TATIANA SHIROTA SATAKE

EFEITOS COMPORTAMENTAIS DE TOXINAS ISOLADAS DO VENENO DA
MICRURUS LEMNISCATUS EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação Interunidades em Biotecnologia,
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia

São Paulo
2014

Tatiana Shiota Satake

Efeitos comportamentais de toxinas isoladas do veneno da *Micrurus lemniscatus* em ratos
Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação Interunidades em Biotecnologia,
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Regina Lopes
Sandoval

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Satake, Tatiana Shiota.
Efeitos comportamentais de toxinas isoladas do veneno da *Micrurus lemniscatus* em ratos Wistar / Tatiana Shiota Satake. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Maria Regina Lopes Sandoval.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Estudo de componentes isolados do veneno da *Micrurus lemniscatus* com atividade sobre o sistema nervoso: estudo bioquímico, farmacológico e molecular.

Versão do título para o inglês: Behavioral effects of toxins isolated from the venom of *Micrurus lemniscatus* in Wistar rats.

1. Toxinas 2. Acetilcolina 3. Receptores muscarínicos 4. Memória
5. Memória operacional 6. Ansiedade I. Sandoval, Profa. Dra. Maria Regina Lopes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0161/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tatiana Shiota Satake.

Título da Dissertação: Efeitos comportamentais de toxinas isoladas do veneno da *Micrurus lemniscatus* em ratos Wistar.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Regina Lopes Sandoval.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) **Aprovado(a)**

( ) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito da toxina MT-Mla isolada do veneno da serpente *M. lemniscatus* sobre o aprendizado e memória de ratos", protocolo n° 843/11, sob a responsabilidade de Maria Regina Lopes Sandoval e Tatiana Shirota Satake - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 9/10/2013.

Vigência do Projeto: 09/2011 - 07/2014 Laboratório de Farmacologia	N° de animais/espécie	Observação
	288 ratos Wistar (M)	Substituição de aluna Alteração de vigência

São Paulo, 10 de outubro de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

*Dedico esta dissertação aos meus pais, Edson e Irene,
os maiores exemplos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Dra. Regina Sandoval pela orientação, paciência e tempo, dedicados ao longo de 3 anos.

Agradeço ao Dr. Gilberto Xavier, pelas sugestões valiosas ao longo do trabalho, bem como a orientação e discussão de dados.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, Dédé, Marcinha, Camilinha, Cá, Dri, Andria, Renan e Edu, presentes ao longo desses anos, sempre me apoiando, nos experimentos ou pelas simples risadas. Em especial agradeço ao Luquinhas, pelas sábias palavras de motivação, ajuda e momentos de descontração.

Agradeço às técnicas Eleonora (Léo), Eliza e Camila, por sempre me ajudarem nas horas mais difíceis do mestrado.

Agradeço a Eliane, Fábria, Marcos e Arthur, da secretaria da pós graduação, pelo suporte e auxílio, em algumas horas desesperadoras.

Agradeço aos professores dos programas de Pós Graduação da USP, pelo conhecimento transmitido ao longo das aulas.

Agradeço as minhas amigas, Duds, Aninha, Camila, Carol, Lud, MayMay, Bruneca e Milka, por anos e anos de amizade.

Agradeço acima de tudo minha família, por incontáveis motivos, mas principalmente, por sempre acreditarem no meu potencial.

Agradeço aos ratinhos, os maiores colaboradores deste trabalho.

E por fim agradeço a CAPES pela bolsa concedida.

"In a dark place we find ourselves and a little more knowledge lights our way"
(Mestre Yoda - Star Wars)

*"Courage will now be your best defence against the storm that is at hand – that and
such hope as I bring"*
(Gandalf – Lord of the Rings: The Return of the King)

RESUMO

SATAKE, T. S. **Efeitos comportamentais de toxinas isoladas do veneno da *Micrurus lemniscatus* em ratos wistar**. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Previamente fizemos a identificação e caracterização dos componentes, MT-M1 α e MT-M1 β , isolados do veneno da *M. lemniscatus*. Ambos foram capazes de deslocar a ligação do [³H]QNB e reduzir o conteúdo de fosfatos de inositol totais, aumentados pelo carbacol. Uma vez que estes componentes atuam sobre receptores muscarínicos e parecem ser antagonistas desse sistema, uma abordagem interessante seria o estudo desses componentes sobre os efeitos no processamento de aprendizado e memória, visto que o sistema colinérgico muscarínico está envolvido em funções cognitivas. Foram implantadas cânulas guias no hipocampo de ratos Wistar machos (250g) para a injeção das toxinas ou solução controle. Os ratos foram submetidos ao Labirinto Aquático de Morris, cujo treinamento envolveu 7 dias, com 4 tentativas por dia, e intervalo de 10 minutos entre elas. A cada dia a plataforma mudava de localização para o desenvolvimento da memória operacional espacial nos ratos. No dia da inoculação (8º dia), os animais receberam unilateralmente as toxinas, nas concentrações MT-M1 α (1,0 ou 2 μ g/ μ l) (N=7) ou MT-M1 β (0,5 ou 0,25 μ g/ μ l) (N=7) ou solução controle, ou bilateralmente, MT-M1 α (1 μ g/ μ l) (N=7) ou MT-M1 β (0,125 μ g/ μ l) (N=7) ou solução controle (1 μ l) (N=7), 20 minutos antes do teste. No dia pós-inoculação (9º dia) os animais foram testados normalmente. Os dados foram coletados pelo Software Any-Maze e analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Para avaliação dos níveis de ansiedade, os ratos foram submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado, cujo experimento envolveu o dia treino, com duração de 10 minutos, e dia teste, com duração de 5 minutos. O dia treino ocorreu após 30 minutos da injeção bilateral das toxinas MT-M1 α (1 μ g/ μ l) (N=7) ou MT-M1 β (0,125 μ g/ μ l) (N=7) ou solução controle (1 μ l) (N=7), e o dia teste, após 24 horas da injeção. Após 7 dias da injeção intrahipocampal, em ambos os experimentos, os ratos foram sacrificados para análise histopatológica dos cérebros. Os animais injetados com a MT-M1 α , quando comparados com o grupo controle, permaneceram menos tempo no quadrante do dia anterior, indicando que a toxina prejudica a consolidação da memória de longo prazo, sem interferência com a memória espacial de curto prazo. Por outro lado, os ratos injetados com a MT-M1 β , permaneceram mais tempo na piscina quando comparados ao grupo controle, porém esse tempo foi gasto no quadrante do dia anterior, indicando que, ao contrário da MT-M1 α , a toxina causou um efeito facilitatório quanto à recuperação da informação da localização da plataforma. O tratamento com a MT-M1 β mostrou ter um efeito ansiogênico, o que pode ter contribuído para o efeito facilitatório sobre a memória, pois sabe-se que a ansiedade, até certo nível, pode favorecer o desempenho cognitivo. Ambas as toxinas não causaram danos histopatológicos.

Palavras-chave: Toxinas. Acetilcolina. Receptores muscarínicos. Memória. Memória operacional. Ansiedade.

ABSTRACT

SATAKE, T. S. **Behavioral effects of toxins isolated from the venom of *Micrurus lemniscatus* in Wistar rats.** 2014. 72 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Previously we identified and characterized the components, MT-MI α and MT-MI β , isolated from *M. lemniscatus* venom. Both were able to displace the binding of [^{3} H]QNB and reduce the content of total inositol phosphates, increased by carbachol. Since these components appear to act as muscarinic receptors antagonists, an interesting approach is the study of the effects of these components in the processing of learning and memory, whereas the muscarinic cholinergic system is involved in cognitive functions. Guides cannulas were implanted in the hippocampus of male Wistar rats (250g) for the injection of the toxin or control solution. Rats underwent the Morris Water Maze, whose training involved seven days, with four trials per day, with an interval of 10 minutes between them. Every day the platform location shifted with the aim at the development of spatial working memory in rats. On the inoculation day (8th day), the animals received unilateral the toxins, with concentrations MT-MI α (1.0 or 2 μ g/ μ l) (N=7) or MT-MI β (0.5 or 0.25 μ g/ μ l) (N=7) or a control solution or bilaterally, MT-MI α (1 μ g/ μ l) (N=7) or MT-MI β (0.125 μ g/ μ l) (N=7) or control solution (1 μ l) (N=7) 20 minutes before the test. On post-inoculation day (9th day) the animals were tested normally. The data were collected by the Software Any-Maze and analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. To evaluate the levels of anxiety, the rats were submitted to Elevated Plus Maze, whose experiment involved the training day, during 10 minutes, and test day, for five minutes. The training day occurred 30 minutes after bilateral injection of toxins MT-MI α (1 μ g/ μ l) (N=7) or MT-MI β (0.125 μ g/ μ l) (N=7) or control solution (1 μ l) (N=7), and the test day, 24 hours after injection. Seven days after intrahippocampal injection in both experiments, the rats were sacrificed for histological analysis of the brains. Animals injected with MT-MI α when compared with the control group, spent less time in the quadrant of the previous day, indicating that the toxin impairs the consolidation of long-term memory without interfering with the spatial short-term memory. Moreover, rats injected with MT-MI β remained longer in the pool when compared to the control group, but this time was spent in the quadrant of the previous day, indicating that, unlike the MT-MI α , the toxin caused a facilitatory effect regarding the recovery of the location of the platform information. Treatment with MT-MI β showed to have an anxiogenic effect, which may have contributed to the facilitatory effect on memory, since it is known that anxiety to a certain level can help cognitive performance. Both toxins did not cause histopathological damage.

Keywords: Toxins. Acetylcholine. Muscarinic receptors. Memory. Working memory. Anxiety.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach - acetilcolina
AChR - receptores de acetilcolina
AMPc - adenosina monofosfato cíclico
CA1 - Corno de Ammon 1
CA3 - Corno de Ammon 3
FLA₂ - fosfolipase A2
G.D. - Giro dentado
GTP - Guanosina trifosfato
I.P. - intraperitoneal
IP₃ - inositol trifosfato 3
mAChRs - receptores colinérgicos muscarínicos
MTs - toxinas muscarínicas
nAChRs - receptores nicotínicos de acetilcolina
SNC - Sistema nervoso central
SNP - Sistema nervoso periférico
3FTx - three fingers
[³H]QNB - 3-*quinuclidinyl* benzilate

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Envenenamento elapídico	14
1.2 Venenos e neurotoxinas elapídicas do gênero <i>Micrurus</i>	15
1.2.1 Neurotoxinas pré-sinápticas com atividade FLA_2	16
1.2.2 Neurotoxinas pós-sinápticas com atividade em receptores nicotínicos e muscarínicos	17
1.3 Ação de receptores muscarínicos de acetilcolina no sistema de aprendizado e memória	18
1.4 Memória e Ansiedade	19
1.4.1 Memória	19
1.4.1.1 Memória espacial	20
1.4.2 Ansiedade	21
1.5 Labirinto Aquático de Morris	22
1.6 Labirinto em Cruz Elevado	23
1.7 Justificativa	24
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos gerais	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Purificação das toxinas do veneno bruto da serpente da <i>Micrurus lemniscatus</i>	26
3.3 Cirurgia estereotáxica	26
3.4 Injeção intrahipocampal	27
3.5 Labirinto Aquático de Morris	27
3.5.1 Parâmetros analisados no Labirinto Aquático de Morris	28
3.6 Labirinto em Cruz Elevado	28
3.6.1 Parâmetros analisados no Labirinto em Cruz Elevado	29
3.7 Análise histológica	29
3.8 Análise estatística	30

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	31
4.1 Labirinto Aquático de Morris	31
4.1.1 <i>Experimento 1: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da toxina MT-Mlα em diferentes concentrações (1 μg/μl e 2 μg/μl) sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris</i>	31
4.1.2 <i>Experimento 2: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da toxina MT-Mlα na concentração de 1 μg/μl sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris</i>	32
4.1.3 <i>Experimento 3: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da toxina MT-Mlβ em diferentes concentrações (0,5 μg/μl e 0,25 μg/μl) sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris</i>	32
4.1.4 <i>Experimento 4: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da toxina MT-Mlβ na concentração de 0,125 μg/μl sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris</i>	32
4.1.5 <i>Experimento 5: Análise histológica dos cérebros dos animais injetados bilateralmente com as toxinas MT-Mlα ou MT-Mlβ, avaliados no Labirinto Aquático de Morris</i>	33
4.2 Labirinto em Cruz Elevado	33
4.2.1 <i>Experimento 6: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da toxina MT-Mlα (1 μg/μl) ou MT-Mlβ (0,125 μg/μl) sobre a ansiedade avaliada no Labirinto em Cruz Elevado</i>	33
4.2.2 <i>Experimento 7: Análise histológica dos cérebros dos animais injetados bilateralmente com as toxinas MT-Mlα ou MT-Mlβ, avaliados no Labirinto em Cruz Elevado</i>	33
5 RESULTADOS	34
5.1 Experimento 1: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da toxina MT-Ml α em diferentes concentrações (1 μ g/ μ l e 2 μ g/ μ l) sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris	34
5.2 Experimento 2: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da toxina MT-Ml α na concentração de 1 μ g/ μ l sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris	40
5.3 Experimento 3: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da toxina MT-Ml β em diferentes concentrações (0,5 μ g/ μ l e 0,25 μ g/ μ l) sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris	44

5.4 Experimento 4: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da toxina MT-MI β na concentração de 0,125 μ g/ μ l sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris.....	46
5.5 Experimento 5: Análise histológica dos cérebros dos animais injetados bilateralmente com as toxinas MT-MI α ou MT-MI β , avaliados no Labirinto Aquático de Morris.....	51
5.6 Experimento 6: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral das toxinas MT-MI α (1 μ g/ μ l) ou MT-MI β (0,125 μ g/ μ l) sobre a ansiedade avaliada no Labirinto em Cruz Elevado.....	52
5.7 Experimento 7: Análise histológica dos cérebros dos animais injetados bilateralmente com as toxinas MT-MI α ou MT-MI β , avaliados no Labirinto em Cruz Elevado.....	55
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envenenamento elapídico

A família Elapidae tem cerca de 250 espécies distribuídas nos Estados Unidos, México, Ásia, África, Austrália e Américas. Nas Américas, há um grupo de mais de 120 espécies e subespécies, divididos em três gêneros: *Micruroides*, *Leptomicrurus* e *Micrurus* (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

As serpentes corais, representantes do gênero *Micrurus*, estão amplamente distribuídas desde o sudeste dos Estados Unidos, México, América Central e parte da América do Sul, sendo considerado o gênero mais representativo quanto à abundância e diversidade de espécies (CÔRREA-NETTO et al., 2011.; DOKMETJIAN et al., 2009). Na América do Sul, as espécies de *Micrurus* mais importantes do ponto de vista médico são: *M. spixii*, *M. dumerilli*, *M. caracauda*, *M. mipartitus*, *M. surinamensis*, *M. corallinus*, *M. frontalis* e *M. lemniscatus*, sendo que as três últimas apresentam uma maior importância clínica no Brasil (PORTUGAL et al., 2008).

Os envenenamentos provocados por *Micrurus sp.* são relativamente raros devido à sua natureza reclusa e ao fato de que geralmente habitam áreas pouco povoadas. Cerca de 0,4% dos acidentes ofídicos no Brasil são causados por serpentes elapídicas do gênero *Micrurus*, com uma taxa letalidade de 0,36% dependendo da quantidade de veneno injetado e a idade das vítimas (CÔRREA-NETTO et al., 2011).

As serpentes corais possuem potentes venenos neurotóxicos, induzindo sintomas como ptose palpebral, oftalmoplegia, paralisia dos músculos da mandíbula, laringe, faringe, tórax, diafragma, pescoço e dos membros (VITAL-BRAZIL, 1987). A morte pode ocorrer como consequência da paralisia da musculatura torácica intercostal evoluindo para paralisia diafragmática. As manifestações clínicas do envenenamento causadas por serpentes elapídicas estão relacionadas às ações neurotóxicas e miotóxicas do veneno sobre a junção neuromuscular (WEIS; MCISSAC, 1971).

No entanto, devido à dificuldade de manutenção em cativeiro e as quantidades diminutas de veneno, as propriedades farmacológicas da maioria dos seus componentes permanecem desconhecidas ou pouco compreendidas.

1.2 Veneno e neurotoxinas elapídicas do gênero *Micrurus*

O veneno da coral verdadeira é constituído principalmente por neurotoxinas pré e pós-sinápticas, possuindo como alvo de ação o sistema colinérgico (DAL BELO et al., 2005).

As neurotoxinas pré-sinápticas compreendem principalmente as β -neurotoxinas, caracterizadas por sua atividade fosfolipásica A_2 (FLA₂), que causam bloqueio persistente da liberação de neurotransmissores de terminações nervosas (ROSSETO et al., 2006).

As neurotoxinas pós-sinápticas compreendem as α -neurotoxinas, que podem ser caracterizadas como proteínas com estrutura de 3 dígitos (“three-fingers”) (3FT_x) desprovidas de ação enzimática e que atuam interagindo com receptores colinérgicos. Atuam por ligação competitiva nos receptores colinérgicos nicotínicos das membranas pós-sinápticas da junção neuromuscular de nervos motores ou atuam em receptores colinérgicos muscarínicos localizados em diferentes órgãos (NECO et al., 2003).

As neurotoxinas pós-sinápticas (α -neurotoxinas) ligam-se ao receptor da acetilcolina (AChR) em membranas pós-sinápticas de músculos esqueléticos, prevenindo a ligação da acetilcolina (ACh) e assim bloqueando a excitação muscular. Este bloqueio da junção neuromuscular leva a uma paralisia flácida. No cérebro de mamíferos também foram identificados sítios de ligação ativados pela ACh e bloqueados pela α -bungarotoxina, isolada do veneno de *Bungarus sp*, com a qual foi possível caracterizar o subtipo de receptor nicotínico α -7 com atividade pré e pós-sináptica em hipocampo de rato (ALBUQUERQUE et al., 1995; FRAZIER et al., 1998).

Apesar da junção neuromuscular ser o alvo de ação das neurotoxinas que compõem os venenos elapídicos, estas são extremamente ativas e/ou neurotóxicas quando aplicadas diretamente no sistema nervoso central (SNC) ou testadas em cultura celular neuronal (REHM; BETZ, 1982) ou glial (TEIXEIRA, 2012). Estes modelos têm contribuído para o entendimento dos mecanismos celulares das FLA₂s de venenos elapídicos e neurotoxinas pós-sinápticas. Além disso, estes estudos mostram a importância destas toxinas como ferramentas farmacológicas para estudos de fenômenos neurobiológicos.

1.2.1 Neurotoxinas pré-sinápticas com atividade FLA₂

Os mecanismos celulares pelos quais as FLA₂s neurotóxicas induzem neurodegeneração do terminal da junção neuromuscular ainda não são totalmente conhecidos. O que se postula atualmente é que estas neurotoxinas FLA₂s se ligariam à membrana neuronal interagindo com receptor pré-sináptico tipo-N (presentes no tecido neuronal) (LAMBEAU et al., 1989; 1991), específicos para FLA₂ neurotóxicas, catalisando a hidrólise de fosfolípidos levando a produção de lisofosfolípidos e ácidos graxos que alterariam a conformação da membrana causando aumento na fusão de vesículas sinápticas, induzindo a liberação de neurotransmissores e inibição subsequente da fusão vesicular e reciclagem das mesmas (ROSSETTO et al., 2006).

O papel da atividade enzimática dessas FLA₂s no bloqueio da junção neuromuscular tem sido longamente debatido (KINI, 2003; MONTECUCCO; ROSSETTO, 2000). Resultados recentes demonstraram que os seus produtos da hidrólise fosfolipídica são suficientes para causar a paralisia da junção neuromuscular com alterações patológicas associadas (RIGONI et al., 2005).

Em um estudo pioneiro do nosso laboratório, caracterizamos as neurotoxinas FLA₂s – Mlx-8 (=MT-MI β) e Mlx-9, isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus*, em estudos *in vivo* e *in vitro*. Estas induzem alterações motoras e eletroencefalográficas, de uma forma dependente da concentração. A administração intrahipocampal da MT-MI β (0.57, 1.0, 1.4, 2.1 μ g/ μ l) em ratos induziu uma variedade de sintomas, incluindo o movimento “wet dog shake”, vocalização e períodos de imobilidade, com taxa de letalidade de 0 a 80%, apresentando lesão neuronal nas regiões CA1, CA3 e G.D., dependendo da concentração. Ainda, nosso grupo mostrou que o tratamento de culturas neuronais com as toxinas MT-MI β ou Mlx-9 induzem apoptose, alteração do potencial transmembrana mitocondrial e aumento do Ca²⁺ intracelular e que estes efeitos foram dependentes da dose (De CARVALHO et al., 2014).

As lesões neuronais induzidas pelas FLA₂s nesses trabalhos, também foram observadas após injeção intracerebral de outras FLA₂s elapídicas, como a paradoxina, crotoxina, β -bungarotoxina e *Naja Moçambique* (CLAPP et al., 1995; DORANDEU et al., 1998; LYSZ; ROSENBERG, 1974; SHAKHMAN et al., 2003) ou ainda, em cultura de células neuronais incubadas com essas FLA₂s (ROSSETTO et al., 2006).

1.2.2 Neurotoxinas pós-sinápticas com atividade em receptores nicotínicos e muscarínicos

Os venenos de serpentes elapídicas são valiosas ferramentas tanto para a caracterização da estrutura e função de AChR no músculo como também para identificar subtipos de receptores nicotínicos e muscarínicos que controlam funções específicas no SNC e periférico (SNP) (OLIVEIRA et al., 2008).

Diversas neurotoxinas nicotínicas e muscarínicas isoladas de venenos elapídicos provenientes da África, Austrália e Ásia já foram caracterizadas bioquímica e farmacologicamente. No entanto, os venenos das serpentes elapídicas das Américas são pouco estudados quanto a estes aspectos.

Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) são canais iônicos, nomeados de receptores ionotrópicos, regulados por neurotransmissores como a ACh e a nicotina, agindo de forma direta, promovendo a abertura de canais iônicos e uma resposta rápida que ocasiona a contração muscular, por exemplo. São divididos em duas classes: musculares e neuronais. Os musculares são encontrados na junção neuromuscular esquelética, enquanto que os neuronais são encontrados no SNC, além de terminações nervosas sensoriais (TSELIN; HUCHO, 2004).

Os receptores colinérgicos muscarínicos (mAChRs), ativados pela muscarina, pertencem à família de receptores glicoprotéicos de membrana, acoplados a proteínas heterotriméricas regulatórias, ligadoras de nucleotídeo de guanina (proteínas G) (GPCRs) (SILVA et al., 2011). Os receptores muscarínicos estão localizados na membrana pré- ou pós-sináptica, em neurônios colinérgicos e cinco subtipos são expressos no cérebro de mamíferos, M1 a M5 (JERUSALINSKI et al., 1998). Diferentes abordagens experimentais demonstraram que os receptores muscarínicos estão presentes em diferentes tipos de órgãos, tecidos ou tipos celulares. A disfunção desses receptores está associada a doenças periféricas e neurológicas, como exemplo a Doença de Alzheimer (SERVENT et al., 2011).

Os cinco subtipos de mAChRs foram identificados e classificados de acordo com suas diferentes propriedades de acoplamento à proteína G. Após a ligação do agonista, os mAChRs, M1, M3, M5, interagem preferencialmente com a família de proteínas Ge/Gq, levando a ativação de fosfolipase C (PLC) e inositol trifosfato (IP₃) além da liberação de Ca²⁺, enquanto que os subtipos, M2 e M4, interagem com as proteínas Gi, inibindo a atividade da adenil-ciclase e a produção de AMPc (BARROS et al., 2002; SERVENT et al., 2011).

No entanto, o papel de cada subtipo é ainda mal compreendido, devido à falta de ferramentas farmacológicas seletivas o suficiente para a distinção entre eles (FERREIRA et al., 2003).

1.3 Ação de receptores muscarínicos de acetilcolina no sistema de aprendizado e memória

O sistema colinérgico atua na regulação de variadas funções do SNC, como a regulação comportamental, autonômica, motora, sensorial, do aprendizado, memória e cognição (EGLIN et al., 1999; ROUSE et al., 1999; SEEGER et al., 2004, WESS et al., 2004).

O sistema colinérgico do hipocampo é um importante modulador da memória. As ativações dos neurônios colinérgicos desempenham um papel importante na indução e na manutenção da plasticidade sináptica (YOUSEFI et al., 2012).

Em geral, os estudos que utilizam antagonistas muscarínicos inespecíficos injetados diretamente no hipocampo, prejudicam o aprendizado e memória (HERRERA-MORALES et al., 2007; RIEKKINEN; RIEKKINEN, 1997). A escopolamina, antagonista muscarínico, quando administrada no hipocampo ou sistemicamente, provoca amnésia retrógrada para as tarefas comportamentais em ratos, sugerindo o envolvimento da transmissão colinérgica mediada por receptores muscarínicos na aprendizagem e no processamento da memória (IZQUIERDO, 1989).

Segundo Martyn et al. (2012) a ACh interfere na consolidação da memória. O grupo demonstrou que camundongos geneticamente alterados para secretar menos ACh no hipocampo (região cerebral associada à formação da memória) encontraram muito mais dificuldade para reconhecer um ambiente em que estiveram antes, provocando um déficit quanto a consolidação da memória espacial, típico sintoma da Doença de Alzheimer.

No hipocampo e estriado, bem como em outras áreas do cérebro, os efeitos da ACh são mediados principalmente através da ativação de diferentes subtipos de receptores muscarínicos (GOLD, 2003; SOARES; OLIVEIRA; FERREIRA, 2013). No entanto, o papel de cada subtipo é ainda mal compreendido, devido à falta de ferramentas farmacológicas seletivas o suficiente para a distinção entre eles (FERREIRA et al., 2003). Neste sentido, toxinas isoladas de venenos elapídicos apresentam alta afinidade para estes subtipos mAChRs e têm contribuído para o entendimento do papel da ACh em diferentes funções tanto no SNC como periférico. Assim, toxinas muscarínicas (MTs) isoladas do veneno da mamba verde, *Dendroapsis angusticeps*, como a MT2 e a MT3, apresentam afinidade para diferentes

subtipos muscarínicos. A toxina MT2 apresenta uma maior afinidade pelo receptor muscarínico subtipo M1 do que o M4 causando uma facilitação na consolidação da memória em uma tarefa de esquiva discriminatória em ratos machos. A MT3 apresenta maior afinidade para o subtipo M4 do que para o M1, causando uma perda da memória (JERUSALISKY et al., 1998).

Em um estudo pioneiro no nosso laboratório, foram identificadas e caracterizadas duas neurotoxinas isoladas do veneno da *M. lemniscatus* com afinidade em receptores muscarínicos no hipocampo de ratos, a MT-M1 α e a MT-M1 β . As duas toxinas interagem com receptores muscarínicos hipocâmpais: a toxina MT-M1 α tem homologia com toxinas “3FTx” e massa molecular 7.080 D (SILVA et al., 2011), a toxina MT-M1 β apresenta atividade FLA₂ e massa molecular de 13.531D (OLIVEIRA et al., 2008). Ambas foram capazes de deslocar a ligação do [³H]QNB. Assim, para a caracterização funcional desses componentes Silva et al. (2011) começaram a estudar as vias de sinalização celular envolvidas, e mostraram que ambas as toxinas reduzem o conteúdo de fosfatos de inositol totais, aumentados pelo carbacol. O bloqueio desta via de sinalização intracelular por estas duas neurotoxinas sugere então, que elas apresentam um perfil de antagonistas muscarínicos.

1.4 Memória e Ansiedade

1.4.1 Memória

Os mecanismos mais importantes através dos quais o ambiente altera o comportamento são a aprendizagem e a memória. A aprendizagem consiste no processo pelo qual adquirimos conhecimento sobre o mundo, enquanto a memória é o processo pelo qual o conhecimento é codificado, retido e, posteriormente, recuperado. Conceitualmente a memória pode ser definida como o processo de armazenamento e evocação de informações adquiridas através de experiências (IZQUIERDO, 1989).

O processamento da memória divide-se nas fases de aquisição, consolidação, armazenamento e evocação. A aquisição refere-se ao período de tempo em que o indivíduo responde aos estímulos que levarão a formação de uma nova memória. É dependente do grau de atenção relacionada com a nova informação, pois a retenção da memória é mais forte quando o indivíduo está mais motivado. A consolidação refere-se aos processos que alteram a informação recém-retida e ainda lábil, de modo a torna-la mais estável para a retenção a longo prazo. Durante essa fase a expressão de genes e a síntese de novas proteínas originam

alterações estruturais que mantêm a estabilidade da memória de longo prazo. O processo de armazenamento é o processo através do qual o traço de memória, mais consistente, é retido de maneira mais permanente ao longo do tempo. Finalmente, quando a memória já está de algum modo armazenada, ela pode ser evocada, permitindo o acesso as lembranças e o uso das informações adquiridas (KANDEL et al., 2000).

Segundo o critério temporal, as memórias são classificadas de acordo com o tempo que permanecem disponíveis após a aquisição. Conceitua-se uma memória de longa duração, se uma memória pode ser evocada em dias, semanas ou anos após ser formada. É representada por alterações estruturais dos neurônios, particularmente nas sinapses com outros neurônios, resiste a interferências. Entretanto, se ela puder ser evocada apenas por um curto período (algumas horas) após a aquisição, é chamada memória de curta duração, também denominada memória operacional, baseada na atividade elétrica dos neurônios, sendo assim, um tanto suscetível a interferências (IZQUIERDO et al., 1998; McGAUGH, 1966, 2000).

Durante os primeiros minutos ou horas após a aquisição da informação, elas são suscetíveis à interferência de outras memórias, drogas ou outros tratamentos.

1.4.1.1 Memória espacial

Para se orientarem em um ambiente, os animais se utilizam de diferentes estratégias que permitem alcançar o destino almejado. O'Keefe e Nadel (1978) distinguiram essas estratégias e sugeriram que animais podem empregar mais de uma delas simultaneamente. Resumidamente, os autores propuseram a teoria do mapa cognitivo, isto é, a ideia segundo a qual através do conhecimento prévio do ambiente os animais conseguem configurar relações entre o posicionamento de objetos independentemente de sua própria posição no meio, tal qual um mapa cartográfico propriamente dito.

Através da exploração prévia do ambiente, o animal pode, então, guiar-se utilizando essas relações ambientais conhecidas, valendo-se de múltiplas triangulações entre estímulos ambientais e ele próprio, possibilitando a realização de cálculos de posicionamento cada vez que o animal se desloca. O'Keefe e Nadel (1978) teorizaram que as informações acerca do conteúdo espacial ficariam armazenadas em algum sistema de memória adaptado para reter e codificar informações espaciais.

No sistema de mapeamento cognitivo, os animais utilizam a estratégia de “lugar” (alocêntrica) para se localizarem no ambiente. A estratégia de lugar requer mapa cognitivo, o conhecimento das posições “espaciais” relativas entre os vários estímulos do ambiente, obtido

por meio da atividade exploratória. No labirinto aquático de Morris existem várias pistas “estímulos salientes”, fixados nas paredes, para que os ratos visualizem e a partir destas construam um mapa cognitivo para se localizarem espacialmente (SANTOS, 1999).

Segundo a Teoria do Mapa Cognitivo, a formação hipocampal participa da codificação do ambiente, em mapas cognitivos, e contribui também para o armazenamento dessas informações (O’KEEFE; NADEL, 1978). O hipocampo processa principalmente informações espaciais e contextuais, sendo considerado um importante centro de plasticidade sináptica. Sua atividade é amplamente modulada por outras regiões encefálicas, sendo composto por 2 áreas, dobradas uma sobre a outra. Uma é chamada de Giro Dentado (GD), enquanto a outra é denominada de Corno de Amon. O Corno de Amon apresenta sub-regiões principais, como: CA3, CA1 e CA4 (COOPER; LOWENSTEIN, 2001).

A formação hipocampal é necessária quando a estratégia utilizada requer a aprendizagem das relações ambientais que permitem a configuração do “mapa cognitivo”, ou seja, o uso de estratégias de navegação espacial. Por outro lado, quando o animal desloca-se seguindo um estímulo visual que indica a posição da localidade almejada ou quando o repertório motor para o alcance daquela localização é conhecido, a formação hipocampal não prepondera à eficiência da navegação (XAVIER et al., 1999).

1.4.2 Ansiedade

Assim como descrito, outro tipo de interferência na memória são as emoções. Alguns estudos mostram que a ansiedade seria um passo necessário para a formação da memória (BEUZEN; BELZUNG, 1995; MATHEWS, 1990; SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000). A ansiedade tem suas raízes nas reações de medo dos animais, e ambos os fenômenos podem gerar respostas psicofisiológicas semelhantes, o que leva a supor a existência de mecanismos neurais comuns para ambos os estados emocionais (GRAEFF; VIANA; TOMAZ, 1993). A principal distinção entre medo e ansiedade reside nas características dos estímulos ou das situações pelos quais estes estados emocionais são desencadeados. Enquanto o medo seria desencadeado por situações específicas, claras e evidentes de perigo; a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e obscuro (GRAEFF; VIANA; TOMAZ, 1993).

Benzodiazepínicos, maior classe de ansiolíticos, induzem amnésia anterógrada, enquanto drogas ansiogênicas podem, em alguns casos, melhorar a memória (CASTELLANO; CABIB; PUGLISIALLEGRA, 1996; COMISSARIS, 1993; WICHLINKI;

JENSEN, 1996). Até certo nível, a ansiedade favoreceria o desempenho de tarefas motoras e cognitivas, sendo assim considerada fisiológica, mas passa a ser patológica quando passa a interferir no comportamento normal do indivíduo (GRAEFF; VIANA; TOMAZ, 1993), ou seja, a relação entre a ansiedade e o desempenho da memória segue a curva de Gauss, com melhor desempenho quando os níveis de ansiedade estão em um nível ideal (SALEHI et al., 2012).

Herrero, Sandi e Venero (2006) descobriram que ratos com baixo nível de ansiedade demonstraram um prejuízo na aquisição e na recuperação da informação espacial. Um aparato muito utilizado nesse tipo de abordagem é o labirinto elevado em cruz, como modelo etológico de ansiedade.

1.5 Labirinto Aquático de Morris

Morris (1981;1983) desenvolveu o labirinto aquático, uma tarefa poderosa para se avaliar a memória espacial de roedores e concluiu que animais submetidos a extensa lesão hipocampal exibiam prejuízos não somente quando necessitavam reter informações de natureza espacial mas também quando havia um contexto espacial e temporal específicos, ou seja, a retenção temporária da informação espacial estaria prejudicada nos animais lesados.

O labirinto aquático de Morris desempenha um papel crucial na memória espacial e comportamental relacionados à ansiedade. Embora sejam bons nadadores, os roedores não gostam de água e sempre buscam um lugar em que possam se manter secos, como a tal plataforma. Neste teste comportamental, como navegar em uma piscina, não há pistas locais indicando o local da plataforma, o indivíduo precisa realizar a tarefa espacial contando com pistas distais. Ao longo das sessões e dos treinos, os ratos começam a construir um mapa cognitivo que permite encontrar a plataforma mais rapidamente, independentemente do ponto de partida (HOOGE; DEYN, 2001).

Os animais se baseiam nas relações espaciais existentes entre essas pistas, não dependendo de nenhuma delas exclusivamente, conseguindo assim navegar na piscina por meio de um mapa cognitivo, e a partir daí encontrar a plataforma para sair da água. Essa estratégia permite a navegação de um dado local a partir de diferentes pontos de partida, e a adoção de um trajeto novo quando o caminho conhecido não está disponível.

Os procedimentos das tarefas podem ser manipulados, a fim de permitir a avaliação de diferentes tipos de memória espacial. Por exemplo, se a plataforma é mantida na mesma localização da piscina ao longo de vários dias de treino, o animal pode utilizar a informação

obtida nos dias anteriores para melhorar o seu desempenho. Por conseguinte, o desempenho adequado nesta versão da tarefa de manutenção requer a informação sobre a localização plataforma ao longo de vários dias e, a integridade da memória de referência espacial. Em contraste, se o local da plataforma muda a cada dia, sendo mantido o mesmo ao longo dos ensaios dentro de um dia, a nova localização tem de ser aprendida todos os dias na primeira tentativa e mantida na memória ao longo das tentativas. Depois de todos os ensaios dentro de um dia essa informação é inútil, portanto, deve ser descartado. O desempenho deste tipo de tarefa requer integridade da memória operacional espacial (BRANDEIS; BRANDY'S; YEHUDA, 1989; KUHLMANN; McGLOTHAN; GUILARTE, 1997; LADONDE, 1997).

1.6 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado é considerado um modelo naturalista, já que simula uma situação próxima à encontrada no ambiente natural dos ratos, sem requerer aprendizagem prévia nem submeter o animal a condições prévias ao teste.

Alguns trabalhos com modelos animais têm mostrado a interação entre memória e ansiedade. Um aparato muito utilizado nesse tipo de abordagem é este tipo de labirinto, como modelo etológico de ansiedade (PELLOW et al., 1985), que consiste de dois braços abertos, opostos a dois braços fechados por paredes, combinando elementos de novidade, espaços abertos e elevação. Esse modelo tem sido bastante utilizado para avaliar efeitos de drogas ansiolíticas e ansiogênicas, sendo empregado por inúmeros trabalhos desde a sua descrição e validação para ratos e camundongos.

Handley e Mithani (1984) descreveram a avaliação comportamental da ansiedade de roedores usando a proporção de tempo gasto com os braços abertos para o tempo gasto nos braços fechados. Normalmente, suas sessões duram cinco minutos, durante os quais analisam-se o número de entradas e o tempo gasto em cada tipo de braço. Em geral, os animais demonstram uma ocupação preferencial dos braços fechados.

O comportamento exploratório normal é a favor dos braços abertos. Compostos ansiolíticos diminuem a ansiedade, provocando um aumento no tempo nos braços abertos. Compostos ansiogênicos aumentam a ansiedade, provocando um aumento do tempo nos braços fechados (HOGG, 1996). Estudos farmacológicos mostram que a administração de ansiolíticos clássicos (por exemplo, clordiazepóxido, diazepam ou fenobarbital) produz um aumento na exploração dos braços abertos. Efeitos desse tipo levaram Pellow et al. (1985) a propor que o aumento na exploração dos braços abertos estaria relacionado a uma diminuição

dos níveis de ansiedade do animal. Por outro lado, quando se considera a administração de drogas que agem como agonistas inversos dos receptores benzodiazepínicos, relatou-se uma redução do número de entradas e tempo gasto nos braços abertos, mostrando assim um efeito ansiogênico (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; FILE; LISTER, 1984; PELLOW; FILE, 1986).

1.7 Justificativa

Previamente, mostramos que as toxinas MT-ML α e MT-MI β atuam sobre receptores muscarínicos e parecem ser antagonistas desse sistema. O sistema colinérgico muscarínico tem um papel importante na modulação de funções cognitivas assim, uma abordagem interessante seria o estudo dessas toxinas sobre o processamento de aprendizado e memória, bem como a interação das toxinas sobre os níveis de ansiedade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliação dos efeitos das toxinas MT-MI α e MT-MI β , isoladas do veneno bruto da *Micrurus lemniscatus*, sobre o aprendizado e memória espacial de ratos, bem como nos níveis de ansiedade.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar os efeitos das injeções unilaterais das toxinas MT-MI α e MT-MI β em diferentes concentrações no Labirinto Aquático de Morris;
- Estudar os efeitos das injeções bilaterais das toxinas MT-MI α (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e MT-MI β (0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), no Labirinto Aquático de Morris;
- Estudar os efeitos histopatológicos das injeções bilaterais das toxinas, MT-MI α e MT-MI β , no Labirinto Aquático de Morris;
- Estudar os efeitos das injeções bilaterais das toxinas MT-MI α (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e MT-MI β (0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) no Labirinto em Cruz Elevado;
- Estudar os efeitos histopatológicos das injeções bilaterais das toxinas, MT-MI α e MT-MI β , no Labirinto em Cruz Elevado;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 230 a 250 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os ratos receberam água e dieta *ad libitum*, mantidos em condições ambientais padronizadas (temperatura 22 °C e ciclo 12 horas claro/escuro). Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Butantan (CEUAIB) sob o número de protocolo 843/11.

3.2 Purificação das toxinas do veneno bruto da serpente *Micrurus lemniscatus*

O veneno bruto da serpente *Micrurus lemniscatus* foi fornecido pelo Instituto Butantan. O veneno foi purificado pela equipe do Dr. Ivo Lebrun através de cromatografia líquida de alto desempenho HPLC-FR (C8). Desta cromatografia obteve-se 19 picos denominados P1 a P19. No presente trabalho foram utilizados os picos 6 e 8, os quais foram designados como MT-MI α e MT-MI β . As toxinas foram conservadas a -20 °C, retiradas somente momentos antes da sua utilização e diluídas em Ringer lactato.

3.3 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina, em uma mistura de 70% e 30%, respectivamente. Foram injetados ao total, 0,45 ml i.p., para cirurgia estereotáxica para implantação unilateral ou bilateral de cânulas guia no giro dentado do hipocampo. As coordenadas foram confirmadas com realizações de cirurgias-piloto (Antero-posterior -3,8; lateral -/+2,3; profundidade -2,5). O ponto do Bregma serviu como referência para as coordenadas estereotáxicas adaptadas a partir do atlas de Paxinos e Watson (1998). O sistema foi fixado através de parafusos em aço inox presos a caixa craniana e polímero de acrílico adicionado a um acrílico auto polimerizante. Após a cirurgia os animais passaram por um período de recuperação de 3 dias alojados em gaiolas individuais com comida e água a vontade.

3.4 Injeção intrahipocampal

A injeção intrahipocampal unilateral ou bilateral das toxinas ou solução controle foi realizada através de um sistema constituído por uma microseringa Hamilton de 5,0 μ l, conectada através de um cateter de polietileno a uma agulha gengival 30 G. A injeção foi realizada em um fluxo constante de 0,35 μ l/min, totalizando um volume de 1 μ l. O sistema foi realizado unilateralmente ou bilateralmente, sendo que cada cânula recebeu um sistema acoplado a agulha. Após a injeção, a agulha foi mantida por mais 2 minutos com o objetivo de propiciar a difusão do líquido pelo tecido cerebral e evitar o refluxo.

3.5 Labirinto Aquático de Morris

Foi utilizada uma piscina circular de 2,0 m de diâmetro e 55 cm de altura, preenchida até 30 cm de água, com temperatura próxima a 25 °C (MORRIS, 1981). Uma plataforma móvel de acrílico transparente de 10 cm de diâmetro, colocada a 2 cm abaixo da superfície da água, serviu de escape para os animais.

Com base em pistas externas próximas ao labirinto e usando também como pista o experimentador, o animal deveria aprender a chegar ao local da plataforma em um período de 2 minutos. Os ratos que não conseguiram encontrar a plataforma foram colocados sobre esta por um período de 15 segundos para reconhecimento (XAVIER, 1999).

A piscina era visualmente dividida em 4 quadrantes (Q1, Q2, Q3, Q4), e ao longo da borda foram escritas letras diferentes, para serem utilizadas como referenciais. Durante 7 dias os animais foram treinados.

Cada animal executou 4 tentativas por dia, sendo que havia um intervalo de 10 minutos entre as tentativas. Eles eram soltos em referenciais diferentes a cada tentativa e, diariamente a plataforma mudava de quadrante, porém permanecia no mesmo quadrante durante o dia.

As informações a respeito dos diferentes locais da plataforma foram aprendidas e armazenadas antes da inoculação da toxina. Com a troca diária da localização da plataforma, verifica-se se os animais são capazes de esquecer a localização que conheciam e de aprender a nova posição da plataforma, melhorando a flexibilidade de se mapear novos caminhos até atingir o objetivo (alcançar a plataforma), utilizando-se, portanto a versão para estudo de memória operacional espacial.

No 8º dia injetava-se a toxina ou a solução controle, e após 10 minutos, dava-se início ao teste. Foram utilizados os dados pertencentes ao 8º e 9º dia do experimento.

O experimento foi registrado por uma câmera de vídeo conectada a um computador com o software Any-Maze (Stoeling*) programado para analisar pares de coordenadas que definem a posição do animal coletadas a cada 0,1s.

3.5.1 Parâmetros analisados no Labirinto Aquático de Morris

Para a análise do aprendizado e memória dos ratos no Labirinto Aquático de Morris, referente ao dia da inoculação e o dia pós-inoculação da toxina, foram utilizados os seguintes parâmetros: Latência (segundos) – averigua o tempo gasto pelo animal a partir do início do teste até alcançar a plataforma; Comprimento do trajeto (metros) – permite avaliar o caminho percorrido pelo animal até a posição da plataforma; Velocidade (m/s) – velocidade atingida pelos ratos durante o desempenho; Tempo de permanência no quadrante do dia anterior (segundos) – indica o tempo em que o animal permaneceu no quadrante onde estava a plataforma no dia anterior; Tempo no contador do dia anterior (segundos) – oferece a informação sobre a precisão com a qual o animal busca no contador do dia anterior a plataforma, ou seja, a piscina é delimitada por quatro áreas circulares que são definidas como contadores, presentes uma em cada quadrante; Tempo de permanência no anel externo, interno, central (segundos) – indica a forma como o animal explora o ambiente criando relações espaciais para a sua navegação no anel central, interno e externo.

3.6 Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado se encontra a 70 cm do nível do chão, composto por 2 braços fechados e 2 braços abertos. Cada braço mede 45 centímetros de comprimento por 10 cm de largura. Os braços fechados continham paredes de 10 cm de altura, e os braços abertos apenas 2 cm de altura.

No dia treino, os ratos eram injetados com a toxina ou a solução controle e após 30 minutos dava-se início ao treino, com duração de 10 minutos, contabilizando o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Após 24 horas da injeção intrahipocampal, dava-se início ao teste, com duração de 5 minutos, e assim como o dia treino, contabilizava-se também o tempo e o número de entradas nos braços.

3.6.1 Parâmetros analisados no Labirinto em Cruz Elevado

Para a análise da ansiedade, os determinantes críticos analisados são: Nº de entradas nos braços abertos e fechados: número de entradas que o animal realiza ao decorrer do treino e do teste; Tempo gasto nos braços abertos e fechados: tempo que o animal gastou nos braços abertos e fechados ao total do treino e do teste;

3.7 Análise histológica

O processamento para análise histológica do cérebro foi realizado 7 dias após a administração das toxinas ou solução controle. Os ratos foram anestesiados com gás carbônico e fixados através de perfusão transaórtica, utilizando tampão fosfato salina (PBS) a 0,9% (15 min) e solução formolaldeído a 4% (25 min). Foi utilizada a bomba peristáltica EasyLoad, Masterflex®, modelo 7518-60, com velocidade de 1 ml/min.

Os ratos foram decapitados e as cabeças colocadas em potes contendo formol a 4% “overnight”. No dia seguinte, os cérebros foram retirados da calota craniana e colocados em um pote contendo formol a 4% overnight.

Após a retirada dos cérebros do formol, foram realizadas trocas de 1 em 1 hora de álcool absoluto por 24 horas. No dia seguinte, foram realizadas 2 trocas de álcool absoluto de 1 em 1 hora, seguidas de 3 trocas de xilol de 1 em 1 hora. Em seguida foi realizada a inclusão dos cérebros na parafina a 58°C por meio de 3 trocas de parafina, de 1 em 1 hora.

As peças foram emblocadas, e após a identificação, foram armazenadas na geladeira até o momento de cortá-los. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo Leica®, com espessura de 10 micras (cortes coronais). Foi utilizado a coloração de Nissl para a análise das células. Foram escolhidos 7 cortes de cada animal para a contagem das células, sendo que em cada corte foram contadas 3 regiões específicas: CA1, CA3 e GD. Os cortes foram utilizados para determinar a localização das cânulas e as características histológicas gerais do tecido com a contagem de células hipocâmpais para a verificação da presença ou não de lesão no hipocampo. Para a contagem das células, utilizamos o método de Bagetta, sendo que apenas as células com o núcleo visível foram contadas. As células foram ampliadas em torno de 400 vezes e contadas dentro de uma grade de 100 μ^2 .

3.8 Análise estatística

Para a análise dos dados obtidos no Labirinto aquático de Morris e Labirinto em Cruz Elevado, utilizou-se a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni para cada parâmetro analisado. Para a análise estatística dos dados obtidos com a análise histológica quantitativa utilizou-se a análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey através do programa GraphPadPrism 5, com $p < 0,05$.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Labirinto Aquático de Morris

Três dias após a cirurgia estereotáxica, os ratos foram levados para a sala de experimentação, para um período de adaptação de 5 dias, com temperatura constante 21°-22°C, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas e exaustão. Após esse período, iniciou-se o experimento comportamental no Labirinto Aquático de Morris. Os animais foram treinados por sete dias para o aprendizado das tarefas, como descrito no item 3.5.

No 8º dia, dia da injeção, os ratos escolhidos aleatoriamente, receberam as toxinas ou a solução controle, e após 10 minutos da injeção, dava-se início ao teste comportamental. Foram analisados os parâmetros descritos no item 3.5.1, no dia da injeção e pós injeção, 8º e 9º dia, respectivamente.

Com o auxílio de uma rede de limpeza, a piscina era limpa para a retirada de fezes e de maravalha, a cada tentativa. Os ratos eram secos a cada experimento, com o auxílio de uma toalha, e devolvidos para as caixas individuais.

Entre os parâmetros utilizados, foi analisado se houve diferença entre os tipos de tratamentos e o fator tempo após a injeção intrahipocampal (10, 20, 30 e 40 minutos e 24 horas, após a injeção).

No 10º dia, os ratos foram levados ao Biotério do Laboratório de Farmacologia. Sete dias após a injeção unilateral ou bilateral das toxinas ou solução controle, os ratos foram anestesiados e perfundidos para a retirada do cérebro, iniciando o processo da histologia, descrito no item 3.7.

4.1.1 Experimento 1: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da toxina MT- M1α em diferentes concentrações (1 µg/µl e 2 µg/µl) sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris

Foram utilizados 24 ratos, divididos em 4 grupos: dois experimentais e dois controles. Os animais dos grupos experimentais receberam a toxina MT-M1α, pela via intrahipocampal unilateral, na concentração de 1 µg/µl (N=7) ou 2 µg/µl (N=7), enquanto os ratos dos grupos controles (N=10) receberam pela mesma via apenas Ringer Lactato 1 µg/µl, conforme descrito no item 3.4.

Após a injeção intrahipocampal, o comportamento no Labirinto Aquático de Morris foi avaliado, conforme descrito acima.

4.1.2 Experimento 2: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da toxina MT-MI α na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris

Foram utilizados 12 ratos, divididos em 2 grupos: um experimental e um controle. Os animais do grupo experimental receberam a toxina MT-MI α , pela via intrahipocampal bilateral, na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (N=7), enquanto os ratos do grupo controle (N=5) receberam pela mesma via apenas Ringer Lactato 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, conforme descrito no item 3.4.

Após a injeção intrahipocampal, o comportamento no Labirinto Aquático de Morris foi avaliado, conforme descrito acima.

4.1.3 Experimento 3: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da toxina MT-MI β em diferentes concentrações (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris

Foram utilizados 24 ratos, divididos em 4 grupos: dois experimentais e dois controles. Os animais dos grupos experimentais receberam a toxina MT-MI β , pela via intrahipocampal unilateral, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (N=7) ou 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (N=7), enquanto os ratos dos grupos controles (N=10) receberam pela mesma via apenas Ringer Lactato 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, conforme descrito no item 3.4.

Após a injeção intrahipocampal, o comportamento no Labirinto Aquático de Morris foi avaliado, conforme descrito acima.

4.1.4 Experimento 4: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da toxina MT-MI β na concentração de 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris

O grupo experimental recebeu a MT-MI β na concentração de 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (N=7). O grupo controle recebeu a solução Ringer Lactato (N=5), ambos por via intrahipocampal.

Foram utilizados 12 ratos, divididos em 2 grupos: um experimental e um controle. Os animais do grupo experimental receberam a toxina MT-MI β , pela via intrahipocampal bilateral, 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (N=7), enquanto os ratos do grupo controle (N=5) receberam pela mesma via apenas Ringer Lactato 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, conforme descrito no item 3.4.

Após a injeção intrahipocampal, o comportamento no Labirinto Aquático de Morris foi avaliado, conforme descrito acima.

4.1.5 Experimento 5: Análise histológica dos cérebros dos animais injetados bilateralmente com as toxinas MT-MI α ou MT-MI β , avaliados no Labirinto Aquático de Morris

Após 7 dias das injeções intrahipocampais, os ratos eram perfundidos, dando início ao processo histológico, conforme descrito no item 3.7.

4.2 Labirinto em cruz elevado

Três dias após a cirurgia estereotáxica, foram injetados nos ratos as toxinas ou a solução controle, conforme descrito no item 3.5.

Após 30 minutos da injeção, deu-se início ao dia treino, com duração de 10 minutos, avaliando os parâmetros descritos no item 3.6.1. A cada experimento comportamental dos ratos, os braços do labirinto eram limpos com álcool 5%. Com o término no treino, eles eram devolvidos as gaiolas, retornando ao biotério do laboratório de Farmacologia II.

Após 24 h da injeção, dava-se início ao dia teste, com duração de 5 minutos, avaliando os mesmos parâmetros utilizados no dia anterior. Sete dias após a injeção das toxinas ou solução controle, os ratos foram anestesiados e perfundidos para a retirada do cérebro, iniciando o processo da histologia, descrito no item 3.7.

4.2.1 Experimento 6: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral das toxinas, MT-MI α e MT-MI β , nas concentrações de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectivamente, sobre a ansiedade avaliada no Labirinto em Cruz Elevado

Foram utilizados 19 ratos, divididos em 3 grupos: dois experimentais e um controle. Os animais do grupo experimental receberam a toxina MT-MI α , pela via intrahipocampal bilateral, na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (N=7) ou a toxina MT-MI β , na concentração de 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (N=7), enquanto os ratos do grupo controle (N=5) receberam pela mesma via apenas Ringer Lactato (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), conforme descrito no item 3.4.

Após a injeção intrahipocampal, o comportamento no Labirinto em cruz elevado foi avaliado, conforme descrito acima.

4.2.2 Experimento 7: Análise histológica dos cérebros dos animais injetados bilateralmente com as toxinas MT-MI α ou MT-MI β , avaliados no Labirinto em Cruz Elevado

Após 7 dias das injeções intrahipocampais, os ratos eram perfundidos, dando início ao processo histológico, conforme descrito no item 3.7.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da toxina MT-Ml α em diferentes concentrações (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris

- Concentração 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$:

A análise de Variância ANOVA não revelou diferença significativa entre os animais dos grupos tratados ou não com a toxina MT-Ml α , tanto no dia da inoculação (8º dia) como no dia pós-inoculação (9º dia) nos testes de memória operacional espacial. Assim, a administração intrahipocampal unilateral da MT-Ml α , na concentração 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, não alterou o desempenho dos animais em nenhum dos parâmetros avaliados, quando comparados aos observados pelos animais do grupo controle, em relação à interação entre os tratamentos ($\#p<0,05$) e entre as tentativas ($*p<0,05$) (Figuras 2-9).

• Latência:

Figura 2: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Ml α (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

• Comprimento do trajeto:

Figura 3: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Ml α (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

- Velocidade do percurso:

Figura 4: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Ml α (1 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

- Tempo de permanência no quadrante do dia anterior:

Figura 5: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Ml α (1 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

- Porcentagem do tempo de permanência no quadrante do dia anterior:

Figura 6: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Ml α (1 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

- Tempo de permanência no anel externo:

Figura 7: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Mlα (1 µg/µl) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média ± erro padrão.

- Tempo de permanência no anel interno:

Figura 8: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Mlα (1 µg/µl) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média ± erro padrão.

- Tempo de permanência no anel central:

Figura 9: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Mlα (1 µg/µl) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média ± erro padrão.

- Concentração 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$:

Segundo ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni, os efeitos apresentados por meio da administração intrahipocampal unilateral da toxina MT-MI α na concentração de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, foram significantes para o parâmetro tempo e porcentagem de permanência no quadrante do dia anterior, avaliados no dia pós-inoculação, em relação à interação entre as tentativas (* $p < 0,05$) (Figuras 13 e 14).

No dia da pós-inoculação (9º dia), os animais injetados com a toxina permaneceram menos tempo no quadrante do dia anterior, quando comparados aos animais do grupo controle (figura 13), mostrando que a toxina MT-MI α , administrada unilateralmente na concentração de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, provavelmente exerce um efeito amnésico.

- Latência:

Figura 10: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-MI α (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

- Comprimento do trajeto:

Figura 11: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-MI α (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

- Velocidade do percurso:

Figura 12: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Mla ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

- Tempo de permanência no quadrante do dia anterior:

Figura 13: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Mla ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas.

- Porcentagem do tempo de permanência no quadrante do dia anterior:

Figura 14: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Mla ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas.

- Tempo de permanência no anel externo:

Figura 15: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Mla ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

- Tempo de permanência no anel interno:

Figura 16: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Mla ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

- Tempo de permanência no anel central:

Figura 17: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-Mla ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

5.2 Experimento 2: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da toxina MT-Ml α na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris

Segundo ANOVA, os efeitos apresentados por meio da administração intrahipocampal bilateral da toxina MT-Ml α na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, foram significantes para os parâmetros avaliados no dia da inoculação e pós-inoculação, em relação à interação entre os tratamentos ($\#p<0,05$) e entre as tentativas ($*p<0,05$) (Figuras 18-26).

No dia da pós-inoculação (9º dia), durante a 1ª tentativa, os animais injetados com a toxina, gastaram mais tempo procurando a plataforma (figura 18), percorrendo assim um caminho maior (figura 19), permanecendo menos tempo no quadrante e no contador do dia anterior (figuras 21 e 23) quando comparados ao grupo controle. Esses dados mostram que a toxina MT-Ml α , administrada bilateralmente na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, provavelmente exerce um efeito amnésico, interferindo com a consolidação da memória em relação à localização da plataforma.

- Latência:

Figura 18: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-Ml α (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p<0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. # $p<0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

- Comprimento do trajeto:

Figura 19: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-Ml α (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. # $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

- Velocidade do percurso:

Figura 20: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-Ml α (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. # $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

- Tempo de permanência no quadrante do dia anterior:

Figura 21: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-Ml α (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. # $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

- Porcentagem do tempo de permanência no quadrante do dia anterior:

Figura 22: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-Ml α (1 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. # $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

- Tempo de permanência no contador do dia anterior:

Figura 23: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-Ml α (1 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas.

- Tempo de permanência no anel externo:

Figura 24: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-Ml α (1 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas.

- Tempo de permanência no anel interno:

Figura 25: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-Ml α (1 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas.

- Tempo de permanência no anel central:

Figura 26: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-Ml α (1 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. # $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

5.3 Experimento 3: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da toxina MT-MI β em diferentes concentrações (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris

- Concentração 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$:

A toxina MT-MI β administrada unilateralmente na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, causou alta hiperatividade e agressividade nos animais, sendo então uma concentração descartada, podendo interferir com os efeitos comportamentais avaliados no Labirinto Aquático de Morris.

- Concentração 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$:

Segundo ANOVA, os efeitos apresentados por meio da administração intrahipocampal unilateral da toxina MT-MI β na concentração de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, foram significantes para os parâmetros avaliados no dia da inoculação e pós-inoculação, em relação à interação entre os tratamentos ($\#p<0,05$) e entre as tentativas ($*p<0,05$) (Figuras 27-32).

No dia da pós-inoculação (9º dia), durante a 1ª tentativa, os animais injetados com a toxina, gastaram mais tempo procurando a plataforma (figura 27), aumentando o trajeto (figura 28), desenvolvido principalmente no quadrante do dia anterior (figura 30) quando comparados ao grupo controle. Esses dados mostram que a toxina MT-MI β , administrada unilateralmente na concentração de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, provavelmente exerce um efeito facilitatório quanto a melhor recuperação da informação sobre a localização da plataforma adquirida no dia anterior.

- Latência:

Figura 27: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-MI β (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p<0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. # $p<0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento

- Comprimento do trajeto

Figura 28: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-MI β (0,25 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. $*$ p<0,05 em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. $\#$ p<0,05 em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

- Velocidade do percurso:

Figura 29: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-MI β (0,25 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. $*$ p<0,05 em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. $\#$ p<0,05 em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

- Tempo de permanência no quadrante do dia anterior:

Figura 30: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-MI β (0,25 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. $*$ p<0,05 em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. $\#$ p<0,05 em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

- Porcentagem do tempo de permanência no quadrante do dia anterior:

Figura 31: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-MI β (0,25 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas.

- Tempo de permanência no contador do dia anterior:

Figura 32: Efeitos da injeção intrahipocampal unilateral da MT-MI β (0,25 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. # $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

5.4 Experimento 4: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da toxina MT-MI β na concentração de 0,125 μ g/ μ l sobre a memória espacial avaliada no Labirinto Aquático de Morris

Segundo ANOVA, os efeitos apresentados por meio da administração intrahipocampal bilateral da toxina MT-MI β na concentração de 0,125 μ g/ μ l, foram significantes para os parâmetros avaliados no dia da inoculação e pós-inoculação, em relação à interação entre os tratamentos (# $p < 0,05$) e entre as tentativas (* $p < 0,05$) (Figuras 33-41).

No dia da pós-inoculação (9º dia), durante a 1ª tentativa, os animais injetados com a toxina, gastaram mais tempo procurando a plataforma (figura 33), porém esse tempo foi gasto no quadrante do dia anterior (figura 36), demonstrando que a toxina MT-MI β , administrada

bilateralmente na concentração de 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, provavelmente exerce um efeito facilitatório quanto à recuperação da informação da localização da plataforma.

- Latência:

Figura 33: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-MI β (0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. # $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

- Comprimento do trajeto:

Figura 34: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-MI β (0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. # $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

- Velocidade do percurso:

Figura 35: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-MI β (0,125 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

- Tempo de permanência no quadrante do dia anterior:

Figura 36: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-MI β (0,125 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. # $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

- Porcentagem do tempo de permanência no quadrante do dia anterior:

Figura 37: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-MI β (0,125 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

- Tempo de permanência no contador do dia anterior:

Figura 38: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-MI β (0,125 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

- Tempo de permanência no anel externo:

Figura 39: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-MI β (0,125 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas. # $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto ao tratamento.

- Tempo de permanência no anel interno:

Figura 40: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-MI β (0,125 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle, quanto às tentativas.

- Tempo de permanência no anel central:

Figura 41: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-MI β (0,125 μ g/ μ l) em função das 4 tentativas das sessões realizadas nos dias da inoculação e pós-inoculação no teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão.

5.5 Experimento 5: Análise histológica dos cérebros dos animais injetados bilateralmente com as toxinas, MT-MI α ou MT-MI β , avaliados no Labirinto Aquático de Morris

Pela análise da histologia dos cérebros dos animais que receberam a administração intrahipocampal bilateral das toxinas MT-MI α e MT-MI β , pôde-se observar que não houve presença de lesão neuronal com perda significativa ($p < 0,05$) nas regiões CA1, CA3 e Hilus do Giro denteado, quando comparados ao grupo controle (figura 42).

Figura 42: Quantificação das células íntegras de diferentes regiões do hipocampo dorsal de ratos que receberam bilateralmente: 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de solução controle (ringer lactato) ou uma das toxinas utilizadas no trabalho: MT-MI α (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ou de MT-MI β (0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Dados analisados por aumento de microscopia de luz (40x) e expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferenças estatísticas entre as médias foram determinadas pela Análise de Variância ANOVA de 1 via, seguida do teste de Tukey através do programa Prisma 5. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre fixado em ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

5.6 Experimento 6: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral das toxinas, MT-MI α e MT-MI β , nas concentrações de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectivamente, sobre a ansiedade avaliada no Labirinto em Cruz Elevado

Segundo ANOVA, os animais injetados com ambas as toxinas, permaneceram por mais tempo nos braços fechados do que nos braços abertos, indicando provavelmente um efeito ansiogênico das toxinas.

Os animais injetados com MT-MI α ou MT-MI β , permaneceram por mais tempo nos braços fechados quando comparados aos animais do grupo controle, sendo que este tempo, como esperado, diminuiu significativamente entre os grupos, após 24 horas da injeção. Quanto ao número de entradas nesses braços, observou-se que não houve diferença significativa entre o tipo de tratamento entre os grupos, somente entre o tempo após a injeção intrahipocampal, ou seja entre o treino e o teste, diminuindo, portanto o número de entradas nos braços fechados.

Verificou-se também que os animais injetados com MT-MI α ou MT-MI β , permaneceram por menos tempo nos braços abertos quando comparados aos animais do grupo controle. Efeito observado também quanto ao número de entradas nesses braços.

O tempo de permanência nos braços abertos e o número de entradas nesses braços diminuíram significativamente entre a sessão de treino e teste, sendo que o tipo de tratamento, com as toxinas ou com a solução controle, também foi significativa e determinante para a identificação do efeito ansiogênico.

- Braços fechados:

Figura 43: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-MI α (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ou da MT-MI β (0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ou solução controle, nos braços fechados, quanto ao tempo de permanência e o número de entradas.

* p < 0,05 em relação aos animais do grupo controle quando comparado com os animais do grupo toxina, quando comparados ao dia treino ou teste.

# p < 0,05 em relação aos animais do grupo controle quando comprado ao tipo de tratamento nas sessões treino e teste.

- Braços abertos:

Figura 43: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-Mlα (1 µg/µl) ou da MT-Mlβ (0,125 µg/µl) ou solução controle, nos braços abertos, quanto ao tempo de permanência e o número de entradas.

* $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle quando comparado com os animais do grupo toxina, quando comparado no dia treino ou teste.

# $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle quando comprado ao tipo de tratamento nas sessões treino e teste.

Comparação entre a MT-Mlα e MT-Mlβ no Labirinto em cruz elevado.

Segundo ANOVA, a toxina MT-Mlβ, apresentou um efeito sobre a ansiedade significativamente maior quando comparado à toxina MT-Mlα, pois o tempo de permanência nos braços fechados foi maior. Porém, quando comparado o tempo de permanência nos braços abertos e o número de entradas nesses braços, houve diferença significativa somente entre o tempo após a injeção das toxinas, com diminuição de tempo e entradas, após 24 horas das injeções (sessão teste).

- Braços fechados:

Figura 45: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-Mlα (1 µg/µl) ou da MT-Mlβ (0,125 µg/µl), nos braços fechados, quanto ao tempo de permanência e o número de entradas.

* $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo toxina, quando comparado no dia treino ou teste.

# $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo toxina, quando comparado ao tipo de tratamento nas sessões treino e teste.

- Braços abertos:

Figura 43: Efeitos da injeção intrahipocampal bilateral da MT-M1α (1 µg/µl) ou da MT-M1β (0,125 µg/µl), nos braços abertos, quanto ao tempo de permanência e o número de entradas.

* p<0,05 em relação aos animais do grupo toxina, quando comparado no dia treino ou teste.

# p<0,05 em relação aos animais do grupo toxina, quando comparado ao tipo de tratamento nas sessões treino e teste.

5.7 Experimento 7: Análise histológica dos cérebros dos animais injetados bilateralmente com as toxinas MT-MI α ou MT-MI β , avaliados no Labirinto em Cruz Elevado

Pela análise da histologia dos cérebros dos animais que receberam a administração intrahipocampal bilateral das toxinas MT-MI α e MT-MI β , pôde-se observar que não houve presença de lesão neuronal com perda significativa ($p < 0,05$) nas regiões CA1, CA3 e Hilus do Giro denteado, quando comparados ao grupo controle (figura 47).

Figura 47: Quantificação das células íntegras de diferentes regiões do hipocampo dorsal de ratos que receberam bilateralmente: 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de solução controle (ringer lactato) ou uma das toxinas utilizadas no trabalho: MT-MI α (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ou MT-MI β (0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Dados analisados por aumento de microscopia de luz e expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferenças estatísticas entre as médias foram determinadas pela Análise de Variância ANOVA de 1 via, seguida do teste de Tukey através do programa Prisma 5. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre fixado em ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

6 DISCUSSÃO

A ACh é ativada por diferentes subtipos de receptores muscarínicos, M1 a M5, os quais são importantes para a regulação independente de respostas excitatórias e inibitórias, via outros neuromoduladores e segundos mensageiros. Quando ativados, o efeito final pode ser a abertura ou fechamento de canais de K^+ , Ca^{2+} , ou Cl^- , dependendo do tipo de célula. Com essa variedade de atividade de canais, no entanto, a estimulação de mAChRs poderá levar tanto para despolarização ou hiperpolarização dos neurônios (COOPER et al., 1996).

O subgrupo de receptores muscarínicos, M2 e M4 são acoplados à proteína Gi/G0 e quando localizados no terminal pré-sináptico, controlam negativamente a liberação de neurotransmissores (GABA, Glutamato (GLU) e ACh) através da ativação dos canais de K^+ que hiperpolarizam a célula inibindo a ativação dos canais de Ca^{2+} , necessários para a exocitose dos neurotransmissores (TAYLOR; BROWN, 1999).

Os subtipos M1, M3 e M5, são localizados na pós-sinapse, com função excitatória, os quais são acoplados a proteína Ge, que estimulam a produção de AMPc, IP_3 , além do Ca^{2+} citosólico (JERUSALINSKY; HARVEY, 1994).

Dados anteriores de nosso laboratório mostraram que as toxinas MT-M1 α e MT-M1 β têm afinidade por receptores muscarínicos e inibem a produção de IP_3 hipocampo de ratos, indicando um perfil de antagonistas muscarínicos. Vale ressaltar que somente a verificação dos níveis de IP_3 não é o suficiente para a confirmação da caracterização do perfil antagonista, por isso, experimentos no laboratório estão em andamento para a verificação dos níveis de AMPc para a confirmação de sua ação nos receptores muscarínicos bem como a determinação dos níveis de Ca^{++} intracelular.

Assim, nossos dados mostraram que estas toxinas, mesmo indicando uma característica semelhante, como o antagonismo muscarínico, apresentaram efeitos contrários na avaliação do aprendizado e memória no Labirinto Aquático de Morris. Analisemos os resultados do presente trabalho frente às alterações que possam ter ocorrido no sistema colinérgico muscarínico devido à ação da injeção intrahipocampal dessas toxinas.

A análise dos resultados obtida no dia da inoculação não mostrou alterações no desempenho dos animais inoculados tanto com a MT-M1 α ou com a MT-M1 β . Este dado mostra que as toxinas não alteram a memória de curto prazo. No entanto, os testes feitos 24 horas após a injeção (dia pós-inoculação) mostraram que as toxinas, alteram o comportamento dos animais, afetando a consolidação e a evocação da memória de longo prazo, efeito que mostrou ser dependente da concentração utilizada.

Assim, no dia pós-inoculação, os animais injetados com a toxina MT-M1 α , dependendo da concentração, gastaram mais tempo procurando a plataforma, e com isso percorreram um maior caminho na piscina, quando comparados aos animais do grupo controle, indicando que os animais não lembravam o local da plataforma do dia anterior. Fato indicado pela análise do parâmetro do tempo no quadrante do dia anterior, o qual foi menor quando comparado ao grupo controle, mostrando assim um efeito amnésico da toxina no dia pós-inoculação.

Por outro lado, os animais injetados com a toxina MT-M1 β , independentemente da concentração, avaliados no dia pós-inoculação, permaneceram mais tempo procurando a plataforma no quadrante e no contador do dia anterior, quando comparados ao grupo controle. Diferentemente da toxina MT-M1 α , a MT-M1 β apresentou efeitos facilitatórios quanto à evocação da memória.

Esses efeitos, amnésico (MT-M1 α) e facilitatório (MT-M1 β) quanto à evocação, podem estar relacionados com os diferentes subtipos de receptores muscarínicos, os quais estas toxinas podem ter maior ou menor afinidade. Neste sentido, dados da literatura mostram que os diferentes subtipos de receptores muscarínicos são importantes para a regulação independente de respostas excitatórias e inibitórias, via outros neuromoduladores e segundos mensageiros. Neste sentido, a complexidade das respostas induzidas pela ativação/inibição dos mAChRs, mostram respostas muscarínicas de despolarização, hiperpolarização e bifásica em interneurônios hipocâmpais (BELL; BELL; McQUISTON, 2013).

O efeito amnésico da toxina MT-M1 α sobre o processo de evocação da memória, pode ser interpretada como uma ação inibitória sobre os receptores muscarínicos M1 excitatórios pós-sinápticos, o que concorda com uma ação antagonista nesses receptores (FERREIRA et al., 2003).

A literatura mostra que a toxina MT2 da *Dendroapsis* foi caracterizada como um agonista com alta afinidade para o subtipo M1, quando comparada ao subtipo M4, com baixa ou quase nula afinidade para os outros subtipos. A toxina MT2, na concentração de 0,75 μ g/lado, quando injetada bilateralmente no hipocampo de ratos causou uma facilitação na memória (DIEHL et al., 2010)

Segundo Anagnostaras et al. (2003) camundongos *knockout* (KO) para o subtipo M1, apresentaram uma redução no potencial hipocâmpal de longa duração, mecanismo implicado no aprendizado e memória. Em termos de comportamento, esses camundongos KO apresentaram déficits em tarefas cognitivas, dependentes do córtex pré-frontal medial.

Para a verificação do envolvimento do subtipo M1 no perfil comportamental, Vanover, Veinbergs e Davis (2008) demonstraram que o uso de um agonista alostérico AC-260584 seletivo para o subtipo M1, aumentou o tempo de retenção da informação sobre a localização da plataforma no Labirinto Aquático de Morris. Visto que os receptores excitatórios M1 modulam positivamente tanto o processo de consolidação como o de evocação, dados da literatura mostram que o efeito amnésico de antagonistas pouco seletivos ocorre por ação em receptores muscarínicos M1 (FERREIRA et al., 2003).

Estudos anteriores de nosso grupo confirmam que a toxina MT-M1 α tem uma ação inibitória na via de formação de IP₃ no hipocampo de ratos, indicando um perfil de antagonista muscarínico M1 e/ou M3. Provavelmente a inibição dessa via pela MT-M1 α também estaria envolvida na diminuição dos níveis de diversos neurotransmissores (SILVA et al., 2011), entre eles a ACh, justificando o efeito amnésico.

Em relação aos efeitos observados com a MT-M1 β , poderíamos sugerir que esta toxina poderia estar agindo como um antagonista muscarínico em receptores pré-sinápticos M2 e/ou M4 facilitaria a liberação de ACh ou como um modulador em sinapses glutamatérgicas, facilitando a liberação desse neurotransmissor. Como consequência, poderíamos ter uma facilitação na evocação da memória, fato que foi observado 24 horas após a injeção da MT-M1 β .

Segundo Quillfeldt et al. (2013) os processos de consolidação e evocação da memória são modulados pelos receptores colinérgicos M1 e M2/M4. Esses receptores apresentam localizações e funções metabotrópicas diferentes e opostas.

A atividade inibitória do receptor M2/M4, que ocorre com a presença de agonistas muscarínicos ou do próprio mediador endógeno, pode se dar através da ativação de canais de K⁺, que promovem a hiperpolarização da célula, não permitindo assim, a abertura de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem, responsáveis pela liberação de neurotransmissores. Ainda, estudos farmacológicos e eletrofisiológicos sugerem que os subtipos M2 atuam como autoreceptores, regulando a liberação de ACh, essa estimulação levaria a diminuição da transmissão colinérgica (CONSOLO et al., 1987; EGAN; NORTH, 1986; McKINNEY; MILLER; AAGAARD, 1993; POHORECKI; HEAD; DOMINO, 1988; STILLMAN et al., 1996). Por outro lado, o bloqueio dessa via por um antagonista levaria a facilitação da liberação de neurotransmissores. Auld et al. (2000), Lapchack et al. (1989) e Richard, Wilson e Quirion (1991) comprovaram esta hipótese, bloqueando o subtipo M2, produzindo um aumento dos níveis de ACh, *in vitro* e *in vivo*.

Estudos utilizando camundongos (KO) para o subtipo M2 mostraram que houve uma facilitação do aprendizado e memória. O bloqueio farmacológico de receptores do subtipo M2 ou deleção genética para este receptor, parece ter um efeito similar sobre a liberação da ACh, e seus receptivos impactos na aprendizagem e na memória, melhorando o sistema cognitivo (BAINBRIDGE et al., 2008).

Segundo Carey et al. (2001) o uso de um antagonista muscarínico para M2, SCH-57790, produziu um aumento na liberação de ACh no SNC, melhorando a performance cognitiva nos roedores.

Com o aumento dos níveis de ACh por antagonistas farmacológicos de M2, ocorre a restauração da liberação nesse neurotransmissor após a sinalização colinérgica ter sido diminuída com a administração de fármacos ou através de doenças relacionadas ao sistema cognitivo, como exemplo a Doença de Alzheimer (BAINBRIDGE et al., 2008).

Nossa hipótese de uma possível ação em receptores M2 é apoiada por experimentos de nosso laboratório que mostraram que a toxina MT-M1 β tem grande afinidade por este subtipo muscarínico, presentes em coração de rato, órgão que expressa preferencialmente mAChRs do subtipo M2 (experimentos de nosso laboratório ainda não publicados).

Um mecanismo alternativo para a hipótese da ação facilitatória da MT-M1 β nos subtipos M2 e/ou M4 sobre a liberação de ACh seria um efeito da toxina também sobre a liberação de GLU. Esses subtipos muscarínicos são localizados na pré-sinapse em neurônios colinérgicos, na via de entrada ao hipocampo (via perforante medial) (ROUSE et al., 1999). Assim, propomos que a toxina estaria agindo em sinapses axoaxonais modulando a liberação de outros neurotransmissores, entre eles o GLU. Esta hipótese é corroborada pelo trabalho de Diehl et al. (2010) que demonstraram que a MT3, toxina isolada da *Dendroapsis*, antagonista seletivo para o subtipo M4, na concentração de 2,0 μ g/lado, quando injetada bilateralmente no hipocampo apresentou um efeito facilitatório sobre a evocação das informações. Estes autores propõem que durante o processo de evocação, a MT3 pode estar atuando diretamente no terminal axonal de um neurônio excitatório (glutamatérgico), antagonizando o receptor M4, que teria ali, o papel de controlar a liberação de GLU na fenda sináptica. Além disso, o fenômeno plástico da consolidação e evocação da memória dependem do sistema glutamatérgico e assim os autores sugerem que estas sinapses também passariam a expressar novos receptores M4.

A função hipocampal envolve duas vias diferentes: uma via com ação pré-sináptica, que inibe a liberação de várias substâncias, tais como o GLU, o aspartato, o ácido γ -aminobutírico, e a ACh. A segunda via é através de excitação pós-sináptica das sinapses

centrais (LEVEY, 1996; RUSSO et al., 1993; VAN DER ZEE; LUITEN, 1999). Embora o papel funcional do receptor M4 ainda não seja claro, tem sido sugerido que um dos efeitos da ACh sobre este subtipo de receptor é a modulação para a liberação de neurotransmissores (RUSSO et al., 1993).

Se os receptores M4 têm um papel semelhante em seres humanos, a diminuição desses receptores pode ser responsável por déficits cognitivos em doenças relacionadas ao sistema nervoso, como a doença de Alzheimer. Segundo Mulugeta et al. (2003) os níveis de receptores M4 apresentaram-se diminuídos no GD e na região do CA4 sugerindo que, em relação a outros subtipos, o subtipo M4 pode estar envolvido na função cognitiva, nos pacientes com Alzheimer.

A Doença de Alzheimer, caracterizada pela perda progressiva da memória – em geral é caracterizada, entre outros fatores, pela redução nos níveis de ACh em algumas regiões cerebrais. Por essa razão, uma das classes de medicamentos mais usados para amenizar os efeitos da doença tenta reverter a carência desse neurotransmissor (ACh). Compostos como tacrine, galantamina e rivastagmina (inibidores de acetilcolinesterase) auxiliam no aumento da disponibilidade de ACh no SNC (LEVEY, 1996; RODRIGUEZ-PUERTAS et al., 1997).

A recente descoberta de novos agonistas alostéricos e moduladores de M1 e M4 validaram mais a abordagem de direcionamento desses subtipos muscarínicos no tratamento de alterações cognitivas e comportamentais presentes na Doença de Alzheimer e Esquizofrênia. (FOSTER et al., 2014).

Observamos, portanto, que a toxina MT-M1 α , causou um efeito amnésico, fato que pode estar relacionado com a diminuição da liberação da ACh, com uma ação antagonista sobre o subtipo M1. A toxina MT-M1 β , causou um efeito facilitatório, resultado que pode estar relacionado com o aumento da liberação da ACh, com ação antagonista sobre o subtipo M2 e/ou M4.

A análise histológica dos hipocampus injetados com a MT-M1 α e a MT-M1 β , independentemente da concentração, não mostrou lesão neuronal em nenhuma das concentrações utilizadas. Segundo Oliveira et al. (2008) a toxina MT-M1 β , dotada de atividade fosfolipásica A₂, quando injetada no hipocampo, nas concentrações de 1,4 e 2,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, causaram lesões neuronais nas regiões CA1, CA3 e GD, já na concentração de 0,57 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, não foram observadas lesões nessas regiões. Em vista destas informações, escolhemos para os experimentos desta Dissertação concentrações inferiores, com o objetivo de não causarem lesões hipocâmpais, o que provavelmente afetaria os experimentos comportamentais.

No Labirinto Aquático de Morris podemos avaliar também os níveis de ansiedade quanto ao tempo de permanência nos anéis externo, interno e central. Ratos com maiores níveis de ansiedade tendem a permanecer mais tempo nos anéis externos, e quando esses níveis são mais baixos, eles tendem a explorar mais a piscina, consequentemente o tempo passa a ser maior nos anéis centrais e internos (HOOGE et al., 2001)

Quanto ao tempo de permanência nos anéis, não foi observada diferença entre os tratamentos, ou seja, os animais injetados com a toxina MT-MI α permaneceram a mesma quantidade de tempo no anel externo, quando comparados aos animais do grupo controle. As diferenças observadas foram apenas entre as tentativas. A maior permanência no anel externo, durante a primeira tentativa, pode indicar uma ansiedade natural dos animais, estando o comportamento exploratório restrito a borda da piscina.

Por outro lado, os animais injetados com a toxina MT-MI β , permaneceram por mais tempo no anel externo quando comparados com os animais do grupo controle, sendo que durante a primeira tentativa, permaneceram por mais de 50% do tempo neste anel. A partir da segunda tentativa observa-se que não há mais diferença entre os tratamentos, mas apenas entre as tentativas. Este tempo foi diminuindo gradativamente nas tentativas seguintes, de acordo com o tempo após a injeção intrahipocampal, passando a explorar mais os anéis centrais e internos. Os animais injetados com a toxina MT-MI β , mostraram níveis maiores de ansiedade na primeira tentativa, o que pode ter contribuído para o efeito facilitatório da memória, pois sabe-se que a ansiedade, até certo nível, pode favorecer o desempenho cognitivo. Neste sentido, os resultados obtidos no Labirinto em Cruz Elevado confirmaram que a toxina MT-MI β realmente induziu ansiedade nos animais indicando efeito ansiogênico, a qual foi maior que a causada pela toxina MT-MI α . Esse fato pode indicar um efeito facilitatório da evocação da memória induzido pela MT-MI β .

Segundo Graeff, Viana e Tomaz (1993) até certo nível, a ansiedade favoreceria o desempenho de tarefas motoras e cognitivas, sendo assim considerada fisiológica, mas passa a ser patológica quando passa a interferir no comportamento normal do indivíduo. Visto que, a relação da ansiedade e memória parece seguir a curva de Gauss, onde o melhor desempenho ocorre no cume da curva, quando os níveis de ansiedade estão em um nível ideal (SALEHI et al., 2012). Nossos dados estão de acordo com estudos que sugerem que benzodiazepínicos, maior classe de ansiolíticos, induzem amnésia anterógrada (COMISSARIS, 1993; CASTELLANO; CABIB; PUGLISIALLEGRA, 1996; WICHLINSKI; JENSEN, 1996), enquanto drogas ansiogênicas podem, em alguns casos, melhorar a memória (BATES, 1996;

IZQUIERDO; PEREIRA; MEDINA, 1990; IZQUIERDO; MEDINA, 1997; KALUEF, 2007; RIBEIRO et al., 1997).

Os mecanismos neurobiológicos das interações memória e ansiedade ainda não estão bem compreendidos. Tem sido sugerido que tanto o córtex pré-frontal como o hipocampo são regiões importantes para a interação entre emoção e memória (BANNEMAN et al., 2004). É claro que mais estudos são necessários para melhor esclarecer esta questão.

Evidenciada a complexidade do sistema colinérgico muscarínico no hipocampo podemos entender que conceitos simplistas relacionados ao papel dos mAChRs no processamento da memória precisam ser interpretados com cuidado. Pelo exposto acima, fica claro que a grande diversidade de subtipos de receptores muscarínicos, encontrados no hipocampo, permite uma gama de interações muito diversificada.

O fato de ambas as toxinas, MT-MI α e MT-MI β apresentarem afinidade por receptores muscarínicos, não exclui a possibilidade de possuírem afinidade por outros tipos de receptores. Visto que toxinas isoladas de outros venenos elapídicos têm afinidade por receptores muscarínicos, nicotínicos, adrenérgicos e/ou opióides (LIANG et al., 2009), devemos considerar que o complexo hipocampal contém outros neurotransmissores moduladores, entre eles, o sistema opióide que também modula o aprendizado e memória (NAREOJA et al., 2011). Neste sentido, já foram isoladas toxinas com estruturas 3Ftx de serpentes da família elapídica que apresentam uma atividade antinoceptiva em modelos de dor, agindo em receptores muscarínicos (CHEN; ROBINSON, 1990).

Segundo McKinney, Coyle (1991) e Davis, McMurray e Schubert (1992) a possibilidade de terapias colinérgicas para doenças neurodegenerativas, tem sido um grande incentivo para o entendimento dos papéis de mAChRs em funções fisiológicas e em doenças do SNC.

No entanto, os mecanismos pelos quais os mAChRs influenciam comportamentos são pouco compreendidos. Este fato mostra a importância do desenvolvimento de estudos que tenham como foco o entendimento do sistema colinérgico muscarínico. Assim, o desenvolvimento de novas moléculas com atividade específica nos receptores muscarínicos levaria a um grande avanço no conhecimento, pois até o momento não dispomos de fármacos com essa especificidade. Toxinas isoladas de venenos elapídicos são uma grande fonte de moléculas com atividade nesse sistema tornando-se promissor o investimento científico no estudo com essas toxinas.

7 CONCLUSÕES

- A toxina MT-MI α injetada no giro dentado no hipocampo, causou prejuízo na memória de longo prazo sem interferência com a memória espacial de curto prazo.
- A toxina MT-MI α injetada no giro dentado no hipocampo, não causou alterações histopatológicas no hipocampo de ratos.
- A toxina MT-MI β causou um efeito facilitatório quanto a formação da memória de longo prazo, este fato pode estar relacionado com uma melhor recuperação da informação sobre a localização da plataforma adquirida no dia anterior.
- A toxina MT-MI β injetada no giro dentado no hipocampo, não causou alterações histopatológicas no hipocampo de ratos.
- A toxina MT-MI α injetada no giro dentado no hipocampo, aumentou os níveis de ansiedade nos ratos, observados no Labirinto em Cruz Elevado.
- A toxina MT-MI β injetada no giro dentado no hipocampo, aumentou os níveis de ansiedade nos ratos, observados no Labirinto em Cruz Elevado.
- Ambas as toxinas injetadas no giro dentado do hipocampo, utilizadas no Labirinto em cruz elevado, não causaram alterações histopatológicas no hipocampo dos ratos.

REFERÊNCIAS*

- ALBUQUERQUE, E. X.; CONTI-FINE, B. M.; GRANDO, S. A.; HORTON, R. M.; PEREIRA, E. F.; DIETHELM-OKITA, B. M.; GEORGE, P. M. A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed in human keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 6, p. 774-781, 1995.
- ANAGNOSTARAS, S. G.; MURPHY, G. G.; HAMILTON, S. E.; MITCHELL, S. L.; RAHNAMA, N. P.; NATHANSON, N. M. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. **Nat. Neurosci.**, v. 6, p. 51-58, 2003.
- AULD, D. S.; DAY, J. C.; MENNICKEN, F.; QUIRION, R. Pharmacological characterization of endogenous acetylcholine release from primary septal cultures. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 292, p. 692-697, 2000.
- BAINBRIDGE, N. K.; KOSELKE, L. R.; JEON, J.; BAILEY, K. R.; WESS, J.; CRAWLEY, J. N.; WRENN, C. C. Learning and memory impairments in a congenic C57BL/6 strain of mice that lacks the M2 muscarinic acetylcholine receptor subtype. **Behavioural Brain Research**, v. 190, p. 50-58, 2008.
- BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N.; McHUGH, S. B.; DEACON, R. M.; YEE, B. K.; BAST, T.; ZHANG, W. N.; POTHUIZEN, H. H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. **Neurosci. Behav. Rev.**, v. 28, p. 273-283, 2004.
- BARROS, D. M.; PEREIRA, P.; MEDINA, M. J. H.; IZQUIERDO, I. Modulation of working memory and of long-but not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala. **Behavioural Pharmacology**, v. 13, p. 163-167, 2002.
- BATES, P. C. Anxiolytic-Patent analysis. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 6, p. 379-384, 1996.
- BELL, L. A.; BELL, K. A.; McQUISTON, A. R. Synaptic muscarinic response types in hippocampal CA1 interneurons depend on different levels of presynaptic activity and different muscarinic receptor subtypes. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 160-73, 2013.
- BEUZEN, A.; BELZUNG, C. Link between emotional memory and anxiety states: A study by principal component analysis. **Physiol. Behav.**, v. 58, p. 111-118, 1995.
- BRANDEIS, R.; BRANDY'S, Y.; YEHUDA, S. The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. **Inst. J. Neurosci**, v. 48, p. 29-69, 1989.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venoms reptiles of the western hemisphere. **Cornell University Press**. 2 ed. New York: Ithaca, 2004.

---

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CAREY, G. J.; BILLARD, W.; BINCH III, H.; COHEN-WILLIAMS, M.; CROSBY, G.; GRZELAK, M.; GUZIK, H.; KOZLOWSKI, J. A.; LOWE, D. B.; POND, A. J.; TEDESCO, R. P.; WATKINS, R. W.; COFFIN, V. L. SCH 57790, a selective muscarinic M2 receptor antagonist, releases acetylcholine and produces cognitive enhancement in laboratory animals. **European Journal of Pharmacology**, v. 431, p. 189-200, 2001.

CASTELLANO, C.; CABIB, S.; PUGLISIALLEGRA, S. Psychopharmacology of memory modulation: Evidence for multiple interaction among neurotransmitters and hormones. **Behavioural Brain Research**, p. 1-21, 1996.

CHEN, R. Z.; ROBINSON, S. E. The effect of cholinergic manipulations on the analgesic response to cobrotoxin in mice. **Life Sci.**, v. 21, p. 1499-1504, 1990.

CLAPP, L. E.; KLETTE, K. L.; DeCOSTER, M. A.; BERNTON, E.; PETRAS, J. M.; DAVE, J. R.; LASKOSKI, M. S.; SMALLRIDGE, R. C.; TORTELLA, F. C. Phospholipase A2 induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. **Brain Res.**, v. 693, p. 101-111, 1995.

COMISSARIS, R. L. Conflict behaviours as animal models for the study of anxiety. In F. van Haaren (Ed). **Methods in behavioural pharmacology**, p. 443-474, 1993.

CONSOLO, S.; LADINSKYY, H.; VINCI, R.; PALAZZI, E.; WANG, J. An in vivo pharmacological study on muscarinic receptor subtypes regulating cholinergic neurotransmission in rat striatum. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, p. 3075-3077, 1987.

COOPER, E. C.; LOWENSTEIN, D. H. Hippocampus. In: **Encyclopedia of life sciences**. London: Nature Publishing Group, 2001.

COOPER, E. C.; GUTBROD, O.; WITZEMANN, V.; METHFESSEL, C. Pharmacology of the nicotinic acetylcholine receptor from fetal rat muscle expressed in *Xenopus* oocytes. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 15, p. 287-98, 1996.

CÔRREA-NETO, C.; AZEVEDO, I. L. M. J.; SILVA, D. A.; HO, P. L.; ARAÚJO, M. L.; ALVES, M. L. M.; SANZ, L.; FOGUEL, D.; ZINGALI, R. B.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. **Journal of Proteomics**, 2011.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus maze. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 49, p. 171-179, 1994.

DAL BELO, C. A.; LEITE, G. B.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; CORRADO, A. P.; FONTANA, M. D. Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase A2 from *Micrurus dumerilli carinicauda* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 736-750, 2005.

DAVIS, J. B.; McMURRAY, H. F.; SCHUBERT, D. The amyloid beta-protein of Alzheimer's disease is chemotactic for mononuclear phagocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 189, p. 1096-100, 1992.

De CARVALHO, N.; GARCIA, R. C. T.; FERREIRA, A. K.; BATISTA, D. R.; CASSOLA, A. C.; MARIA, D. M.; LEBRUN, I.; CARNEIRO, S. M.; AFECHÉ, S. C.;

MARCOURAKIS, T.; SANDOVAL, M. R. L. Neurotoxicity of coral snake phospholipase A2 in cultured hippocampal neurons. **Brain Research**, v. 1552, p. 1-16, 2014.

DIEHL, F. **Plasticidade de receptores colinérgicos muscarínicos M4 hipocampus decorrentes de uma consolidação da memória como possível marcador sináptico do engrama: ensaios farmacológicos comportamentais**. 2010. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2010.

DOKMETJIAN, J. C.; CANTO, S.; VINZÓN, S.; BONINO, M. B. J. Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. **Toxicon**, v. 53, p. 375-382, 2009.

DORANDEU, F.; PERNOT-MARIANO, I.; VEYRET, J.; PERRICHOM, C.; LALLEMENT, G. Secreted phospholipase A2-induced neurotoxicity and epileptic seizures after intracerebral administration: an unexplained heterogeneity as emphasized with paradoxin and crotoxin. **J. Neurosci. Res.**, v. 54, p. 848-862, 1998.

EGAN, T. M.; NORTH, R. A. Acetylcholine hyperpolarizes central neurons by acting on an M2 muscarinic receptor. **Nature**, v. 319, p. 405-407, 1986.

EGLIN, R. M.; CHOPPIN, A.; STEPAN, G. J.; LOURY, D. N.; WATSON, N. Characterization of the muscarinic receptor in isolated uterus of sham operated and ovariectomized rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 7, p. 1551-8, 1999.

FERREIRA, A. R.; FURSTENAU, L.; KORNISIUK, E.; SANCHEZ, G.; DAROIT, D.; CASTRO e SILVA, M.; CERVENANSKY, C.; JERUSALINSKY, D.; QUILFELDT, J. A Role of hippocampal M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 74, p. 411-415, 2003.

FILE, S. E.; LISTER, R. G. Do the reductions in social interactions produced by picrotoxin and pentylentetrazole indicate anxiogenic actions? **Neuropharmacology**, v. 23, p. 793-796, 1984.

FOSTER, D. J.; CHOI, D. L.; CONN, P. J.; ROOK, J. M. Activation of M1 and M4 muscarinic receptors as potential treatments for Alzheimer's disease and schizophrenia. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 10, p. 183-191, 2014.

FRAZIER, C. J.; BUHLER, A. V.; WEINER, J. L.; DUNWIDDIE, T. V. Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 8228-8235, 1998.

GOLD, P. E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 80, p. 194-200, 2003.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory effects of diazepam. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 26, p. 67-70, 1993.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of α -adrenoreceptors agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HERRERA-MORALES, W.; MAR, I.; SERRANO, B.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Activation of hippocampal postsynaptic muscarinic receptors is involved in long-term spatial memory formation. **Euro. J. Neurosci.**, v. 25, p. 1581-1588, 2007.

HERRERO, A. I.; SANDI, C.; VENERO, C. Individual differences in stress trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors. **Neurobiology**, v. 86, p. 150-159, 2006.

HOOG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 21-30, 1996.

HOOG, R. D.; DEYN, P. P. D. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews**, v. 36, p. 60-90, 2001.

IZQUIERDO, I. Different forms posttraining memory processing. **Behavioral and Neural Biology**, v. 51, p. 171-202, 1989.

IZQUIERO, I.; PEREIRA, M. E.; MEDINA, J. H. Benzodiazepine endogenous modulatory mechanism mediated by benzodiazepine receptor. **Behavioural and Neural Biology**, v. 54, p. 27-41, 1990.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. **Psychobiology**, v. 9, p. 25-29, 1997.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; MELLO e SOUZA, T.; de SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, L. A.; MEDINA, J. H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, p. 635-636, 1998.

JERUSALINSKY, D.; HARVEY, A. Toxins from mamba venoms: small proteins with selectivities for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 15, p. 424-430, 1994.

JERUSALINSKY, D.; KORNISIUK, E.; ALFARO, P.; QUILFELDT, J.; ALONSO, M.; RIAL VERDE, E. Muscarinic toxin selective for M4 receptors impairs memory in the rat. **Neuro. Report**, v. 9, p. 1407-1411, 1998.

LADONDE, R. Visuospatial abilities. **Inst. Rev. Neurobiol.**, v. 41, p. 191-215, 1997.

LAMBEAU, G.; BARHANIN, J.; QAR, J.; LAZDUNSKI, M. Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. **J. Biol. Chem.**, v. 19, p. 11503-10, 1989.

LAMBEAU, G.; BARHANIN, J.; LAZDUNSKI, M. Identification of different receptor types for a toxic phospholipase A2 in rabbit skeletal muscle. **FEBS.Lett**, v. 18, p. 29-33, 1991.

LAPCHAK, P. A.; ARAUJO, D. M.; QUIRION, R.; COLLIER, B. Binding sites for (3H) AF-DX 116 and effect of AF-DX 116 on endogenous acetylcholine release from rat brain slices. **Brain Res.**, v. 426, p. 285-294, 1989.

LEVEY, A. L. Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 13541-13596, 1996.

LIANG, Y.; JIANG, W.; HAN, L.; ZHAO, S. Peripheral and spinal antihyperalgesic activity of najanalgesin isolated from *Naja naja atra* in a rat experimental model of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 460, p. 191-195, 2009.

LISZ, T. W.; ROSENBERG, P. Convulsant activity of Naja naja venom and its phospholipase A component. **Toxicon**, v. 12, p. 253-265, 1974.

KALLUEF, A. V. Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. **Neural. Plasticity**, v. 78, p. 171-183, 2007.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principles of neural science**. 4. ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2000. p. 1414.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 8, p. 827-840, 2003.

KUHLMANN, A. C.; MCGLOTHAN, J. L.; GUILARTE, T. R. Developmental lead exposure causes spatial learning deficits in adult rats. **Neurosci. Lett**, v. 233, p. 101-104, 1997.

MARTYN, A. C.; JAEGER, X. D.; MAGALHÃES, A. C.; KESARWANIA, R.; GONÇALVES, D. F.; RAULICA, S.; GUZMANA, M.; JACKSONA, M. F.; IZQUIERDO, I.; MACDONALD, J. F.; PRADO, M. A.; PRADO, V. F Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the forebrain causes hyperactivity and deficits in spatial memory and long-term potentiation. **PNAS EarlyEdition**, Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1215381109>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

MATHEWS, A. Why worry? The cognitive function of anxiety. **Behav. Res. Ther.**, v. 28, p. 455-568, 1990.

McKINNEY, M.; COYLE, J. T. The potential for muscarinic receptor subtype-specific pharmacotherapy for Alzheimer's disease. **Mayo.Clin.Pro**, v. 12, p. 1225-1237, 1991.

McKINNEY, M.; MILLER, J. H.; AAGAARD, P. J. Pharmacological characterization of the rat hippocampal muscarinic autoreceptor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 264, p. 74-78, 1993.

McGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, v. 153, p. 1351-1358, 1966.

McGAUGH, J. L. Memory – a century of consolidation. **Science**, v. 287, p. 248-251, 2000.

MONTECUCCO, C.; ROSSETTO, O. How do presynaptic PLA2 neurotoxins block nerve terminals. **TrendsBiochem.**, v. 25, p. 166-170, 2000.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47-60, 1981.

MORRIS, R. An attempt to dissociate “spatial-mapping” and “working-memory” theories of hippocampal function. In: Seifert W. Neurobiology of the hippocampus. **London Academic Press**, p. 405-432, 1983.

MULUGETA, E.; KARLSSON, E.; ISLAM, A.; KALARIA, R.; MANGAT, H.; WINBLAD, B.; ABDU, A. Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. **Brain Research**, v. 960, p. 259-262, 2003.

NAREOJA, K.; KUKKONEN, J. P.; RONDINELLI, S.; TOIVOLA, D. M.; MERILUOTTO, J.; NASMAN, J. Adrenoceptor activity of muscarinic toxins identified from mamba venoms. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 538-550, 2011.

NECO, P.; ROSSETTO, O.; GIL, A.; MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, L.M. Taipoxin induces F-actin fragmentation and enhances release of catecholamines in bovine chromaffin cells. **J. Neurochem.** v. 85, n. 2, p. 329-337, 2003.

OLIVEIRA, D. A.; HARASAWA, C. S.; SEIBERT, C. S.; CASAIS E SILVA, L. L.; PIMENTA, D. C.; SANDOVAL, M. R. L. Phospholipase A₂ isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: behavioral, electroencephalographic and neuropathological aspects. **Brain Research Bulletin**, v. 75, p. 629-639, 2008.

O’ KEEFE, J.; NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford: Oxford University Press, 1978.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in a elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neuro. Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S. E, FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 24, p. 525-529, 1986.

POHORECKI, R.; HEAD, R.; DOMINO, E. F. Effects of selected muscarinic cholinergic antagonists on (3H) acetylcholine release from rat hippocampal slices. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 244, p. 213-217, 1988.

PORTUGAL, T. O.; BATISTA, C. V. F.; CASSULINI, R. R.; PANDO, V.; HERNANDEZ, O. V.; VARGAS, A. Z. M.; ARRUZ, M. C. S.; VEJA, R. C. R.; BECERRIL, B.; POSSANI, L.D. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: Novel toxins, their function and phylogeny. **Proteomics**, v. 8, p. 1919-1932, 2008.

QUILDELDT, J. A.; CASSINI, L. F.; SIERRA, R. O.; HAUBRICH, J.; CRESTANI, A. P.; SANTANA, F.; OLIVEIRA-ALVARES, L. Memory reconsolidation allows the consolidation of a concomitant weak learning through a synaptic tagging and capture mechanism. **Hippocampus**, v. 3, 2013.

REHM, H.; BETZ, T. Binding of beta-bungarotoxin to synaptic membrane fractions of chick brain. **J. Biol. Chem.**, v. 17, p. 10015-10022, 1982.

RIBEIRO, R. L.; ANDREATINI, R.; WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; MEDINA, J. H.; DA CUNHA, C. The anxiety state and its relation with rat models of memory and habituation. **Neurobiology of learning and memory**, v. 30, p. 289-304, 1997.

RICHARD, J. W.; WILSON, A.; QUIRION, R. Muscarinic M2 negative autoreceptor regulate acetylcholine release in cortex and hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 1455-1462, 1995.

RIEKKINEN, M.; RIEKKINEN, Jr. P. Dorsal hippocampal muscarinic acetylcholine and NMDA receptors disrupt water maze navigation. **Neuroreport**, v. 8, p. 645-648, 1997.

RIGONI, M.; CACCIN, P.; GSCHMEISSNER, S.; KOSTER, G.; POSTLE, A.D.; ROSSETTO, O.; SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C. Equivalent effects of snake PLA2 neurotoxins and lysophospholipid-fatty acid mixtures. **Science**, v. 5754, p. 1678-80, 2005.

RODRIGUEZ-PUERTAS, R.; PASCUAL, J.; VILARO, T.; ANGEL, P. Autoradiographic distribution of M1, M2, M3 and M4 muscarinic receptor subtypes in Alzheimer's disease. **Synapse**, v. 26, p. 341-350, 1997.

ROSSETTO, O.; MORBIATO, L.; CACCIN, P.; RIGONI, M.; MONTECUCCO, C. Presynaptic enzymatic neurotoxins. **J. Neurochem.**, v. 97, p. 1534-1545, 2006.

ROUSE, S. T.; MARINO, M. J.; POTTER, L. T.; CONN, P. J.; LEVEY, A. I. Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. **Life Sciences**, v. 64, p. 501-509, 1999.

RUSSO, C.; MARCHI, M.; ANDRIOLI, G.C.; CAVAZZANI, P.; RAITERI, M. Enhancement of glycine release from human brains synaptosomes by acetylcholine action at M4 muscarinic receptors. **J. Exp. Ther.**, v. 266, p. 142-146, 1993.

SALEHI, B.; CORDERO, M.I.; SANDI, C. Learning under stress: the inverted U-shape revisited. **Learning and Memory**, v. 17, p. 522-530, 2012.

SANTOS, A. M. G. Aprendizagem e memória no labirinto aquático de Morris. In: XAVIER, G. F. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo, Plêiade, 1999. p. 131-134.

SEEGER, T.; GAUTAM, D.; DUTTARROY, A.; CUI, Y.; HAN, S.J.; DENG, C.; WESS, J. M1-M3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice: novel phenotypes. **J. Mol. Neurosci.**, v. 30, p. 157-60, 2004.

SERVENT, D.; BLANCHET, G.; MOURIER, G.; MARQUER, C.; MARCON, E.; FRUCHART-GAILLARD, C. Muscarinic toxins. **Toxicon**, v. 58, p. 455-463, 2011.

SHAKMAN, O.; HERKERT, M.; ROSE, C.; HUMENY, A.; BECKER, C. M. Induction by beta-bungarotoxin of apoptosis in cultured hippocampal neurons is mediated by Ca^{2+} dependent formation of reactive oxygen species. **J. Neurochem.**, v. 87, p. 598-608, 2003.

SILVA, D. C.; MEDEIROS, W. A. A.; BATISTA, I. F. C.; PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I.; ABDALLA, F. M. F.; SANDOVAL, M. R. L. Characterization of a new muscarinic toxin from the venom of the Brazilian coral snake *Micrurus lemniscatus* in rat hippocampus. **Life Sciences**, v. 89, p. 931-938, 2011.

SILVA, R. H.; FRUSSA-FILHO, R. The plus maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 102, p. 117-125, 2000.

SOARES, J. C. K.; OLIVEIRA, M. G. M.; FERREIRA, T. L. Inactivation of muscarinic receptors impairs place and response learning: Implications for multiple memory systems. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 320-326, 2013.

STILLMAN, M. J.; SHUKITT-HALE, B.; GALLI, R. L.; LEVY, A.; LIEBERMAN, H. R. Effects of M2 antagonists on in vivo hippocampal acetylcholine levels. **Brain Res. Bull.**, v. 41, p. 221-226, 1996.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. Acetylcholine. **Basic Neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects**. 6. ed. New York: Raven Press, 1999. p. 231-260.

TEIXEIRA, J. P. **Efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* sobre astrócitos em cultura**. 2012. Dissertação (Mestrado em Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

TSELIN, V. I.; HUCHO, F. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. **FEBS Letters**, v. 557, p. 9-13, 2004.

VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G. M. Muscarinic acetylcholine receptors in hippocampus, neocortex and amygdala: a review on immune-cytochemical localization in relation to learning and memory. **Prog. Neurobiol.**, v. 58, p. 409-471, 1999.

VANOVER, K. E.; VEINBERGS, I.; DAVIS, R. E. Antipsychotic-like behavioural effects and cognitive enhancement by a potent and selective muscarinic M-sub-1 receptor agonist, AC-260584. **Behav. Neurosci.**, v. 122, p. 570-575, 2008.

VITAL-BRAZIL, O. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 29, p. 119-126, 1987.

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

XAVIER, G. F. Effect of Circadian Phase on Performance of Rats in the Morris Water Maze Task. **Journal of Biological Rhythms**, v. 28, 1999.

WEIS, R. Y.; MCISAAC, R. J. Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. **Toxicon**, v. 9, p. 219-228, 1971.

WESS, J.; GAUTAM, D.; HEARD, T. S.; CUI, Y.; MILLER, G. Cholinergic stimulation of salivary secretion studied with M1 and M3 muscarinic receptor single-and-double knockout mice. **J. Mol. Pharmacol.**, v. 66, p. 260-267, 2004.

WICHLINSKI, L. J.; JENSEN, R. A. Effects of β -CCE on retention of aversively and appetitively motivated tasks in rats. **Physiology and Behaviour**, v. 60, p. 1121-1124, 1996.

YOUSEFI, B.; NASEHI, M.; KHAKPAI, F.; ZARRINDAST, M. Possible interaction of cholinergic and GABAergic systems between MS and CA1 upon memory acquisition in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 235, p. 231-243, 2012.