhecimento natural, entre outros (Löschmann, Eblen, Wüllner, Wachtel, & Klockgether, 1995).

Neste sentido, evidências experimentais mostram que alguns antagonistas dos receptores NMDA comprometem o desempenho dos animais em vários testes de memória e aprendizagem (Castellano, Cestari, & Ciamei, 2001). De acordo com Guscott e cols. (2003), animais tratados com MK-801 (antagonista NMDA não-seletivo) ou CP-101,606 (antagonista NR2B seletivo) submetidos ao teste de memória no LAM apresentaram latências de escape para a plataforma superiores às latências dos controles. Os animais foram capazes de aprender a localização da plataforma, mas demoravam mais tempo que os animais tratados com o veículo para encontrá-la.

Estudos comportamentais utilizando modelos animais são componentes essenciais para as pesquisas direcionadas ao conhecimento das bases neurais do aprendizado e da memória. O LAM é um dos principais e mais utilizados testes neste tipo de estudo em roedores (Talpos, Dias, Bussey, & Saksida, 2008).

Assim, neste capítulo serão apresentadas alterações comportamentais (prejuízo de memória) e histológicas (perda neuronal) induzidas pela microinjeção de NMDA no hipocampo dorsal, avaliadas em diferentes períodos após a administração.

2. Objetivos

Analisar o comprometimento das funções de aprendizado e memória decorrentes da lesão hipocampal induzida pela microinjeção local de NMDA. Para esta análise foi utilizado o teste de memória no Labirinto Aquático de Morris (LAM).

Analisar as alterações histológicas relacionadas à perda neuronal decorrente da lesão hipocampal induzida pela microinjeção local de NMDA. Para esta análise foi utilizada a coloração de Nissl com violeta de cresila.

As avaliações foram realizadas nos períodos de 2 e 4 semanas após a microinjeção de NMDA.

3. Material e Métodos

A figura 2 mostra a sequência das etapas experimentais realizadas neste estudo, cujos procedimentos estão descritos a seguir.

3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (200-250g, n=6/grupo) adquiridos no biotério central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. Os animais foram transferidos para o biotério setorial do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP, acondicionados em caixas de polietileno (34 x 41 x 17 cm - largura x comprimento x altura), 2 animais/caixa, mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12hs, temperatura (25 °C) e umidade (55%) controladas, água e ração *ad libitum*.

A manipulação dos animais seguiu os Princípios Éticos da Experimentação Animal - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), o *Guiding Principles for Research Involving Animals e Human Beings* - Sociedade de Fisiologia Americana (APS, 2000) e *Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals* (Zimmermann, 1983). Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Campus da USP de Ribeirão Preto (protocolo: 10.1.619.53.3).

3.2. Cirurgia e injeção intraipocampal de NMDA

Foram utilizados 4 grupos experimentais: 2 grupos controle (salina) e 2 grupos tratados (NMDA). Quinze minutos antes do procedimento cirúrgico os animais receberam uma dose de 0,1 ml de sulfato de atropina (0,5 mg/mL, i.p.) e em seguida anestesiados com cloridrato de cetamina (Agener União, 60 mg/Kg, i.p.) acompanhada de xilazina (Calier, 8 mg/Kg, i.p.). Após serem fixados em um estereotático (Stoelting-

Standard) os animais receberam injeção local de lidocaína (2%) e em seguida foi feita uma incisão na parte superior da cabeça do animal, a fim de se expor a caixa craniana. Tomando como referencia a linha do bregma, foram utilizadas as coordenadas AP: - 4,52; ML: $\pm 2,0$ e DV: - 2,3 com o objetivo de alcançar o hipocampo dorsal, subcampo CA1 (Paxinos & Watson, 1986). Foram feitos orifícios na caixa craniana, bilateralmente, para a introdução da agulha de microinjeção através da qual foi administrado o agonista NMDA (6mg/mL; 1 μ L/min.) ou salina (1 μ L/min.). Ao término deste procedimento aguardou-se 1min. antes de retirar a agulha para assegurar a difusão total do volume administrado. A mesma foi então retirada e a incisão suturada. Em seguida os animais receberam diazepam em solução (1mg/Kg i.m., gentilmente doado pela Faculdade de Medicina de Catanduva) e pentabiótico (0,1 mL/Kg i.m.), para prevenir a ocorrência de crises convulsivas e infecção, respectivamente.

3.3. *Labirinto aquático de Morris*

Para esta avaliação comportamental foram utilizados os seguintes grupos experimentais: *Salina 2 semanas e Salina 4 semanas* (controles, avaliados 2 e 4 semanas após a administração intraipocampal de salina, respectivamente); *NMDA-2 semanas e NMDA-4 semanas* (tratados, avaliados 2 e 4 semanas após a administração intraipocampal de NMDA, respectivamente). Estes grupos foram selecionados de acordo com o protocolo exigido pelo teste no labirinto aquático de Morris (Morris, 1982), o qual utiliza uma piscina circular em polietileno azul (1.40 cm de diâmetro e 50 cm de profundidade).

Para o teste a piscina foi preenchida com água (23°C) até a altura de 25 cm e uma plataforma branca de 9 cm de diâmetro alocada no quadrante sudeste (virtual) da

piscina. Dois litros de leite foram misturados à água para impedir a visão da plataforma e referências visuais (figuras geométricas: quadrado, triângulo, círculo e estrela) foram posicionadas nas paredes da sala de teste, associadas aos 4 quadrantes (virtuais) da piscina (Fig.1).

Figura 1. Labirinto aquático de Morris. Plataforma representada em linhas pontilhadas e referências visuais posicionadas em cada quadrante (círculo, estrela, quadrado e triângulo). Fonte: <http://btc.bol.ucla.edu/mwm.htm>.

O protocolo experimental consistiu de 24 sessões de treino e uma sessão de teste. Foram realizadas 6 sessões de treino por dia, por quatro dias consecutivos, nas quais foram registradas as latências de escape até a plataforma. Em cada sessão os animais eram colocados em posições diferentes nas laterais da piscina, sempre de costas para a plataforma e deixados até o encontro da mesma. Quando esta não era encontrada até 90 segundos (tempo de corte), o animal era retirado. Neste caso o animal era conduzido manualmente até a plataforma, mantido na mesma por 30 segundos e em seguida novamente colocado na água na posição subsequente.

No quinto dia, ao final do treinamento, a plataforma foi retirada da água para realização do *probe Trial* (teste de prova). O teste consistiu em determinar a ocupação do labirinto pelo animal durante 60 segundos, registrando o tempo de permanência no quadrante em que se encontrava a plataforma (quadrante alvo). Este tempo foi utilizado como índice de memória.

3.4. *Perfusão e processamento do tecido cerebral*

Após o período estipulado para cada grupo e o término do experimento comportamental, os animais receberam uma dose letal de uretana, sendo perfundidos intracardialmente através do ventrículo esquerdo com PBS 0,1 M, pH 7.4 para a lavagem do sangue e em seguida com solução de paraformaldeído 4% (PFA 4% em PBS 0.1 M, pH 7.4) para a fixação do tecido (10min./cada solução). Os encéfalos foram então retirados da caixa craniana e pós-fixados na mesma solução de PFA por 2 horas adicionais e em seguida crioprotégidos em sacarose 30% em PBS 0,1M por 48-72 horas a 4°C. Após este período os encéfalos foram congelados em isopentana resfriada em gelo seco e mantidos em freezer -70°C até o seccionamento. Aproximadamente 24 horas antes deste procedimento os encéfalos eram transferidos para o freezer -20°C. Utilizando criostato (-18°C a -20°C, Leica), secções de 30µm de espessura foram retiradas da região hipocampal e armazenadas em solução anti-congelante no freezer -20°C até serem utilizadas no procedimento da coloração de Nissl.

3.5. *Coloração de Nissl*

Para este procedimento foram utilizadas secções hipocampais em triplicata, ou seja, 3 secções/animal.

As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e submetidas a uma sequência de soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (95%, 80% e 70%, 5min./cada). Em seguida foram imersas em água destilada (5 min), cresil violeta filtrado (15 a 25 min) e submetidas ao processo de diferenciação com álcool e ácido acético. Após essa etapa as secções foram desidratadas e diafanizadas (álcool 95%, álcool absoluto, álcool + xilol, 5 min./cada), montadas com permount e lamínula e mantidas em estufa (37°C) por 24h.

3.6. *Quantificação dos neurônios corados com Nissl*

As lâminas dos experimentos de coloração foram analisadas em microscópio óptico (Leica) e as imagens de cada área hipocampal foram capturadas bilateralmente, nas 3 secções de cada animal, através de uma câmera digital colorida (Leica - DFC300 FX). A quantificação dos neurônios corados foi realizada em todas as imagens utilizando um Programa de Análise de Imagens (Leica QWin Plus, Leica Microsystems, Alemanha). A quantificação dos neurônios foi realizada em todo o campo de visão em um aumento de 200x, correspondendo a uma área fixa de 566µm x 424µm (0.24mm²) para cada região cerebral. Foram quantificadas três secções por animal, bilateralmente (6 valores/região/rato). Foi calculada a média dos 6 valores e os resultados expressos como número de neurônios/0,1mm².

3.7. *Análise estatística*

Os resultados obtidos no teste comportamental (LAM) para os grupos controle e tratados (2 semanas e 4 semanas) foram comparados através de Análise de Variância de medidas repetidas (ANOVA two-way), seguida pelo pós- teste de Newman-Keuls.

Os resultados obtidos a partir da quantificação do número de neurônios corados com Nissl foram comparados entre os grupos controle e tratados nos períodos de 2 e 4 semanas após a microinjeção, separadamente. Estas comparações foram realizadas para os subcampos CA1, CA3 e HGD utilizando Análise de Variância (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

Para todas as comparações realizadas foram consideradas diferenças significantes quando $P \leq 0,05$. Os gráficos foram confeccionados utilizando o Programa Graph Prism (versão 4.0, GraphPad Software, EUA).

Figura 2. Sequência das etapas experimentais realizadas para a avaliação comportamental e histológica da lesão hipocampal induzida pela microinjeção de NMDA.

4. Resultados

4.1. *Labirinto aquático de Morris*

No presente estudo foi avaliada a capacidade de aquisição (sessões de treino, com plataforma) e retenção (sessão de teste, 1 dia após os treinos, sem plataforma) das informações espaciais no Labirinto aquático de Morris, de ratos controle e lesados no hipocampo com NMDA.

Os resultados apresentados nas figuras 3 e 4 mostram diferenças estatisticamente significantes dos parâmetros avaliados entre os animais dos grupos controle e lesados em ambos os períodos após a microinjeção (2 e 4 semanas). Como esperado, a administração intraipocampal de NMDA resultou em declínio da função cognitiva nos animais em relação aos controles, demonstrado pelo aumento das latências para encontrar a plataforma nas sessões de treino (Fig. 3) e pela redução do tempo de permanência no quadrante onde estava a plataforma (preferência pelo quadrante alvo) na sessão de teste (Fig. 4).

Na figura 3 podemos observar que a latência de escape para encontrar a plataforma no primeiro dia de treinamento (Dia 1) dos animais do grupo NMDA - 2 semanas pós-injeção foi estatisticamente diferente do grupo controle (salina - 2 sem) (50% de aumento) e do grupo NMDA - 4 semanas pós-injeção (74% de aumento) [$F(3,23)=14,14$; $p<0.0001$]. Entretanto, o grupo NMDA-4 semanas não apresentou diferença em relação ao controle (salina - 4 sem). No segundo dia de treinamento (Dia 2) não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, enquanto no terceiro e quarto dias de treinamento (Dia 3 e Dia 4, respectivamente) ambos os grupos, NMDA - 2 e 4 semanas pós-injeção, apresentaram diferenças significantes na latência de escape para encontrar a plataforma em relação aos grupos controle correspondentes (salina - 2 e 4

sem). Este aumento foi de 76% nos dois grupos (NMDA-2sem e NMDA-4sem) no Dia 3 [$F(3,23)= 22,30$; $p<0,0001$] e de 110% (NMDA-2sem) e 177% (NMDA-4sem) no Dia 4 [$F(3,23)= 11,87$; $p<0,01$]. Estes resultados mostram um desempenho inferior dos animais lesados com NMDA em relação aos animais dos grupos controle e indicam que houve prejuízo das funções cognitivas associadas ao aprendizado e memória espacial nestes animais.

A figura 4 mostra os resultados do “Probe Trial” – “teste de prova” realizado 24 horas após as sessões de treino quando a plataforma é retirada do quadrante alvo. Podemos observar que o tempo de permanência (preferência) dos animais que receberam NMDA (grupos de 2 e 4 semanas após a injeção) neste quadrante foi significativamente menor do que o tempo de permanência dos animais que receberam salina [$F(3,23)= 25,55$; $p<0.0001$]. Não foi observada diferença entre os 2 grupos que receberam NMDA.

Figura 3. Latências de escape dos animais dos grupos controle (salina) ou tratados (NMDA) nos 4 dias de treinamento no LAM (Dias 1, 2, 3 e 4). Os valores são a média $\pm$ EPM do tempo consumido para encontrar a plataforma. * $P<0.05$; ** $P<0.001$; e *** $P<0,0001$ (ANOVA two-way seguida de Newman-Keuls).

Figura 4. Tempo de permanência dos animais dos grupos controle (salina) ou tratados (NMDA) no quadrante alvo do LAM durante a sessão de teste após a retirada da plataforma (Dia 5, *Probe Trial*). Os valores são a média $\pm$ EPM (segundos). $**P < 0.001$ (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

4.2. Avaliação histológica da lesão hipocampal

Secções hipocampais dos animais lesados com NMDA (2 e 4 semanas pós-lesão) e dos animais controle (salina), submetidos ao teste comportamental no LAM (resultado 4.1) foram utilizadas para a realização da coloração de Nissl com o objetivo de visualizar histologicamente a eficiência da lesão por NMDA. Uma vez que a administração de NMDA resultou na morte de quase 100% dos neurônios na região injetada do subcampo CA1, a quantificação dos neurônios corados com Nissl neste subcampo foi realizada na região imediatamente adjacente à lesão.

As figuras 5 e 6 mostram os resultados qualitativos obtidos. A figura 5 mostra a região do subcampo CA1 microinjetada com NMDA (1 semana pós-injeção) e os “plates” utilizados para a quantificação dos neurônios corados com Nissl. A figura 6

mostra as regiões do subcampo CA1 imediatamente adjacentes à região lesada, os subcampos CA3 e o hilus do giro denteado (HGD), 2 e 4 semanas após a microinjeção de salina ou NMDA. Estas regiões foram quantificadas quanto ao número de neurônios corados com Nissl.

Podemos observar a acentuada perda de neurônios na região do subcampo CA1 dos animais que receberam NMDA em relação aos que receberam salina, mostrando a eficiência da lesão por NMDA (Fig. 5, áreas delimitadas por retângulo). Na figura 6 observamos intensa proliferação glial 2 ou 4 semanas após a microinjeção de NMDA. Estas regiões tiveram seus neurônios quantificados e os resultados estão apresentados nas figuras 7-9.

Figura 5. Secções do hipocampo dorsal submetidas à coloração de Nissl. A e C) Salina- 1 semana); B e D) NMDA- 1 semana (6 mg/mL; 1µL). A e B) Hipocampo total - 400 µm; C e D) CA1 (inset) - 200 µm. E) “Plates” utilizados na quantificação dos neurônios (Paxinos e Watson, 1986) e área da lesão hachurada.

Figura 6. Coloração de Nissl nos subcampos CA1, CA3 e HGD dos grupos controle (salina) e tratados (NMDA) em cada período pós - lesão estudado (2 e 4 semanas).

As figuras 7, 8 e 9 mostram a quantificação do número de neurônios corados com Nissl nos subcampos CA1, CA3 e HGD do hipocampo de animais controle ou lesados com NMDA, 2 e 4 semanas após a microinjeção. Podemos observar acentuada perda neuronal nos subcampos CA1 e CA3 dos animais que receberam NMDA quando comparados aos controles em ambos períodos estudados (Figs. 7 e 8, respectivamente). Em CA1 a redução do número de neurônios foi de 50% 2 semanas pós-lesão e 31% 4 semanas pós-lesão [$F(2,17) = 111,2$; $p < 0.0001$]. Em CA3 esta redução foi de 24% 2 semanas e 27% 4 semanas pós-lesão [$F(2,17) = 54,96$; $p < 0.0001$]. Não foram encontradas diferenças no número de neurônios no HGD entre os grupos controle e NMDA em qualquer dos períodos estudados [$F(2,17) = 1,393$; $p = 0,2787$] (Fig. 9).

Figura 7. Número de neurônios no subcampo CA1 dos animais controle e tratados com NMDA 2 e 4 semanas após a microinjeção. Os valores são a média $\pm$ EPM do número de células/0,1mm² quantificadas bilateralmente, em três secções/animal. *** $P < 0,0001$ (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

Figura 8. Número de neurônios no subcampo CA3 dos animais controle e tratados com NMDA 2 e 4 semanas após a microinjeção. Os valores são a média $\pm$ EPM do número de células/0,1mm² quantificadas bilateralmente, em três secções/animal. ***P<0,0001 (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

Figura 9. Número de neurônios no HGD dos animais controle e tratados com NMDA 2 e 4 semanas após a microinjeção. Os valores são a média $\pm$ EPM do número de células/0,1mm² quantificadas bilateralmente, em três secções/animal.

5. Discussão

Eventos traumáticos que ocorrem no SNC sempre resultam na ativação de respostas imediatas, as quais desencadeiam uma cascata de eventos que levam a danos secundários severos, dentre eles a morte neuronal. Há alguns eventos principais que eventualmente resultam em dano secundário, como as reações inflamatórias sustentadas por células gliais e inflamatórias hematogênicas, lesão excitotóxica, ativação e proliferação glial, lesões resultantes de eventos isquêmicos, reperfusão, entre outros (Ciani, Baldinotti, & Contestabile, 2001). Esses eventos em conjunto resultam na exacerbação da lesão original causando danos aos neurônios que sobreviveram ao trauma inicial (Hailer, Vogt, Korf, & Dehghani, 2005).

Em resposta ao dano neuronal inicial ocorre ativação de uma complexa resposta celular imune, envolvendo astrócitos e micróglia (Bal-Price & Brown, 2001). Os astrócitos promovem atividades essenciais que protegem o tecido e sua função, além de induzirem o reparo neuronal, a produção de substratos energéticos e neurotrofinas (Campbell, 2004). Esta população de células é capaz de reduzir a liberação do glutamato e de radicais livres, restabelecer a barreira hematoencefálica e promover a neurovascularização e a neurogênese (Suk, Park, & Lee, 2004). Todas essas alterações são comuns no desenvolvimento de algumas doenças neurodegenerativas associadas ou não à idade, como as doenças de Parkinson, Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica (Caban-Holt, Mattingly, Cooper, & Schmitt, 2005). Entretanto, esses mecanismos não são claros e é extremamente importante que sejam estudados com o objetivo de aprimorar o conhecimento a respeito das alterações moleculares que ocorrem nos processos neurodegenerativos do SNC.

O modelo e o delineamento experimental utilizados neste trabalho visaram estudar o curso temporal de eventos comportamentais e moleculares subsequentes ao

trauma hipocampal inicial induzido pela administração local do agonista NMDA. Especificamente no campo comportamental estes eventos foram demonstrados aqui pela acentuada redução das funções de aprendizado e memória no LAM ao longo do período pós-lesão, acompanhados por alterações histológicas também acentuadas na área lesada.

Os resultados indicam que o modelo experimental proposto para o desenvolvimento desse estudo é adequado, uma vez que a microinjeção de NMDA em uma região específica do subcampo CA1 do hipocampo dorsal induziu alterações morfológicas acentuadas nesta região. Estas alterações foram visíveis através da coloração de Nissl, que mostra intensa perda de células neuronais na região do CA1 que recebeu o NMDA, comprovando a eficiência excitotóxica do agonista que resultou na morte de neurônios. A intensa proliferação de células gliais observada também nesta área contribui como uma evidência histológica adicional para a eficiência da lesão por NMDA.

Considerando o aspecto funcional, a integridade do hipocampo é fundamental para manter a capacidade de aprendizado e memória (Nielson & Lorber, 2009), funções altamente vulneráveis a várias patologias degenerativas do SNC, representadas principalmente pela doença de Alzheimer (Pierce, Sullivan, Schacter, & Budson, 2005). O teste do labirinto aquático, originalmente proposto por Morris e cols. (1982) para o estudo da memória espacial em roedores, representa um paradigma complexo onde o desempenho dos animais é influenciado por uma série de fatores como atenção e motivação, bem como pela função motora dos animais. Estes fatores em conjunto são determinantes para o sucesso em encontrar a plataforma submersa no decorrer do teste. A análise da função hipocampal na tarefa do LAM, realizada 2 e 4 semanas após a injeção por NMDA, é uma maneira eficiente de testar a integridade funcional do hipocampo, uma vez que esta estrutura está crucialmente envolvida com a navegação

espacial de mamíferos (Halonen, Nissinen, Jansen, & Pitkänen, 1996; Cha, Silveira, Liu, Hu & Holmes, 2002).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram o comprometimento das funções de aprendizado e memória nos animais que receberam o agonista NMDA, avaliados em qualquer dos períodos pós-injeção. Este comprometimento indica um déficit da função hipocampal induzida pela lesão, coerente com as observações histológicas. Não se pode ignorar o fato de que, embora os animais que receberam NMDA tenham aumentado significativamente o tempo de escape para encontrar a plataforma no LAM no decorrer dos dias em relação aos animais controle, evidenciando prejuízos nas funções de aquisição e retenção da memória espacial, estes animais tiveram algum grau de aprendizado porque acabaram encontrando a plataforma. Estes resultados já eram esperados uma vez que evidências experimentais anteriores mostram que as funções de aprendizado e memória dependem fundamentalmente da integridade do hipocampo (Broadbent, Squire, & Clark, 2004). Os pesquisadores demonstraram que a memória espacial só é totalmente prejudicada (100%) quando a lesão envolve de 40 a 60% do volume total do hipocampo e que animais com lesões de 5 a 30% apresentam déficits de aprendizado, porém não deixam de aprender. Esta hipótese corrobora integralmente nossos resultados.

Adicionalmente, Costa e cols. (2005) mostraram que a aplicação de colchicina no giro denteado (GD) interfere na navegação espacial de ratos, tanto no LAM quanto nos labirintos radial e em T, enquanto lesões apenas em CA1 não tendem a produzir déficits na memória espacial. Portanto, a integridade do GD é considerada essencial para a orientação espacial. Em nosso modelo de lesão, apesar de termos encontrado evidente perda celular nas áreas CA1 e CA3, esta perda não foi observada no HGD,

sugerindo a integridade do GD, o que justifica o aprendizado parcial dos animais que receberam NMDA, demonstrado pelas latências maiores em encontrar a plataforma.

Desse modo, o delineamento experimental desse trabalho pode ser utilizado como modelo de lesão excitotóxica em outros estudos que visam aprimorar o entendimento dos processos neurodegenerativos e dos eventos decorrentes do mesmo.

Capítulo II

**Avaliação da expressão das subunidades GluR1 e GluR2 e da organização celular
do hipocampo após microinjeção de NMDA**

1. Receptores AMPA e Neurotoxicidade

Como mencionado anteriormente, muita ênfase foi dada aos NMDARs no passado devido ao seu papel fundamental no neurodesenvolvimento, na plasticidade e nas patologias. E até o presente momento, inúmeros estudos tem demonstrado a importância dos NMDARs na mediação dos processos excitotóxico e neurodegenerativo (Bowie, 2012). Choi e cols. (1988) foram os pioneiros ao demonstrar que os NMDARs são os primeiros responsáveis pela entrada de Ca^{2+} no meio intracelular após a administração de glutamato em cultura de células. Posteriormente, outro grupo de pesquisadores demonstrou que a via de entrada de Ca^{2+} , e não seu influxo propriamente, representa a etapa mais importante do processo neurodegenerativo mediado por NMDARs (Tymianski, M., Charlton, Carlen, Unit, & Mt, 1993). Adicionalmente, Sattler e cols. (1998) demonstraram maior letalidade celular após influxos mais baixos de Ca^{2+} através dos NMDARs em comparação com influxos mais elevados deste íon através de outros canais divalentes. Essas hipóteses têm sido confirmadas por estudos mais recentes evidenciando o papel fundamental dos NMDARs na excitotoxicidade e consequentemente em doenças neurodegenerativas (Bowie, 2009).

No entanto, nem todos os neurônios expressam NMDARs. Consequentemente, o aumento das concentrações de Ca^{2+} citosólico livre mediado por sinalização glutamatérgica deve ocorrer via outros iGluRs. Os primeiros candidatos indicados para exercer este papel foram os AMPARs, os quais exercem diversas funções no cérebro adulto como na *Potenciação de Longa Duração* (LTP) neurônio-neurônio (Cull-Candy, Kelly, & Farrant, 2006) e neurônio-glia (Ge et al., 2006), nos mecanismos envolvidos em processos isquêmicos (Liu, Fawcett, Hanson, & Frey, 2004), convulsões epiléticas (Krestel et al., 2004), proliferação de tumores do tipo glioblastoma (Ishiuchi et al., 2002), entre outros.

Os receptores AMPA apresentam permeabilidade regulada ao íon Ca^{2+} e restrita distribuição no SNC, o que pode contribuir para a seletiva neurotoxicidade que ocorre nas diferentes doenças neurodegenerativas (Bettler & Mülle, 1995; Weiss & Sensi, 2000).

No contexto da permeabilidade, estes receptores tem a particularidade de apresentarem duas propriedades distintas: i) possuir na sua composição a ausência da subunidade GluR2 ou a presença de uma ou mais desta subunidade, conferindo permeabilidade variável ao íon Ca^{2+} e ii) os receptores que não possuem GluR2 na sua composição são sensíveis ao bloqueio por poliaminas, ao contrário daqueles que possuem esta subunidade (Bowie, 2012). Foi demonstrado que sinapses em que os neurônios expressam AMPARs insensíveis ao bloqueio por poliaminas e portanto, impermeáveis ao Ca^{2+} , possuem diminuta presença de NMDARs ou ausência destes (Bowie, 2012).

Estas propriedades funcionais de AMPARs e sua associação estreita com NMDARs foram estabelecidas desde o início do seu papel fundamental nas conexões dos circuitos neuronais. No entanto, a função original atribuída aos AMPARs é mais complicada por dois motivos: i) os estudos da última década tem identificado sinapses que são desprovidas de AMPARs mas contêm NMDARs (Liao and Malinow 1995; Castillo, Malenka, & Nicoll, 1997). Do ponto de vista funcional, as sinapses dessa natureza são chamadas "silenciosas" à liberação de glutamato, uma vez que os NMDARs são tonicamente bloqueados por Mg^{2+} em condições de repouso. A proporção de sinapses deficientes de AMPARs é maior no SNC neonatal do que no adulto (Wu, Malinow, & Cline, 1996; Petralia, Zhao, Wang, & Wenthold, 1998; Xiao, Wasling, Hanse, & Gustafsson, 2004), sugerindo que a reorganização de diferentes iGluRs nas sinapses é importante para o desenvolvimento neuronal. ii) Não são todos os AMPARs

impermeáveis ao Ca^{2+} . Interneurônios inibitórios e células gliais expressam principalmente AMPARs com considerável permeabilidade ao íon (Cull-Candy et al., 2006). Um estudo recente realizado na retina em desenvolvimento mostra que os AMPARs são provavelmente os únicos iGluR expressos em células inibitórias (Osswald, Galan, & Bowie, 2007), sugerindo que eles possam substituir o papel tradicional dos NMDARs em permitir a entrada de Ca^{2+} no processo de maturação neuronal (Bowie, 2008).

Nas doenças neurodegenerativas do SNC ocorre a morte de populações específicas de neurônios. Na isquemia e epilepsias os primeiros neurônios a se degenerarem são os piramidais do hipocampo. Na Doença de Alzheimer há também a morte desses neurônios mas ocorre a morte seletiva dos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal. Na esclerose lateral amiotrófica há a morte específica dos motoneurônios superiores e inferiores (Weiss & Sensi, 2000). Embora o glutamato possa ativar vários tipos de receptores pós-sinápticos, a distribuição vasta e generalizada dos NMDARs torna difícil de conciliar com padrões muito seletivos de perda celular. Há evidências que mostram o papel crucial dos receptores AMPA e KA no desencadeamento da neurodegeneração associada à isquemia, Alzheimer e traumas, uma vez que além de seus antagonistas terem mostrado melhores resultados do que os antagonistas de NMDA no tratamento dessas doenças (Gill, Nordholm, & Lodge, 1992), as populações específicas de neurônios que preferencialmente degeneram nessas doenças (incluindo os motoneurônios e os colinérgicos do prosencéfalo basal), exibem uma susceptibilidade mais elevada à injúria mediada por AMPA ou KA do que por NMDA (Page, Everitt, Robbins, Marston, & Wilkinson, 1991; Carriedo, Yin, & Weiss, 1996; Rothstein 2009).

Considerando a ampla, porém seletiva distribuição dos AMPARs no cérebro, é compreensível seu envolvimento em inúmeras patologias do SNC, desde as que

ocorrem durante o neurodesenvolvimento como a síndrome do X frágil (uma das causas mais frequentes de retardo mental e autismo) e a esquizofrenia (O'Donnell & Warren, 2002; O'Neill, Bleakman, Zimmerman, & Nisenbaum, 2003; Bear, 2005; Harrison et al., 2003; Sestito et al. 2011) como as neurodegenerativas representadas pelas doenças de Parkinson, Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica (Van Den Bosch, Van Damme, Bogaert, & Robberecht, 2006; O'Neill & Witkin, 2007).

Adicionalmente, os receptores AMPA também tem sido relacionados à depressão (O'Neill et al., 2003; O'Neill & Witkin, 2007), crises convulsivas e danos neurais associados às epilepsias (Howes & Bell, 2007). Embora os efeitos nocivos em cada uma dessas doenças obviamente não podem ser atribuídos somente à mediação por receptores AMPA, seu envolvimento pode contribuir para explicar porque apenas algumas populações neuronais são vulneráveis à excitotoxicidade (Bowie, 2008).

Tendo em vista que a excitotoxicidade é seguida de dano cerebral decorrente da morte neuronal e que esse processo deve estar presente nas doenças neurodegenerativas do SNC, é de grande interesse estudar os mecanismos glutamatérgicos envolvidos na progressão da neurodegeneração e nas respostas cerebrais que ocorrem como consequência. Estes estudos podem contribuir para aprimorar o esclarecimento das inúmeras etapas envolvidas nestes mecanismos e podem, no futuro, contribuir para que alvos terapêuticos mais seletivos possam ser utilizados no desenvolvimento de drogas mais adequadas ao tratamento das doenças neurodegenerativas.

2. Objetivos

Analisar, em um curso temporal, a expressão das subunidades GluR1 e GluR2 dos receptores AMPA no hipocampo de ratos após microinjeção local de NMDA. Esta análise foi realizada por meio do método de imunoistoquímica.

Analisar as alterações histológicas relacionadas à perda neuronal e proliferação glial no hipocampo de ratos após microinjeção local de NMDA. Esta análise foi realizada por meio do método de imunofluorescência.

As análises foram realizadas 24h, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção de NMDA.

3. Material e Métodos

A figura 1 mostra a sequência das etapas experimentais realizadas neste estudo, cujos procedimentos estão descritos a seguir.

3.1. Cirurgia e injeção intraipocampal de NMDA

Para os experimentos de imunoistoquímica foram utilizados os seguintes grupos experimentais (n=06/cada): *Salina-24 horas; Salina-1 semana; Salina-2 semanas e Salina 4-semanas; NMDA-24 horas; NMDA-1 semana; NMDA-2 semanas; NMDA-4 semanas*. Cada grupo foi sacrificado no período designado após receberem a injeção de solução salina ou NMDA por via intraipocampal, como previamente descrito no item 3.2 do Capítulo I.

3.2. Perfusão e processamento do tecido cerebral

Após o período estipulado para cada grupo e o término do experimento comportamental, os animais receberam uma dose letal de uretana, sendo perfundidos intracardialmente através do ventrículo esquerdo com PBS 0,1 M, pH 7.4 para a lavagem do sangue e em seguida com solução de paraformaldeído 4% (PFA 4% em PBS 0.1 M, pH 7.4) para a fixação do tecido (10min./cada solução). Os encéfalos foram então retirados da caixa craniana e pós-fixados na mesma solução de PFA por 2 horas adicionais e em seguida crioprotégidos em sacarose 30% em PBS 0,1M por 48-72 horas a 4°C. Após este período os encéfalos foram congelados em isopentana resfriada em gelo seco e mantidos em freezer -70°C até o seccionamento. Aproximadamente 24 horas antes deste procedimento os encéfalos eram transferidos para o freezer -20°C. Utilizando criostato (-18°C a -20°C, Leica), secções de 30µm de espessura foram retiradas da região hipocampal e armazenadas em tubos “eppendorf” contendo solução

anti-congelante a -20°C, até serem utilizadas nos experimentos de imunistoquímica e imunofluorescência. Com o auxílio do atlas de Paxinos e Watson (1986) os tubos foram catalogados de acordo com os “plates” correspondentes às secções armazenadas.

3.3. Imunoistoquímica

Nestes experimentos foram utilizadas secções hipocampais em triplicata, ou seja, 3 secções por animal. As secções foram selecionadas e retiradas dos tubos “eppendorf” correspondentes ao “plate” contendo o hipocampo dorsal, de acordo com o catálogo previamente organizado. Estas foram colocadas em placas de acrílico contendo poços, adequadas para a realização do procedimento de imunistoquímica *free-floating*.

Inicialmente, as secções foram lavadas (4x/5min.) em PBS 0,01 M + *Triton* 0,15% em solução tampão para a retirada da solução anticongelante. Em seguida, os cortes foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% em solução tampão por 15 min., com a finalidade de bloquear a peroxidase endógena existente por todo o tecido e impedir a marcação inespecífica e *background*. Os cortes foram lavados (4x/5min.) com solução tampão e incubados por 1 hora com soroalbumina bovina (BSA, Sigma - A9647) a 2% em solução tampão. A BSA se liga aos sítios específicos e evita *background*. As secções foram então lavadas em solução tampão e incubadas com o anticorpo primário, rabbit anti-GluR1 (1:1000, Millipore) ou rabbit anti-GluR2 (1:1000, Millipore), *overnight*, à temperatura ambiente. As secções foram então lavadas em solução tampão e incubadas com o anticorpo secundário (anti-rabbit 1:250, Dako Cytomation) por 90 min., novamente lavadas em tampão e incubadas com o complexo avidina-biotina (ABC, Kit Vector, 1:125 em solução tampão) por 1 hora para formação dos complexos entre a avidina e a peroxidase-biotinilada. As secções foram então incubadas em tampão Tris (TB, 0,25M) por 5 min. Após nova lavagem a reação foi

revelada, no escuro, com 3,3-diaminobenzidina (DAB – Sigma) diluída em TBS 0,1M com H_2O_2 (10g DAB: 20ml de TBS 0,1M: 0,3 μ l H_2O_2), que precipita na cor marrom-caramelo ao se ligar às moléculas de H_2O_2 .

Como controle da especificidade de ligação, secções foram ensaiadas com a omissão do anticorpo primário.

As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, diafanizadas e cobertas com permount e lamínula.

Quantificação dos neurônios imunorreativos

As lâminas dos experimentos de imunoistoquímica foram analisadas em microscópio óptico (Leica) e as imagens de cada área hipocampal foram capturadas bilateralmente, nas 3 secções de cada animal, através de uma câmara digital colorida (Leica - DFC300 FX). A quantificação dos neurônios imunopositivos para cada proteína estudada (GluR1 e GluR2) foi realizada em todas as imagens utilizando um Programa de Análise de Imagens (Leica QWin Plus, Leica Microsystems, Alemanha). A quantificação das células imunopositivas foi realizada em todo o campo de visão em um aumento de 200x, correspondendo a uma área fixa de 566 μ m x 424 μ m (0.24mm²) para cada região cerebral. Foram quantificadas três secções por animal, bilateralmente (6 valores/região/rato). Foi calculada a média dos 6 valores e os resultados expressos como número de células imunopositivas/0,1mm².

3.4. Fluorescência

O procedimento de fluorescência compreendeu tanto reações imunológicas quanto reações histológicas. Foi realizada a marcação das células utilizando anticorpos específicos para neurônios (mouse anti-NeuN, 1:1000, Millipore) e para células gliais

(mouse anti-GFAP, Sigma: G3893) (imunofluorescência indireta), além da marcação de núcleos celulares por meio da ligação de DAPI com DNA (histofluorescência).

Foram escolhidas secções representativas dos grupos controle (salina, n=2) e tratados (NMDA, n=2), 1 e 4 semanas após a microinjeção.

Aproximadamente 18 horas antes do experimento as secções foram transferidas da solução anti-congelante para a solução tampão (PB 0,1M), a 4°C e mantidas na geladeira a 4°C.

As secções foram colocadas em placas de acrílico contendo poços para incubações “free-floating”.

Inicialmente as secções foram lavadas (4x/5min.) em PB 0,1 M + Triton X-100 0,15% em PB para a retirada da solução anticongelante e em seguida lavadas (3x/5min.) em PB 0,1M. De acordo com o método descrito por De Oliveira e Nanci (2004) e De Oliveira *et al.* (2003), as secções foram permeabilizadas em Triton X-100 0,5% em PB durante 10 min. e em seguida novamente lavadas (3x/5min.) em PB 0,1M.

Para realizar as diferentes marcações, as secções foram divididas em dois conjuntos iguais de 2 secções/animal de ambos os grupos experimentais. Um conjunto de secções foi incubado com o anticorpo primário mouse anti-NeuN (1:1000) e o outro conjunto de secções foi incubado com o anticorpo primário mouse anti-GFAP (1:1000). Após 60min. todas as secções foram lavadas (3x/5min.) em PB 0,1M. Em seguida o primeiro conjunto de secções foi incubado com o anticorpo secundário goat anti-mouse conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 594 (1:200, Molecular Probes: A11076 - vermelho) e o segundo conjunto de secções foi incubado com o anticorpo secundário goat anti-mouse conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes: A11001 - verde). Após 50 min. ao abrigo da luz, todas as secções foram lavadas

(3x/5min.) em PB 0,1M e em seguida incubadas por 5 min. com o marcador de núcleos celulares DAPI 0,25µl/ml (4',6-diamino-2phenylindole, dihydrochloride, Molecular Probes: D1306 - azul). As secções foram novamente lavadas em PB 0,1M (2x/5min.) e em água deionizada (1x/5min.) com o objetivo de eliminar os sais e evitar a proliferação de fungos.

As secções foram montadas em lâminas não-gelatinizadas com o auxílio do meio de montagem *anti-fade* e cobertas com lamínula. As marcações foram analisadas por epifluorescência em microscópio de epifluorescência (Axio Imager) acoplado a uma câmara fotográfica digital (AxionCam MRm). Foi realizada a aquisição das imagens de cada marcação para os 2 grupos experimentais, as quais estão apresentadas individualmente e sobrepostas.

3.5. Análise estatística

Os resultados obtidos a partir da quantificação do número de células imunopositivas para GluR1 (GluR1-IC) ou GluR2 (GluR2-IC) foram comparados entre os grupos controle e tratados, separadamente, em todos os períodos após a microinjeção estudados. Estas comparações foram realizadas para os subcampos CA1, CA3 e HGD utilizando Análise de Variância (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

Para todas as comparações realizadas foram consideradas diferenças significativas quando $P \leq 0,05$. Os gráficos foram confeccionados utilizando o Programa Graph Prism (versão 4.0, GraphPad Software, EUA).

Figura 1. Sequência das etapas experimentais realizadas para o estudo da expressão de receptores AMPA, GFAP e NeuN no hipocampo após lesão induzida pela microinjeção local de NMDA.

4. Resultados

4.1. Expressão das subunidades GluR1 e GluR2 no hipocampo

Foram realizados os experimentos de imunoistoquímica para analisar a expressão das subunidades GluR1 e GluR2 dos receptores AMPA no hipocampo dos animais dos grupos controle (salina) ou lesados (NMDA) em todos os períodos após a microinjeção (períodos pós-lesão: 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas). Foram utilizadas 3 secções/animal (n=6/grupo) e analisados os subcampos CA1, CA3 e HGD.

As imagens de cada subcampo em todas as secções foram capturadas bilateralmente e quantificados o número de neurônios positivamente marcados para ambas as subunidades (Immunopositive Cells – GluR1-IC e GluR2-IC). Especificamente referente ao subcampo CA1, devido a ausência de células na área que recebeu a microinjeção de NMDA, a região imediatamente adjacente à lesão foi selecionada para análise e quantificação de GluR1- e GluR2-IC.

4.1.1. Expressão da subunidade GluR1

As figuras 2-7 mostram a expressão de GluR1 nos subcampos CA1, CA3 e HGD do hipocampo. A análise qualitativa das figuras 2-4 mostra que em todos os subcampos há grande densidade de GluR1-IC, tanto nos grupos controle quanto nos grupos que receberam NMDA.

Especificamente em CA1 (Fig. 2), esta análise mostra que a população de GluR1-IC nos animais controles permanece como uma camada organizada de células ao longo de todo o período estudado. Entretanto, nos animais que receberam NMDA as células positivas são expressas tanto na camada que caracteriza CA1 propriamente, como também um grande número de células podem ser vistas espalhadas em torno da mesma.

Adicionalmente, observa-se um alargamento da camada de células neste subcampo sugerindo uma desorganização da região adjacente à lesão.

A análise qualitativa do subcampo CA3 (Fig. 3) também mostra, em todos os períodos pós-lesão avaliados, grande número de GluR1-IC espreiadas em torno da camada densa de células nos animais que receberam NMDA, enquanto nos animais controle essa expressão se limita à camada de células características deste subcampo.

De forma semelhante, a análise do HGD mostra maior densidade de GluR1-IC nos animais que receberam NMDA em todos os períodos pós-lesão quando comparados aos animais dos grupos controle (Fig. 4), embora estes animais também apresentam alta densidade de GluR1-IC.

Figura 2. Imunoistoquímica para GluR1 no subcampo CA1 de ratos controle (salina) e tratados (NMDA) nos períodos de 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção. Células marcadas com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Barras = 200μm.

Figura 3. Imunoistoquímica para GluR1 no subcampo CA3 de ratos controle (salina) e tratados (NMDA) nos períodos de 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção. Células marcadas com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Barras = 200 μ m.

Figura 4. Imunoistoquímica para GluR1 no HGD de ratos controle (salina) e tratados (NMDA) nos períodos de 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção. Células marcadas com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Barras = 200μm.

A análise quantitativa da expressão de GluR1 em CA1, CA3 e HGD, nos grupos controle e lesados, em todos os períodos após a microinjeção de NMDA, está apresentada nas figuras 5-7. Podemos observar que para todos os subcampos estudados o número de GluR1-IC não apresentou diferença entre os grupos que receberam salina (controles) nos diferentes períodos pós-injeção. Adicionalmente, o número de GluR1-IC não foi diferente entre os grupos que receberam salina e foram testados no LAM e também entre estes grupos e aqueles que receberam salina e não foram testados no LAM. Entretanto, os animais que receberam NMDA apresentaram aumento significativo da expressão de GluR1 em relação aos controles em todos os subcampos analisados. Este aspecto mostra que a exposição dos animais ao teste no LAM não contribui para o aumento da expressão de GluR1 induzida por NMDA (resultados descritos a seguir).

Em CA1, o aumento do número de GluR1-IC nos animais que receberam NMDA em relação aos controles correspondentes foi significativo a partir de 1 semana pós-lesão (33%) e se manteve nos períodos de 2 semanas (20%) e 4 semanas (35%) pós-lesão. Em relação aos grupos salina 2 e 4 semanas + LAM quando comparados aos tratados com NMDA, o aumento foi de 18% para o grupo de NMDA-2 sem e 35% para o grupo de NMDA-4 sem. [$F(9,53)= 10,40$; $p<0,0001$]. Nenhuma alteração foi observada na expressão de GluR1 24 horas após a administração de NMDA (fig. 5A).

Uma vez que a alta densidade de células imunopositivas da camada CA1 propriamente dificulta a contagem das células individuais, foi realizada a quantificação por densidade óptica desta camada, apresentada na figura 5B. Os resultados encontrados foram semelhantes àqueles mostrados na figura 5A, confirmando o aumento da expressão de GluR1 induzido por NMDA ao longo do período pós-lesão avaliado. Este

aumento foi também observado a partir de 1 semana após a administração de NMDA (34%), e se manteve nos períodos de 2 (43%) e 4 semanas pós-lesão (51%) [$F(9,48)=12,75$; $P<0,001$].

Figura 5. Imunoistoquímica para GluR1 no subcampo CA1 de ratos controle (salina) e tratados (NMDA) nos períodos de 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção. A) Número de GluR1-IC/0,01 mm²; B) Densidade óptica. Os valores são a média $\pm$ EPM do número de células imunopositivas quantificadas (A) ou da medida de DO realizada (B) bilateralmente, em três secções/animal ($n=6$). * $P<0,05$ ** $P<0,01$ *** $P<0,001$ (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

Em CA3, o número de GluR1-IC nos animais que receberam NMDA apresentou aumento significativo em relação aos controles nos períodos de 2 semanas (22%) e 4 semanas (21%) após a microinjeção [$F(9,53)=3,726$; $p<0.01$]. Entretanto, nenhuma alteração no número de GluR1-IC neste subcampo foi encontrada 24 horas e 1 semana após NMDA (fig. 6A). Quando os grupos salina 2 e 4 semanas + LAM foram comparados aos tratados com NMDA, o aumento foi de 21% para o grupo NMDA-2 sem e 20% para o grupo NMDA-4 sem. [$F(9,53)=3,726$; $p<0.01$].

Da mesma forma que o observado para CA1, a quantificação por densidade óptica da camada densa de células do subcampo CA3 confirmou os resultados da contagem de células marcadas, onde um aumento na expressão de GluR1 nos animais

que receberam NMDA ocorreu apenas nos períodos de 2 e 4 semanas pós-lesão quando comparados aos controles. Esse aumento foi de 37 % no grupo NMDA- 2 sem e 35% no grupo NMDA – 4 sem [$F(9,49)= 6,640$; $P<0,001$] (fig. 6B).

Figura 6. Imunoistoquímica para GluR1 no subcampo CA3 de ratos controle (salina) e tratados (NMDA) nos períodos de 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção. A) Número de GluR1-IC/0,01 mm²; B) Densidade óptica. Os valores são a média $\pm$ EPM do número de células imunopositivas quantificadas (A) ou da medida de DO realizada (B) bilateralmente, em três secções/animal (n=6). * $P<0,05$ ** $P<0,001$ *** $P<0,0001$ (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

Embora uma menor densidade de células imunopositivas para GluR1 tenha sido encontrada no HGD quando comparado a CA1 e CA3, aumento significativo no número destas células também foi induzido pela injeção de NMDA. Este aumento foi observado a partir de 24 horas após a microinjeção (30%) e se manteve nos períodos de 1 semana (114%) e 2 semanas (46%) após NMDA [$F(9,53) = 27,15$, $p < 0,0001$]. Diferentemente de CA1 e CA3, nenhuma alteração no número de GluR1-IC foi encontrada 4 semanas após NMDA quando comparados aos controles (Fig. 7). Quando o grupo salina 2 sem + LAM foi comparado ao NMDA-2 sem também observamos aumento no número de GluR1-IC, sendo esse de 44% [$F(9,53) = 27,15$, $p < 0,0001$]. Nenhuma alteração no

número de GluR1-IC foi encontrada 4 semanas pós-lesão quando comparados ao salina 4 sem ou salina 4 sem + LAM (Fig. 7).

A quantificação por densidade óptica não foi realizada no HGD por duas razões: i) a distribuição de neurônios neste subcampo é esparsa e portanto não dificulta a contagem de células individuais; ii) devido a este padrão de distribuição, o HGD possui áreas onde há ausência de células neuronais. Nestas áreas, a “cor de fundo” do tecido contribuiria para o valor absoluto da D.O., diluindo a medida real da expressão de GluR1-IC.

Figura 7. Imunoistoquímica para GluR1 no HGD de ratos controle (salina) e tratados (NMDA) nos períodos de 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção. Número de GluR1-IC/0,01 mm². Os valores são a média $\pm$ EPM do número de células imunopositivas quantificadas bilateralmente, em três secções/animal (n=6). *P< 0,05; **P<0,001; ***P<0,0001. (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

4.1.2. Expressão da subunidade GluR2

As figuras 10-15 mostram a expressão de GluR2 nos subcampos CA1, CA3 e HGD do hipocampo. Similarmente à subunidade GluR1, alta densidade de GluR2-IC foi

observada em todos os subcampos analisados tanto nos animais dos grupos controle quanto dos que receberam NMDA.

Diferentemente de GluR1, a análise qualitativa da expressão de GluR2 em CA1 mostra que para ambos os tratamentos as células positivas estão concentradas na camada que define este subcampo, não sendo observadas células espalhadas em torno desta camada. Também de forma oposta a GluR1, esta análise mostra que os animais que receberam NMDA apresentam redução da espessura dessa camada celular em todos os períodos pós-lesão analisados quando comparados aos controles que receberam salina (Fig.8).

Em CA3 observa-se que a expressão de GluR2 foi muito semelhante em todos os grupos estudados, tanto aqueles em que os animais receberam salina como aqueles em que os animais receberam NMDA (Fig.9). As GluR2-IC encontram-se uniformemente distribuídas em toda a camada celular. Eventualmente observa-se poucas células positivas em torno desta camada mas isto ocorre tanto nos grupos controle quanto naqueles tratados com NMDA, em diferentes períodos após a microinjeção.

A análise qualitativa da expressão de GluR2 no HGD mostra maior densidade de células positivas em todos os grupos que receberam NMDA a partir 1 semana após a microinjeção, quando comparados aos grupos controle correspondentes (Fig.10).

Figura 8. Imunoistoquímica para GluR2 no subcampo CA1 de ratos controle (salina) e tratados (NMDA) nos períodos de 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção. Células marcadas com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Barras = 200μm.

Figura 9. Imunoistoquímica para GluR2 no subcampo CA3 de ratos controle (salina) e tratados (NMDA) nos períodos de 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção. Células marcadas com 3,3-diaminobenzidine (DAB). Barras = 200 μ m.

Figura 10. Imunoistoquímica para GluR2 no HGD de ratos controle (salina) e tratados (NMDA) nos períodos de 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção. Células marcadas com 3,3-diaminobenzidina (DAB). Barras = 200μm.

A análise quantitativa da expressão de GluR2 no hipocampo está representada nas figuras 11-13. Resumidamente, a microinjeção de NMDA induziu alterações significativas no número de GluR2-IC apenas em CA1 e HGD.

Especificamente em CA1 esta redução foi altamente significativa em todos os períodos após a administração de NMDA quando estes grupos foram comparados aos seus respectivos controles. Essa redução foi de 60% 24 horas após a microinjeção, 53% 1 semana, 75% 2 semanas e 78% 4 semanas após NMDA [$F(9,56) = 146,9$, $p < 0.0001$] (Fig. 11A). Quando os grupos salina treinados no LAM foram comparados aos tratados com NMDA, a redução foi de 73% no grupo NMDA-2 sem e de 78 % no grupo NMDA- 4 sem [$F(9,56) = 146,9$, $p < 0.0001$] (Fig. 11A).

À semelhança de GluR1, foi realizada a quantificação por D.O. da expressão de GluR2 devido a alta densidade de células positivas na camada que define CA1 (Figura 11B). Os resultados confirmam aqueles obtidos através da contagem das células positivas mostrados na figura 11A. Todos os animais que receberam NMDA apresentaram redução altamente significativa dos valores de D.O. quando comparados aos animais que receberam salina. Esta redução foi observada a partir de 24 horas após a injeção (44%) e se manteve nos períodos de 1 semana (59%), 2 semanas (65%) e 4 semanas (69%) pós-lesão [$F(9,49) = 23,50$; $P < 0,001$].

Em CA3 a microinjeção intraipocampal de NMDA não induziu qualquer alteração no número de GluR2-IC em todos os períodos pós-lesão analisados quando estes foram comparados aos controles (Fig. 12A). Estes resultados foram confirmados pela quantificação através da medida de D.O. apresentada na Figura 12B.

Em contraste aos resultados obtidos para CA1, a injeção intraipocampal de NMDA induziu aumento significativo no número de GluR2-IC no HGD em relação aos controles. Este aumento foi observado 24 horas (28%), 1 semana (65%) e 2 semanas (25%) após a microinjeção [$F(9,53) = 18,18$, $p < 0,0001$]. Entretanto, nenhuma diferença foi observada 4 semanas após NMDA (Fig. 13). Quando o grupo salina 2 sem submetido ao LAM foi comparado ao NMDA- 2 sem, o mesmo aumento de 25% foi observado [$F(9,53) = 18,18$, $p < 0,0001$]. Novamente, a medida de D.O. não foi realizada no HGD pelas razões anteriormente apresentadas na descrição dos resultados referentes à expressão de GluR1.

A omissão dos anticorpos primários GluR1 e GluR2 resultou em completa ausência de sinal (Figura 14A e B).

Figura 11. Imunoistoquímica para GluR2 no subcampo CA1 de ratos controle (salina) e tratados (NMDA) nos períodos de 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção. A) Número de GluR1-IC/0,01 mm²; B) Densidade óptica. Os valores são a média $\pm$ EPM do número de células imunopositivas quantificadas (A) ou da medida de DO realizada (B) bilateralmente, em três secções/animal ($n=6$). ** $P < 0,01$ (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

CA3

Figura 12. Imunoistoquímica para GluR2 no subcampo CA3 de ratos controle (salina) e tratados (NMDA) nos períodos de 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção. A) Número de GluR2-IC/0,01 mm²; B) Densidade óptica. Os valores são a média $\pm$ EPM do número de células imunopositivas quantificadas (A) ou da medida de DO realizada (B) bilateralmente, em três secções/animal (n=6).

HGD

Figura 13. Imunoistoquímica para GluR2 no HGD de ratos controle (salina) e tratados (NMDA) nos períodos de 24 horas, 1 semana, 2 semanas e 4 semanas após a microinjeção. Número de GluR2-IC/0,01 mm². Os valores são a média $\pm$ EPM do número de células imunopositivas quantificadas bilateralmente, em três secções/animal (n=6). ***P<0,0001 (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

Figura 14. Secções do hipocampo incubadas na ausência dos anticorpos primários anti-GluR1(A) e anti-GluR2 (B).

4.2. Expressão de GFAP e NeuN no hipocampo

As figuras 15 a 18 mostram a expressão de GFAP e NeuN no hipocampo de ratos controle ou que receberam injeção intraipocampal de NMDA. Esta análise foi realizada somente no subcampo CA1 (injetado) 1 semana e 4 semanas após a indução da lesão.

A figura 15 mostra a expressão de GFAP na região do subcampo CA1 imediatamente adjacente à área lesada, ou seja, a região onde foi realizada a análise e a quantificação da expressão de GluR1 e GluR2. Utilizando a imunofluorescência observamos marcação para GFAP (verde) em todos os grupos analisados e esta marcação foi vista associada a núcleos marcados com DAPI (azul) quando analisamos a sobreposição das imagens. Entretanto, como esperado, a expressão de GFAP foi intensamente aumentada 1 semana após a microinjeção de NMDA, demonstrando intensa proliferação glial como consequência do estímulo excitotóxico. Esta proliferação foi marcadamente reduzida 4 semanas após o estímulo, uma vez que a expressão de GFAP retornou a níveis semelhantes ao controle.

Figura 15. Marcação imunofluorescente de células gliais – GFAP (verde) no subcampo CA1 (região adjacente à lesão) de ratos controle (salina) ou tratados (NMDA) 1 e 4 semanas após a microinjeção. Núcleos celulares marcados com DAPI (azul).

De forma semelhante ao GFAP, a figura 16 mostra a expressão de NeuN também na região do subcampo CA1 imediatamente adjacente à área lesada por NMDA. A marcação para NeuN (vermelho) foi também observada em todos os grupos analisados, associada a núcleos marcados com DAPI (azul) como mostra a sobreposição das imagens. Em contraste ao observado para GFAP, a expressão de NeuN foi discretamente reduzida 1 semana após a microinjeção de NMDA, retornando a níveis semelhantes ao controle 4 semanas após a lesão. Estes resultados sugerem que a excitotoxicidade induzida por NMDA possa ter um raio de ação suficiente para levar à morte de neurônios na região adjacente ao sítio de injeção.

Figura 16. Marcação imunofluorescente de células neuronais – NeuN (vermelho) no subcampo CA1 (região adjacente à lesão) de ratos controle (salina) ou tratados (NMDA) 1 e 4 semanas após a microinjeção. Núcleos celulares marcados com DAPI (azul).

A figura 17 mostra a expressão de GFAP e NeuN na região do subcampo CA1 que recebeu NMDA (área lesada), 1 semana após a microinjeção. Também como esperado, observamos intensa e desorganizada proliferação glial (verde) na área lesada, evidenciada pela expressão de GFAP (linha superior), associada a núcleos marcados com DAPI (azul), vistos na sobreposição das imagens. Além disso, observamos quase 100% de morte neuronal (vermelho) nesta área, evidenciada pela ausência de NeuN-IC (linha inferior). Uma vez que os núcleos marcados com DAPI nestas imagens não podem ser relacionados a neurônios, estes provavelmente se referem a núcleos de células gliais.

A figura 18 mostra a expressão de GFAP e NeuN na região do subcampo CA1 que recebeu NMDA (área lesada), 4 semanas após a microinjeção. A expressão de GFAP (verde) observada nesta área após 4 semanas também mostra proliferação glial (linha superior). Entretanto, de menor intensidade quando comparada àquela que ocorre 1 semana após NMDA (resultado anterior). A marcação dos núcleos com DAPI (azul) e a sobreposição das imagens mostram a expressão de GFAP associada a estes núcleos principalmente no canto superior esquerdo. Observe que esta associação não ocorre de forma intensa com a camada densa e organizada de núcleos no centro da imagem. Diferentemente dos resultados obtidos 1 semana após NMDA, a análise após 4 semanas mostra a expressão de NeuN (vermelho) na área lesada. Aqui, a sobreposição das imagens mostra que a expressão de NeuN está principalmente associada à camada densa e organizada de núcleos marcados com DAPI (azul) no centro da imagem.

A análise qualitativa destes resultados sugere que mecanismos de plasticidade podem ter sido ativados pela excitotoxicidade do NMDA resultando na migração de células neuronais para a área lesada.

Figura 17. Marcação imunofluorescente de células gliais – GFAP (verde) e neuronais – NeuN (vermelho) na região do subcampo CA1 que recebeu NMDA (área lesada) 1 semana após a microinjeção. Núcleos celulares marcados com DAPI (azul).

Figura 18. Marcação imunofluorescente de células gliais – GFAP (verde) e neuronais – NeuN (vermelho) na região do subcampo CA1 que recebeu NMDA (área lesada) 4 semanas após a microinjeção. Núcleos celulares marcados com DAPI (azul).

5. Discussão

De acordo com o perfil clássico de distribuição dos receptores AMPA no hipocampo de ratos (Danbolt, 2001; Ozawa et al., 1998), os resultados obtidos neste estudo para os animais controle mostram a presença de células imunopositivas para as subunidades GluR1 e GluR2 em todas as áreas hipocampais, indicando tanto a especificidade de ligação dos anticorpos utilizados como o padrão de distribuição descrito para estas subunidades.

Considerando as alterações na expressão de GluR1 e GluR2 induzidas pela microinjeção de NMDA, o número de células positivamente marcadas para a subunidade GluR1 na região da área CA1 onde o NMDA foi administrado aumentou significativamente nos animais analisados 1, 2 e 4 semanas pós-lesão, enquanto nos animais analisados 24 horas pós-lesão não foram observadas alterações.

Sabe-se que os receptores glutamatérgicos do tipo AMPA são combinações de subunidades com diferentes permeabilidades ao íon Ca^{2+} . A subunidade GluR1 é altamente permeável enquanto a subunidade GluR2 é impermeável (Pellegrini-Giampietro, 2003) e a proporção destas subunidades na composição do receptor determina o influxo do íon através dele. A incorporação da subunidade GluR2 altera as propriedades dos AMPARs devido a presença de uma arginina no poro do canal, impedindo a entrada de íons Ca^{2+} e permitindo somente a entrada de íons Na^+ (Lee et al. 1998; Mahajan et al 2012). O códon para arginina é inserido no RNAm que codifica a subunidade GluR2 por uma enzima de edição. Devido a esse processamento, o GluR2 exerce um papel fundamental em modular a transmissão sináptica (Mahajan et al. 2012). Embora a maior parte dos AMPARs são impermeáveis ao Ca^{2+} em condições normais, foi demonstrado aumento dos níveis de AMPARs permeáveis em condições neurodegenerativas (Carriedo et al., 1996; Van Den Bosch et al., 2006). A redução nos

níveis de GluR2 descrita no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer ((Akbarian, Smith, & Jones, 1995; Mattson & Chan, 2003) leva a uma *down regulation* da permeabilidade do receptor aumentando o influxo de Ca^{2+} .

A proporção de subunidades permeáveis e impermeáveis nos AMPARs, razão GluR1:GluR2 principalmente, tem sido demonstrada ser variável dependendo de inúmeros fatores como a região cerebral, o estágio de desenvolvimento e maturação do SNC, a integridade cerebral, a natureza e intensidade de estímulos fisiológicos ou patológicos, mecanismos de plasticidade, entre outros fatores (Weiss & Sensi, 2000). Nesse estudo, a microinjeção intraipocampal de NMDA resultou em mudanças temporais distintas na expressão das subunidades GluR1 e GluR2. Considerando especificamente o subcampo CA1, a expressão de GluR1 na região adjacente à lesão aumentou, enquanto a expressão de GluR2 diminuiu durante todo o curso temporal estudado. Essas alterações resultam no aumento da razão GluR1:GluR2 com consequente influxo de Ca^{2+} nessa área, provavelmente ocasionando um processo neurotóxico.

Os resultados histológicos mostraram que a morte celular no subcampo CA1 pode ser notada 1 semana após a injeção de NMDA mas não após 24 horas (resultados não apresentados). Esses achados são consistentes com o aumento da expressão da subunidade GluR1 que é altamente permeável ao Ca^{2+} encontrado nos animais 1 semana após a microinjeção e não nos animais 24 horas após. É provável que os mecanismos de neurotoxicidade tenham sido disparados imediatamente após a injeção de NMDA, mas as alterações na expressão de GluR1 no período de 24 horas não foram detectadas pelo método utilizado neste estudo. Entretanto, a expressão de GluR2 apresentou uma diminuição significativa 24 horas após a injeção de NMDA, sugerindo que a redução do

GluR2 como regulador do influxo de Ca^{2+} através dos receptores AMPA é parte do mecanismo de toxicidade desencadeado primeiramente pelo NMDA e que resulta na morte neuronal.

Considerando o curso temporal estudado, foram observadas alterações na expressão das subunidades até 4 semanas após a injeção de NMDA. Enquanto este agonista ativa mecanismos de toxicidade imediatamente, a neurodegeneração ativa mecanismos de plasticidade neuronal com o objetivo de manter a integridade funcional do hipocampo (Zhang et al., 2011). O glutamato, através da interação com diferentes receptores, é responsável por manter a excitabilidade em resposta ao alto influxo de Ca^{2+} , o que é crucial para a proliferação celular, neurogênese, sinaptogênese, entre outros mecanismos de plasticidade e regeneração neuronal (Molnar, Pickard, and Duckworth 2002; Yan et al. 2012). O envolvimento dos AMPARs na mediação da transmissão sináptica rápida contribui para a plasticidade sináptica que fundamenta o aprendizado e a memória (Malinow, 2003). Peleg-Raibstein e cols. (2005) e Ge e cols. (2006) mostraram que especificamente a presença da subunidade GluR1 está ligada à formação da potenciação de longa duração (LTP), a qual é essencial para o fortalecimento e efetividade das sinapses durante o desenvolvimento pós-natal e também na recuperação do cérebro após trauma (Zhang et al., 2011).

Adicionalmente, foi demonstrado que a subunidade GluR1 exerce um papel fundamental na mediação da plasticidade sináptica e na cognição (Malinow & Malenka, 2002). Baseado nessas evidências, nossos resultados sugerem que as alterações na expressão das subunidades GluR1 e GluR2 até 4 semanas após a injeção de NMDA podem estar envolvidas nos mecanismos de plasticidade ativados pela lesão.

Os resultados obtidos nos experimentos de imunofluorescência mostraram que especificamente a região do subcampo CA1 que recebeu a microinjeção de NMDA (área lesada), apresentou escassez de neurônios marcados para NeuN após 1 semana. Este achado corrobora os resultados mostrados no Cap. I utilizando a coloração de Nissl, onde a perda de quase 100% das camada celular confirmou a morte neuronal após a microinjeção de NMDA. Adicionalmente, observamos intensa proliferação glial nesta região, evidenciando a gliose característica decorrente de insultos neuronais, uma vez que a *up-regulation* da proteína acídica fibrilar glial (GFAP) por astrócitos é uma resposta espontânea do SNC às lesões, o que contribui significativamente para a gliose reativa e formação de cicatriz glial após alguma lesão cerebral (Sofroniew, 2009). Nos animais avaliados 4 semanas após a microinjeção de NMDA observamos a presença de alguns neurônios NeuN-positivos na região lesada, sugerindo uma possível tentativa de reorganização desta região 1 mês após a indução da lesão. Inúmeros achados da literatura tem demonstrado a ocorrência de um processo contínuo de geração de novos neurônios durante a vida adulta em algumas regiões específicas do cérebro, como na zona subgranular do giro denteado do hipocampo e na zona subventricular do ventrículo lateral (Ming & Song, 2005) e esse processo tem sido considerado um recurso potencial para a reparação de danos hipocampais após lesões e traumas (Gao & Chen, 2013).

Podemos afirmar que os neurônios NeuN-positivos encontrados nos animais 4 semanas após a microinjeção não expressam GluR2, uma vez que nesse período (NMDA-4 sem) observamos a ausência de marcação na área lesada para essa subunidade, em neurônios. Apenas células da glia mostraram-se positivas para GluR2 (dados não apresentados). Como mencionado anteriormente, células gliais também podem expressar AMPARs (Cull-Candy et al., 2006). Em relação à subunidade GluR1 observamos a presença de poucos neurônios positivos na área da lesão. Uma vez que

foram observados neurônios positivos para NeuN neste período, podemos estabelecer uma relação entre estes e aqueles que expressam GluR1. Esta relação nos permite sugerir que esses neurônios podem estar envolvidos em um mecanismo de plasticidade neuronal ativado pela lesão, uma vez que foi descrita a participação da subunidade GluR1 nesses mecanismos (Malinow, 2003). Entretanto, nossos resultados não permitem afirmar que esses neurônios sejam funcionais, uma vez que os animais deste grupo experimental (NMDA-4 sem) permaneceram com déficit comportamental no LAM.

Evidências recentes mostram relações entre a função de novos neurônios na região hipocampal com tarefas de aprendizado e memória. Alguns pesquisadores tem relatado aumento da neurogênese no hipocampo de animais treinados no LAM (Epp, Scott, and Galea 2011; Inostroza et al. 2011; Chow et al. 2012) ou submetidos ao exercício físico associado a tarefas envolvendo aprendizagem (Chow et al., 2012). Especificamente com relação aos AMPARs, Huang e cols. (2010) encontraram aumento na expressão de GluR1 no subcampo CA1 de ratos com prejuízo no desenvolvimento fetal após terem sido expostos ao LAM. Esse resultado mostrou que a exposição a testes comportamentais pode melhorar a capacidade de aprendizagem e memória e que a expressão aumentada de GluR1 no CA1 hipocampal está provavelmente relacionada com essas funções (Huang, Sun, Gou, & Zhang, 2010). Complementando esta hipótese, Okada et al. (2003) demonstraram que o aumento do influxo de Ca^{2+} através dos AMPARs nos neurônios do subcampo CA1 facilita o comportamento de aprendizagem.

Nesse contexto, os resultados encontrados neste estudo demonstraram que apenas a exposição ao LAM não foi suficiente para ativar a expressão das subunidades dos AMPARs, uma vez que os animais dos grupos controle (salina) que foram expostos ao LAM não apresentaram diferenças significativas na expressão de GluR1- ou GluR2-

IC quando comparados aos animais tratados com salina mas não submetidos ao LAM. O conjunto das evidências descritas na literatura e os resultados encontrados neste trabalho indicam que apenas o teste comportamental não é suficiente para ativar os mecanismos de plasticidade e reparo. Entretanto, uma vez que esse teste envolve exercício físico e processos de aprendizagem e memória, o mesmo se torna importante no desencadeamento da plasticidade se somado ao estímulo excitotóxico.

Considerando outro aspecto, não podemos também afirmar que os neurônios marcados com NeuN nos animais 4 semanas após a lesão tratam-se de novos neurônios, uma vez que não foi utilizado um marcador específico para estas células como BrdU (Bromodeoxyuridina). Entretanto, a ausência de neurônios marcados para NeuN observada nos animais 1 semana após a lesão permite sugerir que os neurônios presentes na área da lesão após 4 semanas podem ser células da zona subgranular do giro denteado do hipocampo que migraram para a área lesada com a finalidade de repará-la. Esta hipótese é sustentada pelos achados recentes de Gao & Chen (2013), os quais encontraram aumento no número de células BrdU-positivas no hipocampo de camundongos após trauma cerebral. Embora os autores tenham demonstrado que essas células eram predominantemente gliais, uma pequena população de neurônios granulares BrdU-positivos foram identificados e os autores discutem que o trauma cerebral ativa mecanismos inatos de plasticidade e reparo através de proliferação de células progenitoras. Neste contexto, experimentos utilizando amostras de cérebros humanos mostraram que a fita de astrócitos localizada na periferia dos ventrículos laterais *in vivo* se comportam como células neurais progenitoras quando cultivadas *in vitro* (Sanai et al. 2004).

Sob um outro foco, Ming & Song (2005) descreveram que tipos específicos de lesões podem ativar a neurogênese através de células neurais endógenas progenitoras

em regiões onde a neurogênese adulta é limitada ou inexistente. Entretanto, os autores discutem que não está claro se esses novos neurônios são funcionais. Esses achados contribuem para justificar os resultados obtidos neste trabalho para os animais lesados com NMDA e submetidos ao teste de memória no LAM após 4 semanas, os quais permaneceram com o déficit cognitivo.

O conjunto dos resultados encontrados neste trabalho referentes às alterações na expressão de GluR1 e GluR2, GFAP e NeuN, na área lesada do CA1 ao longo de 1 mês após a indução da lesão, sugerem que estas subunidades AMPA estão envolvidas em mecanismos distintos ativados em eventos temporalmente diferentes, i) mecanismos excitotóxicos que levam à morte celular no período pós-lesão inicial e ii) mecanismos de plasticidade no período pós-lesão final estudado.

A expressão de GluR1 e GluR2 observada no subcampo CA3 e no HGD neste estudo mostram características diferentes. Em CA3 encontramos aumento para GluR1 e nenhuma alteração para GluR2, enquanto no HGD a expressão de ambas as subunidades aumentaram em todos os períodos pós-lesão estudados. Considerando as características da região do giro denteado (GD), foi mencionado anteriormente que a zona subgranular desta região é uma área cerebral rica em células progenitoras; e o GD pode ser subdividido em áreas distintas conforme o tipo celular característico. O aumento da expressão de GluR1 em CA3 e HGD e de GluR2 no HGD pode estar relacionado ao surgimento de novas células ou a uma mudança na composição dos receptores AMPA de acordo com os mecanismos de plasticidade desencadeados em resposta ao estímulo lesivo.

Foi demonstrado que ao transmitir as informações oriundas do córtex, o GD atua como um filtro capaz de impedir a exacerbação da propagação do circuito para CA3 e

deste para CA1 (Zhang et al., 2011), sugerindo que qualquer perda neuronal no GD é capaz de perturbar o equilíbrio normal entre excitação e inibição dessa área. As descargas elétricas cerebrais no GD são controladas por pelo menos 5 tipos de interneurônios GABAérgicos, os quais desempenham um papel crucial no controle da interação córtex-hipocampo e na manutenção da integridade do GD (Zhang et al., 2011). A perda neuronal na região do hilus provocaria uma redução da inibição resultando em um aumento da excitabilidade do GD. Além disso, os interneurônios presentes no GD expressam proteínas ligantes de Ca^{2+} , as quais são capazes de fazer o tamponamento deste íon em excesso (Do Nascimento et al., 2012). Estas características contribuem para explicar a susceptibilidade à neurodegeneração diferenciada em cada região, uma vez que os neurônios com pouca ou nenhuma proteína ligante de Ca^{2+} seriam mais suscetíveis à morte celular desencadeada por excitotoxicidade. Portanto, é razoável postular uma relação entre a densidade de proteínas ligantes de Ca^{2+} nos neurônios do GD e o padrão de morte celular por excitotoxicidade nesta região. Todas estas características associadas ao fato de que o sítio de administração do agonista NMDA em nosso modelo de lesão foi CA1 e não o GD contribuem para explicar a baixa suscetibilidade dos neurônios desta região à morte por excitotoxicidade. Adicionalmente, o aumento em níveis diferentes da expressão das subunidades AMPA no HGD encontrado em nosso estudo mostra que a razão GluR1:GluR2 foi alterada no período de 1 semana pós-lesão a favor de GluR1 e sugere maior vulnerabilidade celular à excitotoxicidade neste período. Embora esta condição tenha se mantido no período de 2 semanas, os níveis foram mais baixos. Entretanto, no período de 4 semanas pós-lesão não observamos alteração na expressão de nenhuma subunidade e a razão GluR1:GluR2 foi mantida, sugerindo que estes receptores possam participar dos mecanismos de manutenção da integridade do GD após o estímulo neurotóxico.

Em contraste, o aumento na expressão de GluR1 e nenhuma alteração na expressão de GluR2 observadas em CA3 faz com que ocorra um aumento da razão GluR1:GluR2 a favor de GluR1, o que provavelmente contribui para a vulnerabilidade celular aos mecanismos neurotóxicos. Resultados semelhantes foram encontrados por Jiang e cols. (2008) no modelo de indução de crises em culturas de células hipocâmpais jovens. Os pesquisadores demonstraram aumento de GluR1 e alterações diferentes para GluR2 dependendo do período avaliado.

Os mecanismos cerebrais envolvidos na lesão, plasticidade ou reparo, entre muitos outros desencadeados em resposta à injeção intraipocâmpal de NMDA, são extremamente complexos e envolvem outras áreas cerebrais e neurotransmissores além do hipocampo e do glutamato (Bowie, 2008). Os resultados deste estudo mostram que o balanço entre GluR1 e GluR2 pode diferir em cada um dos períodos avaliados. Além disso, as subunidades de AMPA possuem 2 isoformas, flip e flop, com propriedades cinéticas distintas. A presença de flip ou flop na composição do receptor pode influenciar a entrada de cálcio, sendo que a isoforma flip permite um maior influxo desse íon (Mosley & Gendelman, 2010). Além disso, foi demonstrado por Nascimento e cols. (2012) que, em função da área afetada, os processos de morte neuronal e gliose podem ocorrer dentro de poucas horas ou após semanas, evidência que contribui para justificar as variações encontradas em nossos resultados. Considerando o “loop” glutamatérgico no hipocampo (Bloodgood & Sabatini, 2008), que envolve a comunicação sináptica entre HGD, CA3 e CA1, e todas as evidências descritas acima, é possível sugerir que nossos resultados podem estar relacionados com o complexo mecanismo disparado pelo hipocampo em resposta à injeção de NMDA, o qual resulta em uma lesão local e na ativação da plasticidade neuronal.

Além disso, o presente trabalho no qual utilizamos a injeção intraipocampal de NMDA pode ser um modelo de estudo para o processo neurodegenerativo mostrando distintas alterações temporais na expressão dos receptores AMPA no hipocampo. Os mecanismos glutamatérgicos que fundamentam esse processo continuam não sendo totalmente esclarecidos e novos estudos são necessários para aprofundarmos tal conhecimento, o qual poderá contribuir no desenvolvimento de novas drogas e alvos terapêuticos utilizados para o tratamento das doenças neurodegenerativas.

Finalmente, a lesão induzida por NMDA mostrou um curso temporal de diferentes alterações na expressão dos receptores AMPA no hipocampo que impacta de uma forma muito complexa os mecanismos glutamatérgicos envolvidos neste processo.

Capítulo III

**Avaliação da atividade neuroprotetora da Parawixina 10 no modelo de lesão
excitotóxica por NMDA em ratos Wistar**

1. A aranha *Parawixia bistriata* (*Araneidae: Araneae*)

A *Parawixia bistriata* é uma aranha semi-colonial encontrada na América Central e América do Sul, principalmente na região sudeste do Brasil (Levi, 1992). Possui hábitos de caça noturnos e quiescência diurna, se agrupando em ninhos.

Estudos com a peçonha de *P. bistriata*, utilizando sinaptossomas preparados com o córtex cerebral de ratos (SCCR) demonstraram que a peçonha desnaturada provoca uma potente inibição da recaptação do GABA, e estimula enormemente a recaptação do *L*-Glu (Fontana et al., 2003).

Em bioensaios em térmitas (*Sintermes sp*), a peçonha bruta de *P. bistriata* causou paralisia irreversível de maneira dependente de dose, quando injetada por via retal (Pizzo et al., 2000). A injeção intracerebroventricular (i.c.v) da peçonha dessa aranha, assim como frações mais puras, aboliram crises tônico-clônicas induzidas por injeção de picrotoxina, PTZ e bicuculina em ratos (Cairrão et al., 2002).

Após o processo de separação por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD), uma fração da peçonha de *P. bistriata*, atualmente denominada FrPbAII, mostrou-se um potente inibidor da captação do GABA em SCCR como também em sinaptossomas preparados com retinas de ratos (Beleboni et al., 2004). Outros resultados demonstraram que a injeção por via i.c.v da FrPbAII inibe significativamente crises convulsivas induzidas por bicuculina em ratos (Cairrão et al., 2002). Este composto mostrou-se neuroprotetor no modelo de glaucoma experimental em ratos, bem como no modelo de isquemia/reperfusão em retinas de rato, reduzindo a morte celular e mantendo a morfologia normal de todas as camadas de células retinianas

(Beleboni et al., 2006). Outros estudos mostraram que esse composto também apresenta efeitos ansiolíticos e anticonvulsivantes (Liberato et al., 2006). Beleboni e cols (2006) mostraram que a FrPbAII, isolada da peçonha de *P. bistrata*, atua primariamente e diretamente nos transportadores de GABA e glicina, característica que a torna uma importante ferramenta no estudo da neuroproteção.

A Parawixina1, também purificada da peçonha da *P. bistrata*, estimula a captação de *L*-Glu em SCCR de maneira dose dependente, e parece mediar esse efeito aumentando a V_{max} para a captação de *L*-Glu sem alterar a K_m (Fontana et al., 2003). Isso sugere que o componente ativo pode atuar aumentando o carreamento ou, alternativamente, aumentando o número de moléculas transportadoras funcionais na superfície da célula. Observou-se também um efeito neuroprotetor da Parawixina1 tanto para isquemia quanto para isquemia/reperfusão de retinas, no modelo de glaucoma experimental em ratos. Quando testado em células COS (células imortalizadas derivadas de rim de macacos africanos), expressando os subtipos de transportadores de glutamato, este composto estimulou o aumento da captação do *L*-Glu pelo subtipo EAAT2 (Fontana et al., 2003). Fontana e cols. (2007) relatam que essa substância promove um aumento direto do influxo de *L*-Glu pelo subtipo de transportador EAAT2 através de um mecanismo que não altera a aparente afinidade para os co-substratos *L*-Glu e sódio.

Outro composto também isolado da aranha *P. bistrata*, a Parawixina 10, tem sido estudada e os resultados obtidos até agora demonstraram que o mesmo possui efeito anticonvulsivante em ratos submetidos à indução química aguda de crises convulsivas por ácido caínico e NMDA (via i.c.v) e PTZ (i.p.). Além disso, a Parawixina 10 promoveu um considerável aumento na recaptação de *L*-Glu e glicina em SCCR e também estimulou a liberação de GABA (Fachim et al., 2011).

Nas últimas décadas, grandes esforços têm sido empregados na tentativa de descobrir novas substâncias ou associações entre substâncias já existentes que poderiam ser mais efetivas no bloqueio de processos de lesão do tecido nervoso, como as doenças crônicas neurodegenerativas, traumatismos, *Status epilepticus* (SE) e processos isquêmicos decorrentes de alterações vasculares em modelos animais ou em testes clínicos (Löscher, 2002; Pitkänen & Sutula, 2002). No entanto, até o momento nenhuma droga ou esquema politerapêutico conseguiu bloquear a morte de neurônios decorrente destes estímulos. Nesse sentido, a utilização de toxinas animais com ação no SNC pode significar o surgimento de novos compostos a serem utilizados como ferramentas para o estudo dos processos patológicos ou como modelos para prospecção de novos agentes terapêuticos co-adjuvantes.

Uma vez demonstrada a ação das toxinas da aranha *Parawixia bistriata* no transporte de neurotransmissores clássicos do SNC envolvidos nas alterações cerebrais induzidas por diferentes estímulos, torna-se importante verificar a atividade destas toxinas e seus possíveis efeitos neuroprotetores em diferentes modelos de lesão cerebral, como a injeção excitotóxica induzida pela microinjeção de NMDA no hipocampo dorsal de ratos.

2. Objetivo

Estudar o potencial neuroprotetor da Pwx 10 no modelo de lesão excitotóxica induzida pela microinjeção do agonista NMDA no hipocampo dorsal de ratos. Para atingir este objetivo foi utilizada a coloração de Nissl com violeta de cresila.

3. Material e Métodos

Os cuidados com os animais e os procedimentos de sacrifício, perfusão e processamento do tecido cerebral são idênticos àqueles descritos nos itens 3.1 e 3.3 do Capítulo I.

O método da coloração de Nissl, a quantificação dos neurônios e a análise estatística dos resultados obtidos neste estudo são idênticos aos itens 3.5 e 3.6 do Capítulo I.

3.1. Cirurgia, injeção intraipocampal de NMDA e tratamento com a Pwx 10

Para avaliar o potencial neuroprotetor da Pwx 10 foram utilizados os seguintes grupos experimentais (n=06/cada): 1) *Salina-1 semana*; 2) *NMDA-1 semana*; 3) *NMDA-1 semana tratado com Pwx 10 1h após a cirurgia*; e 4) *NMDA-1 semana tratado com Pwx 10 24h após a cirurgia*. Cada grupo foi sacrificado no período designado após receberem a injeção de solução salina ou NMDA por via intraipocampal. Os grupos tratados com a Pwx 10 receberam uma injeção diária no ventrículo lateral direito de Pwx 10 (2,5 µg/ µL) no período de 1 semana, sempre no mesmo horário, cada um iniciando o tratamento 1 hora após a injeção de NMDA ou 24 horas após a injeção de NMDA. A concentração da Pwx 10 foi escolhida de acordo com a ED₅₀ para crises agudas induzidas por NMDA em ratos Wistar (Fachim et al., 2011).

Na figura 1 estão ilustrados todas as etapas experimentais realizadas nesse capítulo.

Figura 1. Sequência das etapas experimentais realizadas para o estudo da atividade neuroprotetora da Pwx 10 no hipocampo de ratos Wistar após lesão induzida pela microinjeção local de NMDA.

4. Resultados

4.1. Avaliação histológica da lesão induzida por NMDA no hipocampo após tratamento com Pwx 10

Podemos observar que após o tratamento com a Pwx 10, tanto iniciando 24 horas quanto 1 hora após a injeção de NMDA, ocorreu uma diminuição da proliferação glial em todos os subcampos hipocâmpais estudados, assim como uma preservação das camadas celulares em relação ao grupo injetado com NMDA (Fig.2), mantendo as características do grupo controle. Este efeito foi especialmente observado nos animais que receberam a Pwx 10 1h após a microinjeção de NMDA.

Figura 2. Coloração de Nissl nos subcampos CA1, CA3 e HGD dos grupos controle (salina) e tratados (NMDA) após tratamento com a Pwx 10 em cada período estudado (1 hora e 24 horas).

Essa avaliação qualitativa pode ser confirmada pelos dados quantitativos que estão mostrados nas figuras 3, 4 e 5. No subcampo CA1, como esperado, observamos uma redução do número de células coradas com Nissl nos animais que receberam NMDA quando comparados aos que receberam salina. Entretanto, quando comparamos os grupos tratados com Pwx 10, 1h ou 24h após a microinjeção de NMDA com o grupo tratado com salina observamos o efeito neuroprotetor da Pwx 10, uma vez que não foram detectadas diferenças significativas (Fig. 3). Quando os animais tratados com Pwx 10 foram comparados aos animais lesados com NMDA-1 semana, observamos um aumento no número de células coradas com Nissl nos dois grupos tratados com Pwx 10, confirmando a preservação da camada celular. Esse aumento foi de 44 % no grupo que recebeu a Pwx 10 24h após a microinjeção de NMDA e 83% no grupo que recebeu a Pwx 10 1h após $[F(3,23)= 37,39 ; P< 0,001]$ (Fig. 3).

No subcampo CA3 observamos resultados semelhantes aos observados em CA1 ou seja, a preservação da camada celular pela Pwx 10. Quando os animais tratados com Pwx 10 foram comparados com os animais tratados com salina observamos apenas uma pequena redução entre os animais do grupo Pwx 10 e os do grupo salina, sendo essa redução de 8 % nos animais do grupo Pwx 10 1h e de 15% nos animais do grupo Pwx 10 24h $[F(3,23)= 12,52; P<0,0001]$. Entretanto, quando comparados os grupos tratados com Pwx 10 ao grupo NMDA- 1 semana, observamos um aumento no número de células coradas com Nissl, embora esse aumento tenha sido menos robusto do que o observado em CA1, 6 % no grupo Pwx 10 24h e 14 % no grupo Pwx 10 1h $[F(3,23)= 12,52; P<0,0001]$ (Fig. 4).

No HGD os resultados seguiram o mesmo perfil observado em CA1. Os grupos tratados com a Pwx 10 não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo

tratado com salina, o que mostra o efeito neuroprotetor da Pwx 10. Este efeito é confirmado pelo aumento expressivo do número de neurônios corados com Nissl nos grupos tratados com Pwx 10 quando comparados ao grupo tratado com NMDA. Esse aumento foi de 81 % no grupo que recebeu a Pwx 10 1h após a microinjeção de NMDA e 143 % no grupo que recebeu a Pwx 10 24h após [F(3,23)= 13,18; P< 0,0001] (Fig. 5).

Figura 3. Número de neurônios no subcampo CA1 nos animais dos grupos: Salina 1 semana, NMDA 1 semana, Pwx 10 24 horas e Pwx 10 1 hora. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM do número de células quantificadas bilateralmente, em três secções/animal (n=6). *P< 0,05; ***P<0,0001. (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

Figura 4. Número de neurônios no subcampo CA3 nos animais dos grupos: Salina 1 semana, NMDA 1 semana, Pwx 10 24 horas e Pwx 10 1 hora. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM do número de células quantificadas bilateralmente, em três secções/animal (n=6). **P< 0,001. (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

Figura 5. Número de neurônios no HGD nos animais dos grupos: Salina 1 semana, NMDA 1 semana, Pwx 10 24 horas e Pwx 10 1 hora. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM do número de células quantificadas bilateralmente, em três secções/animal (n=6). **P< 0,001; ***P< 0,0001. (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

5. Discussão

Muitas neurotoxinas apresentam alta afinidade e seletividade dirigidas para receptores, transportadores e canais iônicos neuroniais ou gliais (Meinwald & Eisner, 1995), dentre elas estão as peçonhas de aranhas que são consideradas importantes fontes de moléculas neuroativas, atuando especificamente em tipos distintos de canais iônicos (Rash & Hodgson, 2002). Essas moléculas possuem um grande potencial no estudo da neurociência, uma vez que atuam pré e pós-sinapticamente, podendo modular as neurotransmissões (Rash & Hodgson, 2002).

A análise detalhada da estrutura e da atividade das moléculas neuroativas, além de permitir um melhor entendimento da organização e do funcionamento do SNC, também possibilita o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de patologias do SNC (Meinwald & Eisner, 1995).

Tendo em vista o potencial neuroprotetor da Pwx 10 isolada e caracterizada em nosso laboratório (Fachim et al., 2011) e sua atuação sobre o sistema glutamatérgico, neste estudo utilizamos esta molécula com o intuito de tratar e/ou amenizar a lesão excitotóxica causada por NMDA no hipocampo de ratos.

Na tentativa de visualizar seu efeito neuroprotetor, foi administrada uma dose diária de Pwx 10, no período de uma semana em ratos que receberam injeção intraipocampal de NMDA.

De acordo com nossos resultados, observamos que o tratamento com a Pwx 10 foi eficiente nesse tipo de lesão, fazendo com que o número de células nas regiões avaliadas após a injeção de NMDA e tratadas com a Pwx 10 aumentassem expressivamente em relação aos animais injetados com NMDA e não tratados. Esse dado acrescenta mais uma evidência ao potencial terapêutico da Pwx 10, uma vez que em nossos achados anteriores a Pwx 10 demonstrou ter potencial anticonvulsivante por

bloquear a ocorrência de crises agudas induzidas por NMDA, PTZ e KA em ratos (Fachim et al., 2011). Portanto, além do efeito anticonvulsivante no modelo de indução de crises agudas, também possui potencial neuroprotetor no modelo utilizado nesse trabalho.

Esse efeito pode ser atribuído à atuação da Pwx 10 no transporte de glutamato, uma vez que em pequenas concentrações essa neurotoxina aumenta a recaptação desse neurotransmissor em sinaptossomas cerebrocorticais de ratos Wistar (Fachim et al., 2011), fazendo com que o excesso dessa neurotransmissão, provocada pela injeção de NMDA, seja atenuada por atuar no mecanismo de transporte desse aminoácido excitatório. Atividade semelhante, com atuação no transporte glutamatérgico, foi encontrada em outro composto da *P. bistriata*, a Parawixina 1, a qual promoveu um aumento do influxo de glutamato pelo transportador EAAT2 em lipossomas e células COS-7 de maneira direta e seletiva, através de um mecanismo que não altera a afinidade dos seus co-substratos, sódio e LGlu, não aumentando, desse modo, o transporte reverso (Fontana et al. 2007).

Além disso, a neuroproteção encontrada após o tratamento com a Pwx 10 pode ter ocorrido devido ao período no qual o tratamento foi iniciado, sendo que com 1h e 24h após a injeção de NMDA os mecanismos de morte neuronal desencadeados pela excitotoxicidade podem ter sido bloqueados ou amenizados pela Pwx 10. Evidências baseadas na literatura mostram que a morte neuronal após um insulto varia de acordo com a região cerebral estudada e com o tipo celular analisado (Do Nascimento et al., 2012; Fujikawa, 1996). As evidências mostraram que pico de morte neuronal (células positivas para Fluoro-Jade) no HGD e no GD ocorreram entre 3 e 12 horas após o *status epilepticus* em ratos, enquanto o maior dano nos neurônios piramidais nos subcampos CA1 e CA3 foram visualizados após 1 semana. Além disso, nossos resultados referentes

à gliose decorrente da lesão induzida por NMDA mostram um aumento expressivo de células GFAP-positivas na camada CA1 e CA3 após 1 semana.

O mecanismo pelo qual a Pwx 10 atua no transporte de glutamato permanece desconhecido e estudos mais específicos são necessários para esclarecê-lo. Assim como a Pwx 10, outras neurotoxinas de aranha possuem afinidade por canais iônicos e receptores do SNC, dentre elas a argiotoxina 636, um antagonista não-competitivo de NMDA (Moe et al. 1997), a JsTx-3 (um análogo da Jorotoxina) que bloqueia a atividade epileptiforme tanto em secções hipocâmpais de rato quanto de humanos (Salamoni et al. 2005). Algumas toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* (PhTx-3, Tx3-3, Tx3-4) foram neuroprotetoras no modelo de indução de isquemia da retina (Agostini et al. 2011) e a PhTx-56, um análogo da phillanthotoxina-433, atua como potente e seletivo antagonista dos receptores AMPA (Andersen, Vogensen, Jensen, Knapp, & Strømgaard, 2005) e no transporte de glutamato inibindo sua recaptação de maneira dose dependente.

Dada a associação da morte celular atribuída à excitotoxicidade do glutamato com acidente vascular cerebral, traumatismo craniano, isquemia, dentre outros insultos (Niciu et al., 2012), várias alternativas têm sido estudadas na tentativa de atenuar a lesão neuronal, seja reduzindo a função do receptor de glutamato, ou modulando o transporte do mesmo. Em modelos animais de isquemia, tem-se especulado que o insulto isquêmico provoca a diminuição da subunidade GluR2 fazendo com que aumente a permeabilidade de Ca^{2+} através de receptores AMPA, eventualmente levando à morte celular neuronal. Curiosamente, os AMPARs permeáveis são altamente expressos em neurônios piramidais do CA1, e esta área do hipocampo é mais vulnerável à morte celular após um insulto isquêmico ou crise convulsiva do que outras regiões do hipocampo (para revisão ver Chang, Verbich, & McKinney, 2012). Alguns antagonistas

de AMPARs parecem ser mais efetivos na prevenção da morte neuronal do que os antagonistas de NMDARs, evidenciando a importância da modulação desses receptores como alvos terapêuticos. Nesse contexto as poliaminas aparecem como importantes moduladores dos AMPARs, uma vez que quando a subunidade GluR2 está ausente na sua composição, esse receptor se torna sensível ao bloqueio por poliaminas (Bowie, 2012). Além disso, os receptores NMDA possuem na sua estrutura um sítio para poliaminas, localizado na região extracelular da subunidade NR2B. A ligação de poliaminas nesse sítio possui ação regulatória, podendo contribuir ou proteger a célula do dano excitotóxico (Ozawa et al., 1998).

Dentre as toxinas isoladas de aranhas que atuam sobre a transmissão glutamatérgica, estão as acilpoliaminas ou poliaminas amidas (Strømgaard, Jensen, & Vogensen, 2005). As investigações sobre os efeitos farmacológicos das poliaminas presentes em toxinas demonstraram que estes compostos interagem com vários alvos importantes em insetos, tanto na periferia quanto no sistema nervoso central (SNC), bem como no SNC de mamíferos (Strømgaard et al., 2005). Uma vez que o glutamato é o primeiro mensageiro químico presente nas junções neuromusculares de insetos, não seria de se surpreender que os iGluRs de insetos sejam os principais alvos das poliaminas presentes em toxinas (Mellor & Usherwood, 2004). Esses compostos estão presentes nas peçonhas de *Nephila clavata* e *Argiope lobata*, dentre outras (Kawai, Niwa, & Abe 1982) e são antagonistas glutamatérgicos não competitivos dos receptores NMDA, AMPA e KA (Mellor & Usherwood, 2004). Dado que GluRs estão envolvidos na patofisiologia da epilepsia assim como nas crises convulsivas (Hu, Jiang, Chen, & Zhang, 2012), o bloqueio destes receptores pelas poliaminas teoricamente produziria um efeito anticonvulsivante e/ou neuroprotetor. Neste contexto, há relatos de que poliaminas possuem efeitos anticonvulsivantes em modelos de indução de crises

convulsivas. Jackson & Parks (1990) observaram que uma fração poliamínica (denominada AG2), isolada da aranha *Agelenopsis aperta* amenizou ou suprimiu as crises induzidas pela injeção de ácido cáínico, picrotoxina e bicuculina. O 1-naftilacetil espermina (1-Na-spm), que é um derivado sintético da poliamina AG2, apresentou efeito anticonvulsivante no modelo de abrasamento (“kindling”) em ratos quando injetado no ventrículo lateral (Takazawa et al., 1996).

Ainda não foi definida a estrutura da Pwx 10, porém há evidências baseadas em estudos anteriores, considerando seu fracionamento e espectrometria de massas, sugerindo que a mesma possa se tratar de uma poliamina. Isso justificaria em parte a sua atividade neuroprotetora, já que em baixas concentrações as poliaminas podem exercer atividades anticonvulsivantes e neuroprotetora (Bell, Belarde, Johnson, & Aizenman, 2011). Entretanto, em doses elevadas as poliaminas podem causar déficits nas funções de aprendizagem e memória como observado por Shimada e colaboradores (1994) quando submeteram ratos tratados com espermidina a um teste de memória no labirinto em cruz elevado.

Além disso, vale ressaltar que o bloqueio das poliaminas encontradas em peçonhas de aranhas e vespas em receptores tipo AMPA podem diferir segundo a constituição deste receptor, o qual exibe propriedades de permeabilidade diferentes devido a falta da subunidade GluR2. Nesse modelo em particular, notamos que após 24h e 1 semana da injeção de NMDA (fase na qual foi iniciado um dos tratamentos com a Pwx 10) há uma brusca diminuição das subunidades GluR2, tornando o ambiente mais sensível ao bloqueio por poliaminas. Desse modo, a Pwx 10 poderia atuar no bloqueio dos AMPARs permeáveis ao Ca^{2+} , diminuindo assim a excitotoxicidade glutamatérgica, justificando seu efeito neuroprotetor nesse modelo.

Adicionalmente aos nossos resultados, um estudo paralelo vem sendo realizado em nosso laboratório com a Pwx 10 com resultados interessantes. Quando administrada cronicamente no modelo de crises induzidas por pilocarpina em ratos Wistar, a Pwx 10 demonstrou ter efeito anticonvulsivante e neuroprotetor, aumentando a latência de crises recorrentes e diminuindo a duração média e severidade das mesmas. Além disso, não apresentou déficits comportamentais em animais tratados e expostos ao LAM (dados não publicados).

O conjunto dos resultados são evidências adicionais de que a Pwx10 possui grande potencial terapêutico e neuroprotetor, reforçando a importância da continuidade dos estudos sobre seus efeitos no SNC. Estes estudos poderão fornecer novas ferramentas para a investigação dos processos patológicos, contribuir para o esclarecimento dos mecanismos excitotóxicos, bem como novas alternativas para a prospecção de drogas que atuem no tratamento de doenças neurodegenerativas do SNC.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nos Capítulos I, II e III, podemos concluir que:

- A microinjeção de NMDA no subcampo CA1 do hipocampo dorsal de ratos Wistar causa uma lesão especificamente em CA1, caracterizada pelo prejuízo das funções de aprendizado e memória, perda de células neuronais e gliose na área lesada.
- A microinjeção de NMDA no hipocampo dorsal de ratos Wistar induz um curso temporal de diferentes alterações na expressão das subunidades GluR1 e GluR2 dos receptores AMPA nos subcampos CA1, CA3 e HGD.
- O tratamento de ratos Wistar com a Parawixina 10 administrada i.c.v a partir de 1 hora ou 24 horas após a microinjeção de NMDA no hipocampo dorsal bloqueou a morte celular induzida por este agonista nos subcampos CA1, CA3 e HGD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbarian, S., Smith, M. A., & Jones, E. G. (1995). Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimer's disease, Huntington's disease and schizophrenia. *Brain Research*, 699(2), 297–304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616634>
- Andersen, T. F., Vogensen, S. B., Jensen, L. S., Knapp, K. M., & Strømgaard, K. (2005). Design and synthesis of labeled analogs of PhTX-56, a potent and selective AMPA receptor antagonist. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(17), 5104–12. doi:10.1016/j.bmc.2005.05.023
- Bal-Price, a, & Brown, G. C. (2001). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(17), 6480–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517237>
- Bao-Liang Zhang, Chen Xin, T. T. and Z. J.-N. (2011). Traumatic brain injury impairs synaptic plasticity in hippocampus in rats., 124(2005), 740–745. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2011.05.020
- Bardgett, M E, Jacobs, P. S., Jackson, J. L., & Csernansky, J. G. (1997). Kainic acid lesions enhance locomotor responses to novelty, saline, amphetamine, and MK-801. *Behavioural Brain Research*, 84(1-2), 47–55.
- Bardgett, Mark E, Baum, K. T., O'Connell, S. M., Lee, N. M., & Hon, J. C. (2006). Effects of risperidone on locomotor activity and spatial memory in rats with hippocampal damage. *Neuropharmacology*, 51(7-8), 1156–62. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.07.014
- Bardgett, Mark E, Boeckman, R., Krochmal, D., Fernando, H., Ahrens, R., & Csernansky, J. G. (2003). NMDA receptor blockade and hippocampal neuronal loss impair fear conditioning and position habit reversal in C57Bl/6 mice. *Brain Research Bulletin*, 60(1-2), 131–142. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923003000236>
- Bear, M. F. (2005). Therapeutic implications of the mGluR theory of fragile X mental retardation. *Genes brain and behavior*, 4(6), 393–398. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16098137>
- Beleboni, O., Guizzo, R., Fontana, K., Pizzo, A. B., Oliveira, R., Carolino, G., & Gobbo-neto, L. (2006). Neurochemical Characterization of a Neuroprotective Compound from Parawixia bistriata Spider Venom That Inhibits Synaptosomal Uptake of GABA and Glycine □, 69(6), 1998–2006. doi:10.1124/mol.105.017319.aptic

- Beleboni, R. O., Carolino, R. O. G., Pizzo, A. B., Castellan-Baldan, L., Coutinho-Netto, J., Dos Santos, W. F., & Coimbra, N. C. (2004). Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. *Cellular and molecular neurobiology*, 24(6), 707–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15672674>
- Bell, M. R., Belarde, J. a, Johnson, H. F., & Aizenman, C. D. (2011). A neuroprotective role for polyamines in a *Xenopus* tadpole model of epilepsy. *Nature neuroscience*, 14(4), 505–12. doi:10.1038/nn.2777
- Bettler, B., & Mulle, C. (1995). Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, 34(2), 123–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542368>
- Bloodgood, B. L., & Sabatini, B. L. (2008). Regulation of synaptic signalling by postsynaptic, non-glutamate receptor ion channels. *The Journal of Physiology*, 586(Pt 6), 1475–1480. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096597>
- Bowie, D. (2008). Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS neurological disorders drug targets*, 7(2), 129–143. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537642>
- Bowie, D. (2009). Ionotropic Glutamate Receptors and CNA Disorders, 7(2), 129–143.
- Bowie, D. (2012). Redefining the classification of AMPA-selective ionotropic glutamate receptors. *The Journal of physiology*, 590(Pt 1), 49–61. doi:10.1113/jphysiol.2011.221689
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40), 14515–20. doi:10.1073/pnas.0406344101
- Burwell, R. D. (2000). The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 911(401), 25–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911865>
- Caban-Holt, A., Mattingly, M., Cooper, G., & Schmitt, F. a. (2005). Neurodegenerative memory disorders: a potential role of environmental toxins. *Neurologic clinics*, 23(2), 485–521. doi:10.1016/j.ncl.2004.12.005
- Cairrão, M. a. R., Ribeiro, a. M., Pizzo, a. B., Fontana, a. C. K., Beleboni, R. O., Coutinho-Netto, J., Miranda, a., et al. (2002). Anticonvulsant and GABA Uptake Inhibition Properties of Venom Fractions from the Spiders *Parawixia bistriata* and *Scaptocosa raptoria*. *Pharmaceutical Biology*, 40(6), 472–477. doi:10.1076/phbi.40.6.472.8436

- Campbell, A. (2004). Inflammation, neurodegenerative diseases, and environmental exposures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1035, 117–32. doi:10.1196/annals.1332.008
- Carriedo, S. G., Yin, H. Z., & Weiss, J. H. (1996). Motor Neurons Are Selectively Vulnerable to AMPA / Kainate Receptor-Mediated Injury In Vitro, 16(13), 4069–4079.
- Castellano, C., Cestari, V., & Ciamei, a. (2001). NMDA receptors and learning and memory processes. *Current drug targets*, 2(3), 273–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11554552>
- Castillo, P. E., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1997). Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature*, 388(6638), 182–186. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9217159>
- Cha, B. H., Silveira, D. C., Liu, X., Hu, Y., & Holmes, G. L. (2002). Effect of topiramate following recurrent and prolonged seizures during early development. *Epilepsy Research*, 51(3), 217–232. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399072>
- Chang, P. K.-Y., Verbich, D., & McKinney, R. A. (2012). AMPA receptors as drug targets in neurological disease--advantages, caveats, and future outlook. *The European journal of neuroscience*, 35(12), 1908–16. doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08165.x
- Choi, W. (1988). Pharmacology of Glutamate Neurotoxicity Attenuation by NMDA Antagonists in Cortical Cell Culture :, 8(January).
- Chow, C., Epp, J. R., Lieblich, S. E., Barha, C. K., & Galea, L. a M. (2012). Sex differences in neurogenesis and activation of new neurons in response to spatial learning and memory. *Psychoneuroendocrinology*. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.11.007
- Ciani, E., Baldinotti, I., & Contestabile, A. (2001). Sustained, long-lasting inhibition of nitric oxide synthase aggravates the neural damage in some models of excitotoxic brain injury. *Brain Research Bulletin*, 56(1), 29–35. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6SYT-445R9DJ-5/1/049c3b6e1ba44af0c19fb53c9596a20b>
- Costa, V. C. I., Bueno, J. L. O., & Xavier, G. F. (2005). Dentate gyrus-selective colchicine lesion and performance in temporal and spatial tasks. *Behavioural Brain Research*, 160(2), 286–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863225>
- Cull-Candy, S., Kelly, L., & Farrant, M. (2006). Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(3), 288–97. doi:10.1016/j.conb.2006.05.012

- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65(1), 1–105. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2775085&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Denise, S., Costa, J., Sergio, M., Konno, K., Nihei, K., Azambuja, N. A., Paglioli, E., et al. (2005). The antiepileptic activity of JSTX-3 is mediated by N-methyl- D - aspartate receptors in human hippocampal neurons, 16(16), 3–7.
- Dezhi Liao, N. A. H. and R. M. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice.
- Do Nascimento, A. L., Dos Santos, N. F., Campos Pelágio, F., Aparecida Teixeira, S., De Moraes Ferrari, E. a, & Langone, F. (2012). Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain research*, 1470, 98–110. doi:10.1016/j.brainres.2012.06.008
- Epp, J. R., Scott, N. a, & Galea, L. a M. (2011). Strain differences in neurogenesis and activation of new neurons in the dentate gyrus in response to spatial learning. *Neuroscience*, 172, 342–54. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.10.025
- Fachim, H. A., Cunha, A. O. S., Pereira, A. C., Beleboni, R. O., Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P., Coutinho-Netto, J., et al. (2011). Neurobiological activity of Parawixin 10, a novel anticonvulsant compound isolated from *Parawixia bistriata* spider venom (Araneidae: Araneae). *Epilepsy behavior EB*, 22(2), 158–64. doi:10.1016/j.yebeh.2011.05.008
- Fontana, A. C. K., Guizzo, R., De Oliveira Beleboni, R., Meirelles E Silva, A. R., Coimbra, N. C., Amara, S. G., Dos Santos, W. F., et al. (2003). Purification of a neuroprotective component of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate uptake. *British journal of pharmacology*, 139(7), 1297–309. doi:10.1038/sj.bjp.0705352
- Fontana, K., Beleboni, D. O., Wojewodzic, M. W., Ferreira, W., Coutinho-netto, J., Grutle, N. J., Watts, S. D., et al. (2007). Enhancing Glutamate Transport: Mechanism of Action of Parawixin1 , a Neuroprotective Compound from *Parawixia bistriata* Spider Venom, 72(5), 1228–1237. doi:10.1124/mol.107.037127.)
- Fujikawa, D. G. (1996). The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain research*, 725(1), 11–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8828581>
- Gao, X., & Chen, J. (2013). Moderate traumatic brain injury promotes neural precursor proliferation without increasing neurogenesis in the adult hippocampus. *Experimental neurology*, 239, 38–48. doi:10.1016/j.expneurol.2012.09.012
- Ge, W.-P., Yang, X.-J., Zhang, Z., Wang, H.-K., Shen, W., Deng, Q.-D., & Duan, S. (2006). Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca²⁺-

- permeable AMPA receptors. *Science*, 312(5779), 1533–1537. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16763153>
- Geiger J R, Melcher T, Koh D S, Sakmann B, Seeburg P H, Jonas P, Monyer H (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15:193–204
- Gill, R., Nordholm, L., & Lodge, D. (1992). The neuroprotective actions of (NBQX) in a rat focal ischaemia model, 580, 35–43.
- Guscott, M. R., Clarke, H. F., Murray, F., Grimwood, S., Bristow, L. J., & Hutson, P. H. (2003). The effect of (±)-CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit selective antagonist, in the Morris watermaze. *European Journal of Pharmacology*, 476(3), 193–199. doi:10.1016/S0014-2999(03)02182-4
- Hailer, N. P., Vogt, C., Korf, H.-W., & Dehghani, F. (2005). Interleukin-1beta exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *The European journal of neuroscience*, 21(9), 2347–60. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04067.x
- Halonen, T., Nissinen, J., Jansen, J. A., & Pitkänen, A. (1996). Tiagabine prevents seizures, neuronal damage and memory impairment in experimental status epilepticus. *European Journal of Pharmacology*, 299(1-3), 69–81. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8901009
- Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annual review of neuroscience*, 17, 31–108. doi:10.1146/annurev.ne.17.030194.000335
- Howes, J. F., & Bell, C. (2007). Talampanel. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4(1), 126–9. doi:10.1016/j.nurt.2006.11.001
- Hu, Y., Jiang, L., Chen, H., & Zhang, X. (2012). Expression of AMPA receptor subunits in hippocampus after status convulsion. *Child's nervous system: ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 28(6), 911–8. doi:10.1007/s00381-012-1747-3
- Huang, P., Sun, Y., Gou, W., & Zhang, R. (2010). [Effect of behavioral training on learning and memory capacity and changes of hippocampal NR2B and GluR1 expressions in FGR offspring rats]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*, 30(4), 708–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20423831>
- Inostroza, M., Cid, E., Brotons-Mas, J., Gal, B., Aivar, P., Uzcategui, Y. G., Sandi, C., et al. (2011). Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is

- preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. *PloS one*, 6(7), e22372. doi:10.1371/journal.pone.0022372
- Ishiuchi, S., Tsuzuki, K., Yoshida, Y., Yamada, N., Hagimura, N., Okado, H., Miwa, A., et al. (2002). Blockage of Ca(2+)-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Nature medicine*, 8(9), 971–8. doi:10.1038/nm746
- Itazawa, S., Isa, T., & Ozawa, S. (2011). Inwardly Rectifying and Ca²⁺-Permeable AMPA-Type Glutamate Receptor Channels in Rat Neocortical Neurons Inwardly Rectifying and Ca²⁺-Permeable AMPA-Type Glutamate Receptor Channels in Rat Neocortical Neurons, 2592–2601.
- Jackson, H., & Parks, T. N. (1990). Anticonvulsant action of an arylamine-containing fraction from Agelenopsis spider venom. *Brain research*, 526(2), 338–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2257489>
- Jiang, Q., Wang, J., Wu, Y., Wu, X., Qin, J., & Jiang, Y. (2008). Early-life epileptiform discharges exert both rapid and long-lasting effects on AMPAR subunit composition and distribution in developing neurons. *Neuroscience letters*, 444(1), 31–5. doi:10.1016/j.neulet.2008.08.006
- Kandel, E. (2005). Eric Kandel: the future of memory. *Molecular Interventions*. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2834928&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kawai, N., Niwa, a, & Abe, T. (1982). Spider venom contains specific receptor blocker of glutaminergic synapses. *Brain research*, 247(1), 169–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6127145>
- Kim, Y.-S., Chang, H.-K., Lee, J.-W., Sung, Y.-H., Kim, S.-E., Shin, M.-S., Yi, J.-W., et al. (2009). Protective Effect of Gabapentin on N-Methyl-D-aspartate-Induced Excitotoxicity in Rat Hippocampal CA1 Neurons. *Journal of Pharmacological Sciences*, 109(1), 144–147. doi:10.1254/jphs.08067SC
- Krestel, H. E., Shimshek, D. R., Jensen, V., Nevian, T., Kim, J., Geng, Y., Bast, T., et al. (2004). A genetic switch for epilepsy in adult mice. *Journal of Neuroscience*, 24(46), 10568–10578. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15548671>
- Kubo, M., & Ito, E. (2004). Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. *Proteins*, 56(3), 411–9. doi:10.1002/prot.20154
- Kugler, P., & Schleyer, V. (2004). Developmental expression of glutamate transporters and glutamate dehydrogenase in astrocytes of the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus*, 14(8), 975–985. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15390174>

- Lee, J. C., Greig, A., Ravindranathan, A., Parks, T. N., & Rao, M. S. (1998). Molecular analysis of AMPA-specific receptors: subunit composition, editing, and calcium influx determination in small amounts of tissue. *Brain research Brain research protocols*, 3(2), 142–154.
- Levi, H.W.(1992). Spiders of the orb-weaver genus *Parawixia* in America (Aranea: Araneidae). *Bull. Mus. Comp. Zool.* 153: 1-46.
- Liberato, J. L., Cunha, A. O. S., Mortari, M. R., Gelfuso, E. A., Beleboni, R. D. O., Coutinho-Netto, J., & Dos Santos, W. F. (2006). Anticonvulsant and anxiolytic activity of FrPbAII, a novel GABA uptake inhibitor isolated from the venom of the social spider *Parawixia bistriata* (Araneidae: Araneae). *Brain Research*, 1124(1), 19–27.
- Lipton, P. (1999). Ischemic Cell Death in Brain Neurons, 79(4), 1431–1568.
- Liu, X.-F., Fawcett, J. R., Hanson, L. R., & Frey, W. H. (2004). The window of opportunity for treatment of focal cerebral ischemic damage with noninvasive intranasal insulin-like growth factor-I in rats. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases the official journal of National Stroke Association*, 13(1), 16–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17903945>
- Löscher, W. (2002). Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs*, 16(10), 669–694. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12269861>
- Löschmann, P.-A., Eblen, F., Wüllner, U., Wachtel, H., & Klockgether, T. (1995). Lamotrigine has no antiparkinsonian activity in rat models of Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology*, 284(1-2), 129–134. doi:10.1016/0014-2999(95)00380-4
- Lucas DR, Newhouse JP.(1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophtalmol*; 58: 193-201.
- Mahajan S., Thai, K.H., C. K. and Z. (2012). Exposure of Neurons to Excitotoxic Levels of Glutamate Induces Cleavage of ADAR2 and Loss of GluR2 Editing, 305–315. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.05.027.Exposure
- Malinow, R. (2003). AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 358(1432), 707–714. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740116>
- Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 25(1), 103–126. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052905>

- Mattson, M. P., & Chan, S. L. (2003). Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. (M. S. Islam, Ed.) *Cell Calcium*, 34(4-5), 385–397. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143416003001283>
- McBain CJ, Mayer ML.(1994). N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev.* 1994 Jul;74(3):723-60.
- Meinwald, J., & Eisner, T. (1995). The chemistry of phyletic dominance. (T. Eisner & J. Meinwald, Eds.) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(1), 14–18. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=10741964633403506943related:_ODTs-sfE5UJ
- Meldrum, B. S. (2000a). Glutamate and Glutamine in the Brain Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain : Review of Physiology and Pathology 1, 8, 1007–1015.
- Meldrum, B. S. (2000b). Glutamate and Glutamine in the Brain Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain : Review of Physiology and Pathology 1, 8, 1007–1015.
- Mellor, I. R., & Usherwood, P. N. R. (2004). Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 43(5), 493–508. doi:10.1016/j.toxicon.2004.02.003
- Ming, G., & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual review of neuroscience*, 28, 223–50. doi:10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459
- Molnar, E., Pickard, L., & Duckworth, J. K. (2002). Book Review: Developmental Changes in Ionotropic Glutamate Receptors: Lessons from Hippocampal Synapses. *The Neuroscientist*, 8(2), 143–153. doi:10.1177/107385840200800210
- Mortari, M. R., Cunha, A. O. S., Ferreira, L. B., & Dos Santos, W. F. (2007). Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. *Pharmacology & therapeutics*, 114(2), 171–83. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.01.009
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- Mosley, R. L., & Gendelman, H. E. (2010). Control of neuroinflammation as a therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Experimental neurology*, 222(1), 1–5. doi:10.1016/j.expneurol.2009.12.018
- Niciu, M. J., Kelmendi, B., & Sanacora, G. (2012). Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 100(4), 656–64. doi:10.1016/j.pbb.2011.08.008

- Nielson, K. A., & Lorber, W. (2009). Neurobiology of Learning and Memory. (G. L. Shaw, J. L. McGaugh, & S. P. R. Rose, Eds.) *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(1), 73–80. doi:10.1016/j.nlm.2009.03.002
- Okada, T., Yamada, N., Tsuzuki, K., Horikawa, H. P. M., Tanaka, K., & Ozawa, S. (2003). Long-term potentiation in the hippocampal CA1 area and dentate gyrus plays different roles in spatial learning. *European Journal of Neuroscience*, 17(2), 341–349. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02458.x
- Olney JW. (1978). Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: McGeer EG, Olney JW, McGeer PL, eds; Kainic acid as a tool in neurobiology. New York: Raven Press; p. 95-121.
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164(3880), 719–721. doi:10.1126/science.164.3880.719
- Osswald, I. K., Galan, A., & Bowie, D. (2007). Light triggers expression of philanthotoxin-insensitive Ca²⁺-permeable AMPA receptors in the developing rat retina. *The Journal of Physiology*, 582(Pt 1), 95–111. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2075288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ozawa, S., Kamiya, H., & Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 54(5), 581–618. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9550192>
- O'Donnell, W. T., & Warren, S. T. (2002). A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annual review of neuroscience*, 25, 315–38. doi:10.1146/annurev.neuro.25.112701.142909
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. *Hippocampus* (Vol. 3, p. 570). Oxford University Press. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/oso/7347120/2010/00000001/00000001/art00006>
- O'Neill, M. J., Bleakman, D., Zimmerman, D. M., & Nisenbaum, E. S. (2003). AMPA receptor potentiators for the treatment of CNS disorders. *Current drug targets CNS and neurological disorders*, 3(3), 303–313. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15180479>
- O'Neill, M. J., & Witkin, J. M. (2007). AMPA receptor potentiators: application for depression and Parkinson's disease. *Current Drug Targets*, 8(5), 603–620. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17504104>
- Page, K. J., Everitt, B. J., Robbins, T. W., Marston, H. M., & Wilkinson, L. S. (1991). Dissociable effects on spatial maze and passive avoidance acquisition and retention following AMPA- and ibotenic acid-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain in rats: differential dependence on cholinergic neuronal loss.

- Neuroscience*, 43(2-3), 457–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1922778>
- Paul Harrison, A. L. and S. E. (n.d.). Glutamate receptors and transporters in the hippocampus in schizophrenia.
- Paxinos, G., Watson, C. (1986). The rat brain in stereotaxic systems. 2° ed. New York, Academic Press.
- Peleg-Raibstein, D., Pezze, M. a, Ferger, B., Zhang, W.-N., Murphy, C. a, Feldon, J., & Bast, T. (2005). Activation of dopaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex by N-methyl-d-aspartate stimulation of the ventral hippocampus in rats. *Neuroscience*, 132(1), 219–32. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.12.016
- Pellegrini-Giampietro, D. E. (2003). An activity-dependent spermine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. *Trends in Neurosciences*, 26(1), 9–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216287>
- Petralia, R. S., Zhao, H. M., Wang, Y. X., & Wenthold, R. J. (1998). Variations in the tangential distribution of postsynaptic glutamate receptors in Purkinje cell parallel and climbing fiber synapses during development. *Neuropharmacology*, 37(10-11), 1321–1334. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9849668>
- Pierce, B. H., Sullivan, A. L., Schacter, D. L., & Budson, A. E. (2005). Comparing source-based and gist-based false recognition in aging and Alzheimer's disease. *Neuropsychology*, 19(4), 411–419. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16060815>
- Pires, R. S., Rebouças, N. A., Duvoisin, R. M., & Britto, L. R. (2000). Retinal lesions induce differential changes in the expression of flip and flop isoforms of the glutamate receptor subunit GluR1 in the chick optic tectum. *Brain research. Molecular brain research*, 76(2), 341–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10762710>
- Pitkänen, A., & Sutula, T. P. (2002). Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *The Lancet*, 1(3), 173–181. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147444220200073X>
- Pizzo, a B., Fontana, a C., Coutinho-Netto, J., & Dos Santos, W. F. (2000). Effects of the crude venom of the social wasp *Agelaia vicina* on gamma-aminobutyric acid and glutamate uptake in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 14(2), 88–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10630422>
- Rafael Mourão Agostini, Ana cristina do Nascimento Pinheiro, Binda, N. S., Ms, C., Aure, M., Do, M., Cordeiro, N., Richardson, M., Guimara, L. S., et al. (1957). ISCHEMIA-INDUCED GLUTAMATE RELEASE AND NEURONAL DEATH OF CELL LAYERS OF THE RETINA, 1392–1399.

- Rash, L. D., & Hodgson, W. C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 40(3), 225–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11711120>
- Rosenzweig, E. S., & Barnes, C. A. (2003). Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in Neurobiology*, 69(3), 143–179. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008202001260>
- Rothstein, J. D. (2009). Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*, 65 Suppl 1, S3–9. doi:10.1002/ana.21543
- Sanai, Barbaro, N. M., Gupta, N., & Kunwar, S. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration, 427(February), 740–744. doi:10.1038/nature02298.1.
- Sattler, R, Charlton, M. P., Hafner, M., & Tymianski, M. (1998). Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *Journal of neurochemistry*, 71(6), 2349–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832133>
- Sattler, Rita, & Tymianski, M. (2001). Molecular Mechanisms of Glutamate Receptor-Mediated Excitotoxic Neuronal Cell Death, 24(1), 107–129.
- Scott T Moe, Daryl L. Smith, Yongwei Chien, Joanna L. Raszkievicz, L. D. A. and A. L. M. (n.d.). Design, synthesis, and biological evaluation of spider toxin (argiotoxin-636) analogs as NMDA receptor antagonists 1998 Pharmaceutical-Research.pdf.
- Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A., & Mora, F. (2001). Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mechanisms Of Ageing And Development*, 122(1), 1–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163621>
- Sestito, R. S., Trindade, L. B., De Souza, R. G., Kerbaui, L. N., Iyomasa, M. M., & Rosa, M. L. N. M. (2011). Effect of isolation rearing on the expression of AMPA glutamate receptors in the hippocampal formation. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 25(12), 1720–9. doi:10.1177/0269881110385595
- Shimada, a, Spangler, E. L., London, E. D., & Ingram, D. K. (1994). Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. *European journal of pharmacology*, 263(3), 293–300. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7843267>
- Sladeczek, F., Pin, J. P., Récasens, M., Bockaert, J., & Weiss, S. (1985). Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature*, 317(6039), 717–719. Retrieved from <http://www.nature.com.myaccess.library.utoronto.ca/nature/journal/v317/n6039/index.html>

- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences*, 32(12), 638–47. doi:10.1016/j.tins.2009.08.002
- Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Köhler, M., et al. (1990). Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4976), 1580–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1699275>
- Strømgaard, K., Jensen, L. S., & Vogensen, S. B. (2005). Polyamine toxins: development of selective ligands for ionotropic receptors. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 45(3), 249–54. doi:10.1016/j.toxicon.2004.11.013
- Suk, K., Park, J.-H., & Lee, W.-H. (2004). Neuropeptide PACAP inhibits hypoxic activation of brain microglia: a protective mechanism against microglial neurotoxicity in ischemia. *Brain Research*, 1026(1), 151–156. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15476707>
- Takazawa, a, Yamazaki, O., Kanai, H., Ishida, N., Kato, N., & Yamauchi, T. (1996). Potent and long-lasting anticonvulsant effects of 1-naphthylacetyl spermine, an analogue of Joro spider toxin, against amygdaloid kindled seizures in rats. *Brain research*, 706(1), 173–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720508>
- Talpos, J. C., Dias, R., Bussey, T. J., & Saksida, L. M. (2008). Hippocampal lesions in rats impair learning and memory for locations on a touch-sensitive computer screen: the “ASAT” task. *Behavioural Brain Research*, 192(2), 216–225. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18499279>
- Tymianski, M., Charlton, P., Carlen, L., Unit, P. N., & Mt, O. (1993). Source Specificity of Early Calcium Neurotoxicity Embryonic Spinal Neurons in Cultured, 13(May).
- Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., & Robberecht, W. (2006). The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(11-12), 1068–1082. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806844>
- Van Groen, T., Miettinen, P., & Kadish, I. (2003). The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus*, 13(1), 133–49. doi:10.1002/hipo.10037
- Weiss, J. H., & Sensi, S. L. (2000). Ca²⁺ – Zn²⁺ permeable AMPA or kainate receptors : possible key factors in selective neurodegeneration, (1999), 365–371.
- Wu, G., Malinow, R., & Cline, H. T. (1996). Maturation of a central glutamatergic synapse. *Science*, 274(5289), 972–976. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8875937>

- Xiao, M.-Y., Wasling, P., Hanse, E., & Gustafsson, B. (2004). Creation of AMPA-silent synapses in the neonatal hippocampus. *Nature Neuroscience*, 7(3), 236–243. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14966524>
- Yan, X., Cai, Y., Zhang, X., Luo, X., Cai, H., Rose, G. M., & Patrylo, P. R. (2012). BACE1 elevation is associated with aberrant limbic axonal sprouting in epileptic CD1 mice, 235, 228–237. doi:10.1016/j.expneurol.2012.01.003