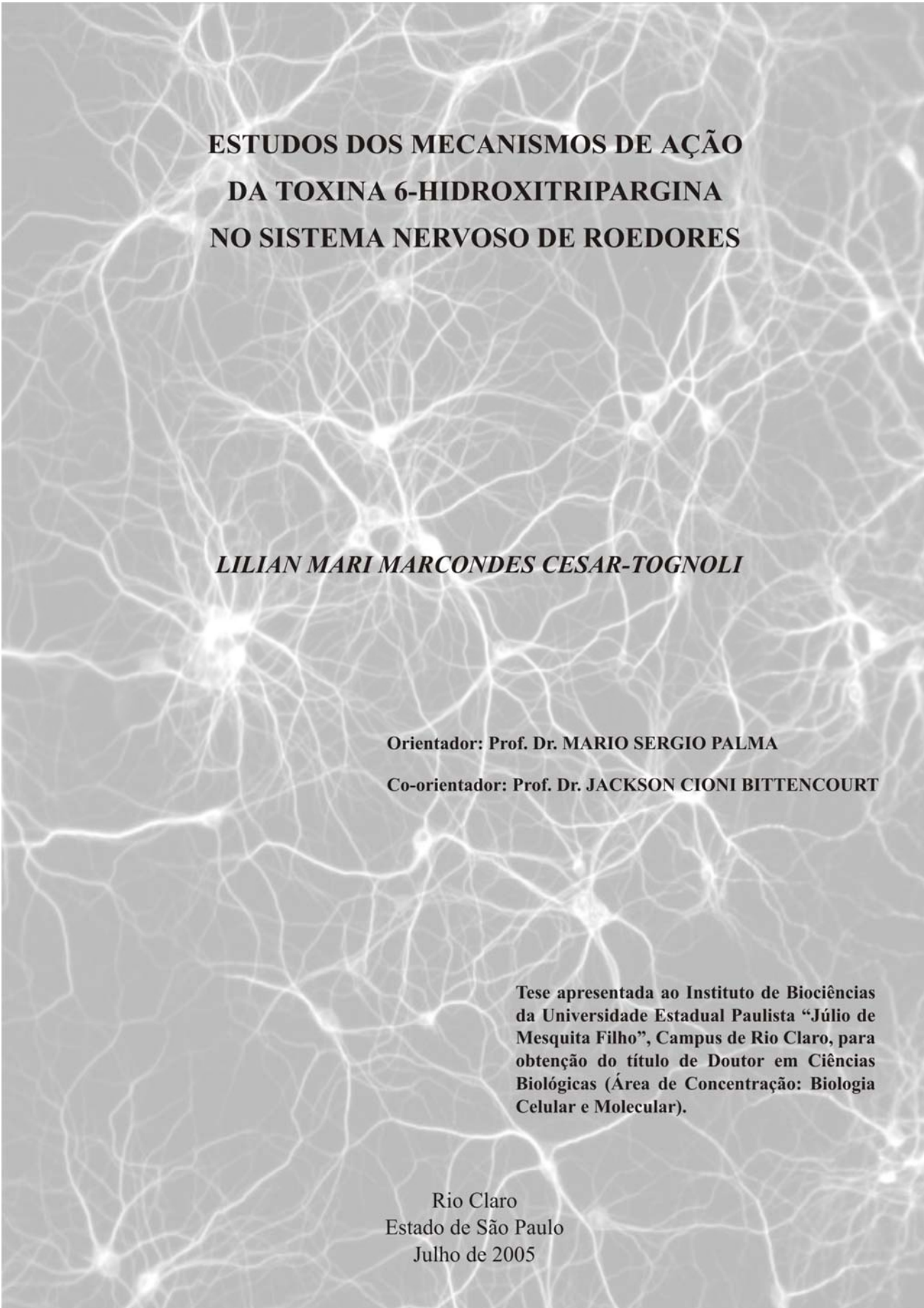


**ESTUDOS DOS MECANISMOS DE AÇÃO  
DA TOXINA 6-HIDROXITRIPARGINA  
NO SISTEMA NERVOSO DE ROEDORES**

***LILIAN MARI MARCONDES CESAR-TOGNOLI***

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas (Área de Concentração: Biologia  
Celular e Molecular).**

Rio Claro  
Estado de São Paulo  
Julho de 2005



**ESTUDOS DOS MECANISMOS DE AÇÃO  
DA TOXINA 6-HIDROXITRIPARGINA  
NO SISTEMA NERVOSO DE ROEDORES**

***LILIAN MARI MARCONDES CESAR-TOGNOLI***

**Orientador: Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA**

**Co-orientador: Prof. Dr. JACKSON CIONI BITTENCOURT**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular).**

Rio Claro  
Estado de São Paulo  
Julho de 2005

*Ao meu marido Francisco,  
Aos meus pais, Idione e José.*

**“Nele vivemos, nos movemos e somos”.**

**(At, 17, 28)**

---

*Ando devagar porque já tive pressa  
e levo esse sorriso, porque já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe  
eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei  
Conhecer as manhãs e as manhãs,  
o sabor das massas e das maçãs,  
é preciso amor pra poder pulsar,  
é preciso paz pra poder sorrir,  
é preciso a chuva para florir.  
Penso que cumprir a vida seja simplesmente  
compreender a marcha, e ir tocando em frente  
como um velho boiadeiro levando a boiada,  
eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou,  
de estrada eu sou.  
Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,  
Um dia a gente chega, no outro vai embora  
Cada um de nós compõe a sua história,  
e cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,  
e ser feliz.*

**(Almir Sater)**

---

*O que eu penso a respeito da vida,  
é que um dia ela vai perguntar:  
O que é que eu fiz com meus sonhos?  
E qual foi o meu jeito de amar?  
O que é que eu deixei pras pessoas  
que no mundo vão continuar?  
Pra que eu não tenha vivido à toa  
e que não seja tarde demais...*

**(Pe. Zezinho)**

---

## ***Agradecimentos***

*A Deus que me deu forças para a realização desse trabalho.*

*A todas as pessoas que fizeram com que esse trabalho se tornasse possível.*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Mario Sergio Palma, pela valiosa orientação, pelo apoio em todos os momentos e por todo o empenho e esforço para que esse trabalho pudesse ser concretizado.*

*Ao meu co-orientador Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt, por ter me acolhido em seu Laboratório de Neuroanatomia Química para a realização dos experimentos em encéfalo de rato com a peçonha da aranha em estudo, pelo apoio e amizade.*

*À Prof. Dra. Carol Fuzeti Elias, pela grande colaboração científica, pela amizade e por ser esse exemplo de pesquisadora que um dia gostaria de chegar a ser.*

*Ao Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa, pela acolhida em Porto Alegre para a realização dos experimentos de eletrofisiologia, pelo apoio e valioso contributo na realização desse trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto, pelos anticorpos cedidos para a realização dos experimentos de duplas-marcações, pela amizade e pela confiança. Nunca vou me esquecer da acolhida que recebi em seu laboratório. Mestres como você são raros, mas é tão bom quando encontramos um! Obrigado por tudo!*

*À amiga e Prof. Dra. Luciana Auxiliadora de Paula Vasconcelos, ah! Que dizer pra você?! Mil vezes obrigada, pelo carinho e paciência com que você me ensinou os procedimentos da cirurgia icv. Se hoje cheguei até aqui, devo isso também a você!*

*A todos os professores do Curso de Biologia Celular e Molecular da UNESP pelos ensinamentos recebidos.*

---

*A todos os professores do ICB da USP pelos ensinamentos recebidos e pela convivência.*

*Ao meu marido Francisco, pelo apoio em todos os momentos, pelo amor, carinho, compreensão, paciência e companheirismo.*

*Aos meus pais Idione e José por estimularem meu trabalho e entenderem minha ausência em muitos momentos. Se hoje eu cheguei até aqui, devo isso a vocês!*

*Aos meus irmãos José Hamilton e Hilton, às minhas cunhadas Siomara e Andréa, pelo apoio e incentivo nessa caminhada, pela ajuda incondicional, pela amizade e pelos momentos agradáveis em família.*

*A Ana Maria e a minha irmã Nathaly pela amizade e carinho.*

*Aos meus sobrinhos Guilherme, Vítor, Gustavo, Thiago, Kelvin e Jéssica, por serem a alegria da minha vida!*

*Aos meus sogros Luiz Antonio e Miltes e aos meus cunhadinhos Gabriel e Evelyn por todo carinho e amizade.*

*Aos técnicos do Biotério do ICB-III, Amaro, Rodrigo, Socorro e Rafael, pelo auxílio prestado.*

*Ao pessoal do LBEZ, ao Maurício e à Bibiana, pelo apoio e colaboração em todos os momentos. Agradeço em especial as amigas Lucilene, Keity e Anita por tudo que têm feito por mim nesses anos, pelo empréstimo do computador, pelas caronas, pelo incentivo, amizade e muito carinho! Aos novos, Nicole, Daniel, Fernanda, Antonio e Virgínia, agradeço o carinho com que me receberam.*

*Às amigas Susan e Evelyn que tive o prazer de conhecer e trabalhar brevemente em Rio Claro, por todo o carinho e pela grande amizade.*

*A todos os amigos do LNQ, toda a minha gratidão por me deixarem fazer parte dessa turma que eu admiro e gosto tanto.*

*Ao pessoal do Laboratório de Neurociências da PUCRS, pela acolhida, amizade e todo o carinho. Em especial à Simone que muito me ajudou nos experimentos de eletrofisiologia, por toda amizade e carinho. Aos*



---

*amigos, Michele, Andréa, Fernanda, Fernandinha, Cris e Ricardo por tudo que fizeram por mim, foi “tri” legal conhecer vocês!!!*

*Às amigas Elen, Eliandra, Heliana, Liliane, Loreta, Renata, Roberta, Rhowena, Silmara, Tatiana e Yuriko, pelos e-mails encorajadores, pelo incentivo, pela torcida e principalmente pela amizade que nos une e preenche nossas vidas!*

*A CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.*

---

## ABREVIACOES

	rea hipotalâmica anterior
aot:	tracto olfatório acessório
AP:	antero-posterior
$\alpha$ -LTX:	$\alpha$ -latrotoxina
AMPA:	cido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazoloproprinico
BLA:	núcleo amigdalóide basolateral anterior
BMA:	núcleo amigdalóide basomedial anterior
Ca <sup>+2</sup> :	cálcio
C:	graus Celcius
CA1:	região hipocampal CA1
CA2:	região hipocampal CA2
CA3:	região hipocampal CA3
cc:	corpo caloso
CeC:	núcleo central da amígdala, divisão capsular
CeL:	núcleo central da amígdala, divisão lateral
CeM:	núcleo central da amígdala, divisão medial
CH <sub>3</sub> :	radical metila
CL:	núcleo centro lateral
CM:	núcleo centro medial
Da:	dalton
DAB:	diaminobenzidina
DL <sub>50</sub> :	dose letal para 50% da populao
DMD:	núcleo dorsomedial do hipotálamo
DV:	dorso ventral
EC:	extra celular
ESI:	ionizao electrospray
MS/MS:	espectrometria de massa seqüencial
ev:	endovenosa

---

f:	fórnice
FITC:	isoticianato de fluoresceína
GABA:	Ácido $\gamma$ -amino-butírico
HPLC:	cromatografia líquida de alto desempenho
HR-MS:	espectrometria de massa de alta resolução
5-HT:	5-hidroxitriptamina
6-HT:	6-hidroxitripargina
IAM:	núcleo inter-ântero-medial do tálamo
I:	núcleo intercalado da amígdala
ic:	cápsula interna
IC:	intra celular
icv:	intracerebroventricular
IM:	núcleo intermédio do tálamo
IMD:	núcleo intermédio dorsal do tálamo
IPAC:	núcleo intresticial medial límbico posterior
K <sup>+</sup> :	potássio
KDa:	kilo Daltons
kV:	kilo volts
KPBS:	solução salina de tampão potássio/fosfato
LH:	área hipotalâmica lateral
LHb:	núcleo habenular lateral
LSD:	núcleo septal lateral dorsal
LSI:	núcleo septal lateral intermédio
LSV:	núcleo septal lateral ventral
LV:	ventrículo lateral
M:	molar
MAO:	monoamino oxidase
MAO-A:	monoamino oxidase tipo A
MCH:	hormônio concentrador de melanina
MeAD:	núcleo medial da amígdala, parte antero-dorsal.

---

MeAV:	núcleo medial da amígdala, parte antero-ventral
MePV:	núcleo medial da amígdala, parte postero-dorsal
MeCN:	acetonitrila grau HPLC
MeOH:	acetonitrila
Mg <sup>+2</sup> :	magnésio
MI:	córtex motor primário
ML:	médio lateral
MM:	Massa molar
MnPO:	núcleo pré-óptico mediano
MPA:	área pré-óptica medial
MS:	núcleo septal medial
mt:	tracto mamilotálâmico
mV:	mili Volts
m/V:	relação massa/volume
m/z:	relação massa/carga
Na <sup>+</sup> :	sódio
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NMR <sub>1</sub> :	receptor de NMDA tipo 1
OH <sup>-</sup> :	hidroxila
opt:	tracto óptico
ox:	quiasma óptico
PaMP:	núcleo paraventricular parte parvicelular medial
PaPo:	núcleo paraventricular parte anterodorsal
PC:	núcleo paracentral
Pe:	região periventricular
Pir:	córtex piriforme
PM:	pico molar
PoDG:	lâmina polimorfa do giro denteado
PS:	núcleo paraestrial
PVH:	núcleo paraventricular do hipotálamo

---

PVP:	núcleo paraventricular posterior do tálamo
rGlu <sub>2/3</sub> :	receptor de glutamato do tipo 2 e 3
Re:	núcleo reuniens
Rh:	núcleo rombóide
S1:	córtex sensorial
SFI:	núcleo septo fimbrial
sm:	estria medular talâmica
SNC:	sistema nervoso central
SOR:	núcleo supra-óptico retoquiasmático
sox:	decussação do supra-óptico
st:	estria terminal
SubI:	núcleo subincertal
TC:	área tuber cinereum
TFA:	ácido trifluoracético
TH:	tirosina hidroxilase
μM:	micro molar
3v:	terceiro ventrículo
VLPO:	área pré-óptica ventro lateral
VM:	núcleo ventro medial do tálamo
v/v:	volume/volume
U.V:	ultra-violeta
ZI:	zona incerta
ZID:	zona incerta dorsal
ZIV:	zona incerta ventral

## ÍNDICE

Pag	
	<b>1. INTRODUÇÃO ..... 21</b>
	<b>CAPÍTULO I..... 41</b>
	<i>Resumo..... 42</i>
	<i>Abstract..... 44</i>
	<i>Introdução..... 46</i>
	<i>Material e Métodos..... 49</i>
	<i>    Síntese da 6-hidroxitripargina..... 49</i>
	<i>    Animais..... 49</i>
	<i>    Cirurgia para colocação da cânula icv ..... 50</i>
	<i>    Administração da 6-hidroxitripargina e da tripargina icv..... 50</i>
	<i>    Cirurgia para colocação da cânula ev..... 51</i>
	<i>    Administração da 6-hidroxitripargina ev..... 51</i>
	<i>    Perfusão transcardíaca..... 51</i>
	<i>    Pós-fixação dos encéfalos e microtomia..... 51</i>
	<i>    Imunohistoquímica..... 52</i>
	<i>    Duplas-marcações..... 52</i>
	<i>    Aquisição das Imagens..... 53</i>
	<i>    Análise Estatística..... 54</i>
	<i>Resultados..... 55</i>
	<i>Discussão..... 75</i>
	<i>Conclusões..... 83</i>
	<i>Referências..... 84</i>
	<b>CAPÍTULO II..... 91</b>
	<i>Resumo..... 92</i>
	<i>Abstract..... 93</i>
	<i>Introdução..... 94</i>
	<i>Material e Métodos..... 97</i>
	<i>    Animais..... 97</i>
	<i>    Drogas..... 97</i>
	<i>    Medidas etrofisiológicas..... 97</i>
	<i>    Registro eletrofisiológico..... 98</i>
	<i>Resultados..... 100</i>
	<i>Discussão..... 106</i>
	<i>Conclusões..... 110</i>
	<i>Referências..... 111</i>
	<b>CONCLUSÕES FINAIS..... 115</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pag</b>
<p><b>Figura 1:</b> Espécies de plantas que apresentam em sua composição compostos <math>\beta</math>-carbolínicos. <b>A:</b> <i>Peganum harmala</i>, <b>B:</b> esquema anatômico da planta evidenciando folhas, flor e semente. Foto retirada do site: <a href="http://botit.botany.wisc.edu./Genera_P.html">botit.botany.wisc.edu./Genera_P.html</a>, esquema retirado do site: <a href="http://hyperreal.info/drugs/go.to/art/1800">hyperreal.info/drugs/go.to/art/1800</a> <b>C:</b> Liana <i>Banisteriopsis caapi</i>. <b>D:</b> esquema anatômico da planta evidenciando folhas, flor e semente. Foto de Kava Kawai, fonte: <a href="http://www.psiconautica.org/plantas_enteogenas.htm">www.psiconautica.org/plantas_enteogenas.htm</a>, esquema retirado do site: <a href="http://www.lyghtforce.com/text/muntz2.htm">www.lyghtforce.com/text/muntz2.htm</a>.</p>	<b>23</b>
<p><b>Figura 2:</b> Compostos <math>\beta</math>-carbolínicos isolados de plantas. A: harmina, B: harmalina, C: tetrahydroharmina.</p>	<b>24</b>
<p><b>Figura 3:</b> A: foto da rã <i>Kassina senegalensis</i>, retirada do site: <a href="http://www.calacademy.org/.../frogs/list13.html">www.calacademy.org/.../frogs/list13.html</a>. <b>B:</b> estrutura química da tripargina</p>	<b>26</b>
<p><b>Figura 4:</b> <i>Parawixia bistriata</i>. A: espécime fêmea. B) Fórmula química do composto <math>\beta</math>-carbolínico isolado da peçonha dessa aranha.</p>	<b>28</b>
<p><b>Figura 5:</b> Cirurgia <i>icv</i>. Observa-se o animal devidamente preso no estereotáxico para o início dos procedimentos de colocação da cânula</p>	<b>29</b>
<p><b>Figura 6:</b> Procedimentos realizados na cirurgia <i>icv</i>. A: Preparação do animal para a cirurgia, corte da pelagem, B: animal preso no estereotáxico, C: incisão da pele, D: abertura de orifício para colocação da cânula, E: Local da colocação da cânula e broca manual utilizada na abertura de orifícios para a colocação de parafusos que auxiliarão no suporte da cânula, F: cânula <i>icv</i>, G: fixação da cânula e dos parafusos com acrílico polimerizante, H: animal em pós-operatório.</p>	<b>30</b>
<p><b>Figura 7:</b> Experimento eletrofisiológico. A. Esquema ilustrando uma fatia de hipocampo. B: foto do hipocampo de rato (slice). C: cuba de perfusão utilizada nos ensaios eletrofisiológicos</p>	<b>33</b>
<p><b>Figura 8:</b> Esquema ilustrando os experimentos realizados no estudo da ação da 6-</p>	<b>34</b>

hidroxitripargina.

**Figura 9:** Distribuição da presença de Fos no SNC de rato. Fotomicrografias de campo claro evidenciando células imunorreativas à proteína Fos (setas) após administração intracerebroventricular da 6-hidroxitripargina (A-M) e em animais controle após administração de solução salina (B-N). A-B: córtex; C-D: área hipotalâmica; E-F: núcleo septal lateral; G-H: núcleo paraventricular do hipotálamo; I-J: núcleo dorsomedial do hipotálamo; K-L: núcleos talâmicos; M-N: hipocampo. Abreviações: 3v: terceiro ventrículo; CA1: região CA1 do hipocampo; CA2: região CA2 do hipocampo; CA3: região CA3 do hipocampo; cc: corpo caloso; CL: núcleo centro lateral; CM: núcleo centro medial; DMD: núcleo dorsomedial do hipotálamo; f: fórnice; LH: área hipotalâmica lateral; LS: núcleo septal lateral; LV: ventrículo lateral; MPA: área pré-óptica medial, mt: tracto mamilotálamico; ox: quiasma óptico; PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo; Pe: região periventricular; PC: núcleo paracentral; S1: córtex sensorial; Re: núcleo reuniens; Rh: núcleo rombóide; ZI: zona incerta. Barra de escala: 100µm em A-B/G-H/I-J/K-L/M-N, 150µm em C-D, 200µm em E-F.

**56-57**

**Figura 10:** Distribuição da presença de Fos no SNC de rato. Fotomicrografias de campo claro evidenciando células imunorreativas à proteína Fos (setas) após administração endovenosa da 6-hidroxitripargina (A-M) e em animais controle após administração de solução salina (B-N). A-B: córtex; C-D: área hipotalâmica; E-F: núcleo septal lateral; G-H: núcleo paraventricular do hipotálamo; I-J: núcleos talâmicos; K-L: região da amígdala; M-N: hipocampo. Abreviações: 3v: terceiro ventrículo; AHA: área hipotalâmica anterior; CA1: região CA1 do hipocampo; CA2: região CA2 do hipocampo; CA3: região CA3 do hipocampo; cc: corpo caloso; Ce: núcleo central da amígdala; CL: núcleo centro lateral; CM: núcleo centro medial; f: fórnice; LS: núcleo septal lateral; LV: ventrículo lateral; Me: núcleo medial da amígdala, opt: quiasma óptico; ox: quiasma óptico; PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo; PC: núcleo paracentral; Pir: córtex piriforme; Re: núcleo reuniens; Rh: núcleo rombóide; VM: núcleo ventromedial; ZI: zona incerta. Barra de escala: 50µm em A-B, 100µm em E-F/ G-H/I-J/K-L/M-N, 200µm em C-D.

**59-60**

**Figura 11:** Distribuição da presença de Fos no SNC de rato. Fotomicrografias de campo claro evidenciando células imunorreativas à proteína Fos (setas) após administração intracerebroventricular da tripargina (A-G) e em animais controle após administração de solução salina (B-H). A-B: área hipotalâmica anterior; C-D: núcleo septal lateral; E-F: núcleo paraventricular do hipotálamo; G-H: núcleos talâmicos; K-L: região da amígdala; M-N: hipocampo. Abreviações: 3v: terceiro

**63**



ventrículo; CL: núcleo centro lateral; CM: núcleo centro medial; f: fórnice; LH: área hipotalâmica lateral; LHb: núcleo habenular lateral; LS: núcleo septal lateral; LV: ventrículo lateral; PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo; PC: núcleo paracentral; PVA: núcleo paraventricular anterior do tálamo. Barra de escala: 100 $\mu$ m em A-B-F, 150 $\mu$ m em E, 200 $\mu$ m em C-D/ G-H.

**Figura 12:** Esquema comparativo ilustrando áreas que expressaram Fos após administração da 6-hidroxitripargina e da tripargina. A-C: expressão de Fos após administração intracerebroventricular da 6-hidroxitripargina; D-F: expressão de Fos após administração endovenosa da 6-hidroxitripargina; G-I: expressão de Fos após administração intracerebroventricular da tripargina. Cada círculo representa a marcação de cinco células. As abreviações encontram-se citadas no início da tese.

64

**Figura 13:** A não co-localização da proteína Fos e tirosina hidroxilase. Fotomicrografias de campo claro (A e B) e de imunofluorescência (C-H) evidenciando a ausência de duplas-marcações Fos/tirosina hidroxilase. A expressão de Fos (setas preenchidas) é evidenciada nos núcleos dos neurônios e a de tirosina hidroxilase no soma dessas células (setas sem preenchimento). A-H: núcleo paraventricular do hipotálamo. Abreviações: 3V: terceiro ventrículo; PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo. Barra de escala: 50 $\mu$ m em B/ D/ F/ H, 100 $\mu$ m A/ C/ E/ G.

67

**Figura 14:** Co-localização da proteína Fos e orexina. Fotomicrografias de campo claro evidenciando a presença de duplas-marcações Fos/orexina (setas). A expressão de Fos (pontos escuros) é evidenciada nos núcleos dos neurônios e a de orexina no soma dessas células. A, B e C: área hipotalâmica lateral. Abreviações: 3V: terceiro ventrículo; f: fórnice; LH: área hipotalâmica lateral. Barra de escala: 25 $\mu$ m em C, 100 $\mu$ m em B, 150 $\mu$ m em A. Retângulo indica área com maior aumento visualizada em C.

69

**Figura 15:** Co-localização da proteína Fos e NMR<sub>1</sub>. Fotomicrografias de campo claro evidenciando a presença de duplas-marcações Fos/ NMR<sub>1</sub> (setas). A expressão de Fos (pontos escuros) é evidenciada nos núcleos dos neurônios e a de NMR<sub>1</sub> no soma dessas células. A: área hipotalâmica; B: região perifornicial; C: núcleo septal lateral; D: núcleos talâmicos; E e F: hipocampo; G e H: córtex. Abreviações: 3v: terceiro ventrículo; CA1: região CA1 do hipocampo; CL: núcleo centro lateral; CM: núcleo centro medial; f: fórnice; LH: área hipotalâmica lateral; LS: núcleo septal lateral; LV: ventrículo lateral, opt:quiasma óptico; ox: quiasma óptico; PC: núcleo paracentral ;PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo; S1:

72

córtex sensorial; ZI: zona incerta. Barra de escala: 25 $\mu$ m F/ G/ H, 50 $\mu$ m em B, 100 $\mu$ m em A/ C/ E, 200 $\mu$ m em D.

**Figura 16:** Co-localização da proteína Fos e rGlu<sub>2/3</sub>. Fotomicrografias de campo claro evidenciando a presença de duplas-marcações Fos/ rGlu<sub>2/3</sub> (setas). A expressão de Fos (pontos escuros) é evidenciada nos núcleos dos neurônios e a de rGlu<sub>2/3</sub> no soma dessas células. A e B: núcleo septal lateral; C e D: núcleo paraventricular do hipotálamo; núcleos talâmicos; E e F: córtex. Abreviações: 3v: terceiro ventrículo; LS: núcleo septal lateral; LV: ventrículo lateral, PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo; S1: córtex sensorial. Barra de escala: 25 $\mu$ m B/ D/ F, 50 $\mu$ m em E, 100 $\mu$ m em A/ C. **74**

**Figura 17:** Registro intracelular de neurônio hipocampal de CA<sub>1</sub>. Em A: perfusão de neurônios com Ringer normal, Pm -79,5mV. B: Crise eletrográfica com a aplicação da toxina 6-hidroxitripargina (6-HT). C: “washout” com Ringer normal, Pm -77mV. D: Nova crise eletrográfica causada pela aplicação da 6-hidroxitripargina. E: “washout” com Ringer normal, Pm -87mV. **101**

**Figura 18:** Registro intracelular de neurônio hipocampal de CA<sub>1</sub>. Em A: perfusão de neurônios com Ringer normal, Pm -82mV. B: Crise eletrográfica com a perfusão da toxina 6-hidroxitripargina (6-HT), Pm -79mV. **102**

**Figura 19:** Curva de voltagem (mV) x corrente (nA), antes e depois da aplicação da 6-hidroxitripargina em tecido hipocampal de ratos. **103**

**Figura 20:** Curva de voltagem (mV) x corrente (nA), antes e depois da perfusão com 6-hidroxitripargina em tecido hipocampal de ratos. **104**

**Figura 21:** Registro intracelular de neurônio hipocampal de CA<sub>1</sub>. Em A: perfusão de neurônios com Ringer normal, Pm -80,0mV. B: Crise eletrográfica com a aplicação de )-Mg<sub>+2</sub>. C: aplicação da toxina 6-hidroxitripargina (6-HT). D: “washout” com Ringer )-Mg<sub>+2</sub>, Pm -79,5mV. da toxina 6-hidroxitripargina (6-HT), Pm -79mV. **105**

**Figura 22:** Curva de voltagem (mV) x corrente (nA), antes e depois da perfusão com Ringer 0-Mg<sub>+2</sub> e aplicação da 6-hidroxitripargina em tecido hipocampal de ratos. **106**

---

## ÍNDICE DE TABELAS

	<b>Pag</b>
<b>Tabela 1:</b> Número de células (média $\pm$ SEM) mostrando a imunorreatividade das células Fos em ratos submetidos ao tratamento com salina [0,9% (m/V)] e com a 6-hidroxitripargina (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).	<b>58</b>
<b>Tabela 2:</b> Número de neurônios duplamente marcados Fos/NMR <sub>1</sub> , Fos/orexina e Fos/rGlu <sub>2/3</sub> .	<b>68</b>

---

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

As aranhas são invertebrados predadores de hábitos polívoros, cuja dieta consiste preferencialmente de insetos dos mais variados gêneros. O grande sucesso alcançado por esse grupo está relacionado a uma possível co-evolução de hábitos comportamentais, tais como a captura de presas, a defesa da teia e a reprodução, que associados contribuíram para uma especialização cada vez maior de suas respectivas peçonhas. As peçonhas de aranhas são compostas por um conjunto de substâncias capazes de paralisar ou até mesmo matar suas vítimas, sendo utilizadas tanto para a captura de presas como para a defesa contra predadores (McCormick & Meinwald, 1993).

As peçonhas de aranhas são caracterizadas, de uma maneira geral, por sua ação neurológica rápida, capaz de imobilizar as presas. Isso ocorre porque existem substâncias neuroativas (Hagiwara *et al.*, 1991), que agem principalmente afetando as transmissões sinápticas e o funcionamento de canais iônicos e induzindo a despolarização de fibras musculares e/ou de terminações nervosas sensitivas, motoras e do sistema nervoso autônomo (Grishin, 1994).

Quase todas as aranhas possuem substâncias neuroativas e neurotoxinas, em suas peçonhas (Hagiwara *et al.*, 1991). Elas podem ser divididas em três grandes grupos, de acordo com sua ação nos organismos e sua natureza molecular (Kawai & Nakajima, 1993):

i) toxinas de elevada massa molecular ( $MM > 10$  KDa), que são caracterizadas por atuarem em terminações nervosas pré-sinápticas, agindo preferencialmente em canais catiônicos de  $Na^+$  e  $Ca^{+2}$ .

ii) toxinas peptídicas ( $MM$  entre 3 e 10 KDa), que bloqueiam os canais de  $Ca^{+2}$  em axônios pré-sinápticos, como por exemplo as agatoxinas e curtatoxinas.

iii) toxinas de baixas massas moleculares e de natureza não peptídica (MM<1KDa). Essa última classe pode ser subdividida em outras quatro subclasses, de acordo com a natureza química das toxinas desse grupo:

a) acilpoliaminas, que caracterizam a família Araneidae, agem sobre os receptores de glutamato na transmissão de estímulos pós-sinápticos (Palma *et al.*, 1997).

b) nucleosídeo-toxinas, que são compostos constituídos de mono ou dissulfatos derivados de guanosina ou xantosina, capazes de bloquear a ação de receptores de cainato, agindo em canais de cálcio do tipo-L (McCormick *et al.*, 1999; Taggi *et al.*, 2004).

c) compostos diazenaril organometálicos que apresentam uma ação potente como inseticida (Marques *et al.*, 2005).

d)  $\beta$ -carbolinas, compostos alcalóides que agem preferencialmente como inibidores reversíveis da enzima monoamino oxidase (MAO), com atividade neurotóxica descrita para insetos (Cesar, 2000) e que serão abordadas a seguir.

As  $\beta$ -carbolinas são compostos alcalóides ativos originalmente isolados de plantas pertencentes a diferentes gêneros, incluindo espécies asiáticas, como a *Peganum harmala* (fig. 1A e 1B) (Zygophillaceae) e várias espécies sul-americanas como *Banisteriopsis caapi* (fig.1C e 1D), *Banisteriopsis inebrians*, *Banisteriopsis rusbyana*, *Tetrapteris methystica* (Malpighiaceae), *Virola* sp. (Myristicaceae) e *Anadenanthera* sp. (Leguminosae) (Naranjo, 1969; Hostettmann *et al.*, 1999; Pfau & Skog, 2004). Os principais compostos  $\beta$ -carbolínicos extraídos dessas plantas são a harmina, a harmalina e a tetrahydroharmina (fig. 2), sendo descritos na literatura como alcalóides com efeitos alucinógenos (Pfau & Skog, 2004). A existência de compostos  $\beta$ -carbolínicos nas plantas está relacionada ao mecanismo de defesa dessas contra a predação de insetos, devido à toxicidade apresentada por esses alcalóides.



Figura.1: Espécies de plantas que apresentam em sua composição compostos  $\beta$ -carbolínicos. **A:** *Peganum harmala*, **B:** esquema anatômico da planta evidenciando folhas, flor e semente. Foto retirada do site: [botit.botany.wisc.edu./Genera P.html](http://botit.botany.wisc.edu./Genera_P.html), esquema retirado do site: [hyperreal.info/ drugs/go.to/art/1800](http://hyperreal.info/drugs/go.to/art/1800) **C:** Liana *Banisteriopsis caapi*. **D:** esquema anatômico da planta evidenciando folhas, flor e semente. Foto de Kava Kawai, fonte: [www.psiconautica.org/ plantas\\_enteogenas.htm](http://www.psiconautica.org/plantas_enteogenas.htm), esquema retirado do site: [www.lyghtforce.com/ text/muntz2.htm](http://www.lyghtforce.com/text/muntz2.htm).

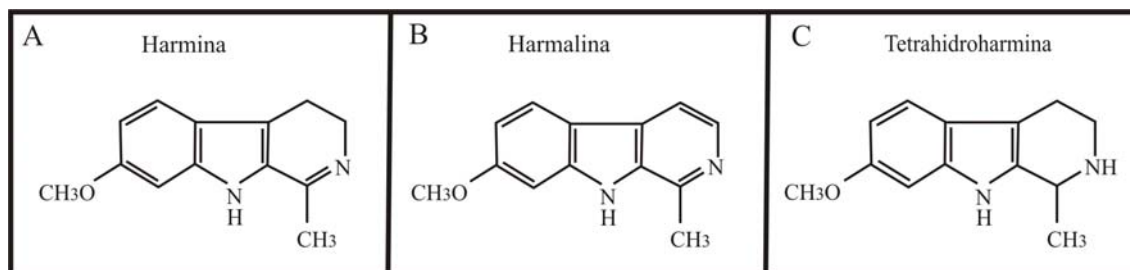


Figura 2: Compostos  $\beta$ -carbolínicos isolados de plantas. A: harmina, B: harmalina, C: tetrahydroharmina.

Compostos  $\beta$ -carbolínicos como o harman e o norharman, com ações psicoativas foram encontrados também na forma endógena, em órgãos, tecidos e fluídos corpóreos de mamíferos, incluindo humanos (Shimizu *et al.*, 1982; Rommelspacher *et al.*, 1994). As  $\beta$ -carbólinas endógenas têm sido associadas a processos neurológicos normais, como a produção de imagens visuais e emoções imaginárias durante o sono (Solis-Maldonado *et al.*, 2003). Essas alucinações ocorrem, provavelmente, pela ligação desses compostos  $\beta$ -carbolínicos a receptores do tipo 5-hidroxitriptamina (5-HT), principal alvo de drogas com características alucinógenas, como as do grupo indol (Pfau & Skog, 2004).

Muitas  $\beta$ -carbólinas possuem similaridade estrutural com a molécula de serotonina, o que está diretamente relacionado ao processo de síntese desses alcalóides no interior das células (Solis-Maldonado *et al.*, 2003). Os compostos  $\beta$ -carbolínicos endógenos são formados pela condensação de indolaminas ou triptaminas (como a serotonina) com aldeídos, gerados durante o processo de peroxidação de membranas lipídicas (Callaway *et al.*, 1994). Estudos evidenciam que as  $\beta$ -carbólinas são substâncias capazes de se ligarem a diferentes tipos de receptores existentes no sistema nervoso central (SNC), tais como: 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Glennon *et al.*, 2000), imidazólicos (Husbands *et al.*, 2001) e benzodiazepínicos (Airaksinen *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1981). A grande semelhança do grupo indol dessas  $\beta$ -carbólinas com a molécula neurotransmissora de serotonina pode ser a responsável pela afinidade de ligação a diferentes tipos de receptores (Solis-Maldonado *et al.*, 2003).



Estudos farmacológicos realizados com as  $\beta$ -carbolinas denominadas harmina, harmalina e tetrahydroharmina têm demonstrado efeitos psicotrópicos que incluem estados de inspiração e de introspecção, alucinações visuais, náuseas e tontura (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1997). Por essas propriedades, esses alcalóides são utilizados por tribos indígenas da América do Sul, como componentes ativos de uma bebida denominada "yagé", capaz de causar alucinações e tremores após alguns minutos de sua ingestão (Naranjo, 1969).

A ação inibitória das  $\beta$ -carbolinas sobre diferentes neurotransmissores ocorre através de suas ligações sítio-específicas a receptores de acetilcolina, serotonina e benzodiazepina (Nielsen *et al.*, 1982; Shimizu *et al.*, 1982; Melchior & Collins, 1982; Hostettmann *et al.*, 1999). Os derivados  $\beta$ -carbólicos existentes nas plantas e também aqueles formados endogenamente em mamíferos são considerados inibidores reversíveis potentes da enzima MAO, enzima essa que possui papel importante na regulação dos níveis de aminas endógenas como serotonina, noradrenalina, catecolaminas e tiramina (Shimizu *et al.*, 1982a; Melchior & Collins, 1982). Os níveis de atividade dessa enzima parecem estar relacionados a uma série de distúrbios neurológicos como depressão, ansiedade e doenças da degeneração senil (Stroelin-Benedetti & Dostert, 1992).

As  $\beta$ -carbolinas têm sido consideradas como indutoras naturais de processos neurodegenerativos observados na doença de Parkinson (Bringmann *et al.*, 1996). A exposição a fatores exógenos como álcool, heroína, hidrato de cloral, xenobióticos, tabaco, alterações metabólicas ocasionadas por infecções e mesmo fatores endógenos, como defeitos genéticos, poderiam levar à formação de  $\beta$ -carbolinas modificadas, capazes de induzir uma neurotoxicidade progressiva e causar a degeneração de neurônios dopaminérgicos que poderiam evoluir para a doença de Parkinson (Gerlach *et al.*, 1998; Solis-Maldonado *et al.*, 2003).

Estudos recentes evidenciam a existência de  $\beta$ -carbolinas em diferentes tipos de alimentos, tais como carnes (bovina, suína, de aves e peixes) bem como em produtos industrializados extraídos de plantas, tais como o *ketchup*, o vinagre e o *shoyu* (Pfau & Skog, 2004). O problema

estaria no aquecimento desses produtos, que dependendo da temperatura (superior a 100 °C) e do tempo de preparo poderiam contribuir para a formação de  $\beta$ -carbolinas modificadas. Essa prática poderia estar relacionada ao aumento do número de casos de pacientes com a doença de Parkinson (Pfau & Skog, 2004).

Compostos  $\beta$ -carbolínicos com ações inseticida, antimicrobiana, anti-tumoral e anti-malarial foram encontrados em esponjas marinhas de gêneros diversos (Kobayashi *et al.*, 1995; Wagoner *et al.*, 1999; Salmoun, *et al.*, 2000; Tu *et al.*, 2004). Também foi isolada uma  $\beta$ -carbolina da pele da rã *Kassina senegalensis* (fig.3) (Akizawa *et al.*, 1982). Esse composto isolado dessa rã foi denominado de tripargina, que é uma 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolina condensada a um grupo guanidino (Shimizu *et al.*, 1982; Shimizu *et al.*, 1984).

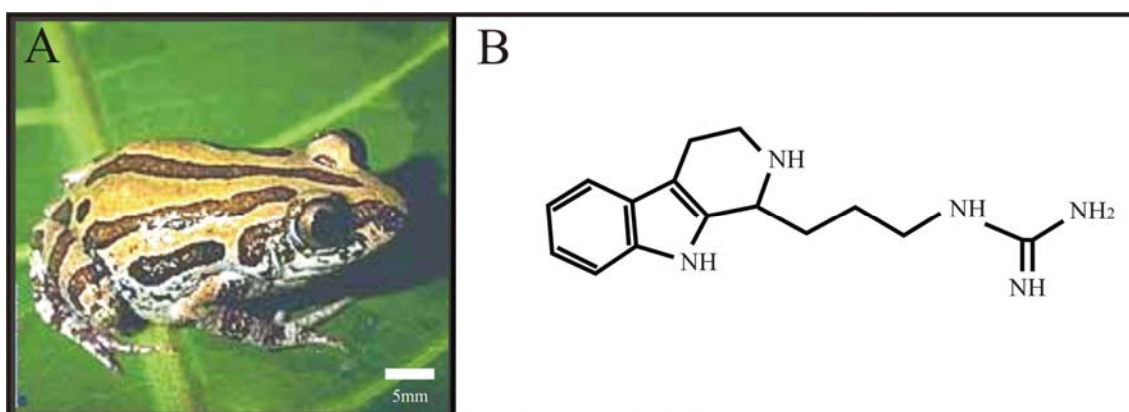


Figura 3: A: foto da rã *Kassina senegalensis*, retirada do site: [www.calacademy.org/.../frogs/list13.html](http://www.calacademy.org/.../frogs/list13.html). B: estrutura química da tripargina.

A tripargina exerce ação inibitória sobre os canais de  $\text{Na}^+$ , os quais reduzem o grau de abertura dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  e modulam a liberação de transmissores em células contendo serotonina (Akizawa *et al.*, 1982). A ação bloqueadora sobre os canais de  $\text{Na}^+$ , em membranas axonais de lula, ocorre de modo potencial-dependente, sem, no entanto, afetar o fluxo de  $\text{K}^+$  (Seyama *et al.*, 1985).

A metoxitripargina e a tripargina foram identificadas no tecido nervoso de ratos, sem formação de artefatos, em níveis da ordem de 0,2 a 0,3 ng/g

de tecido. A distribuição neuroanatômica desses compostos é bastante homogênea, com uma maior concentração no cerebelo e no córtex cerebral (Peura *et al.*, 1989). Kari *et al.* (1979) realizaram a dosagem de tripargina em plaquetas humanas, sendo de cerca de 9,4 ng/ml para um adulto jovem normal.

De acordo com Shimizu *et al.* (1982), estudos preliminares da atividade biológica da tripargina têm evidenciado que a administração dessa toxina na dose de 10mg/Kg em ratos leva à morte em 2 minutos, como resultado de falência respiratória e paralisia. A DL<sub>50</sub> da tripargina em ratos é de 16,9 mg/Kg em administração intravenosa (Shimizu *et al.*, 1984).

Os efeitos comportamentais e eletrocorticais da tripargina e de dois de seus derivados (5-hidroxitripargina e 5 metoxitripargina) foram estudados por meio de microinjeções dessas substâncias no terceiro ventrículo de ratos normais. Observou-se que esses componentes produziram uma dessincronização da atividade eletrocortical, de maneira dose-dependente, juntamente com uma síndrome de estimulação comportamental (Nistico *et al.*, 1987). O componente mais ativo é o 5-metoxitripargina, seguido da 5-hidroxitripargina e da tripargina. (Nistico *et al.*, 1987).

A peçonha da aranha *Parawixia bistriata* possui em sua composição, além de acilpoliaminas e nucleosídeo-toxinas, três  $\beta$ -carbolinas, entre as quais a 6-hidroxitripargina é a mais abundante (Cesar, 2000; Cesar *et al.*, 2005). Essa  $\beta$ -carbolina foi isolada por meio de fracionamento de extratos da peçonha bruta em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e sua estrutura foi elucidada por uma combinação de técnicas espectroscópicas que envolveram espectrofotometria-UV, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas do tipo ESI-MS/MS e HR-MS. (Cesar, 2000; Cesar *et al.*, 2005).

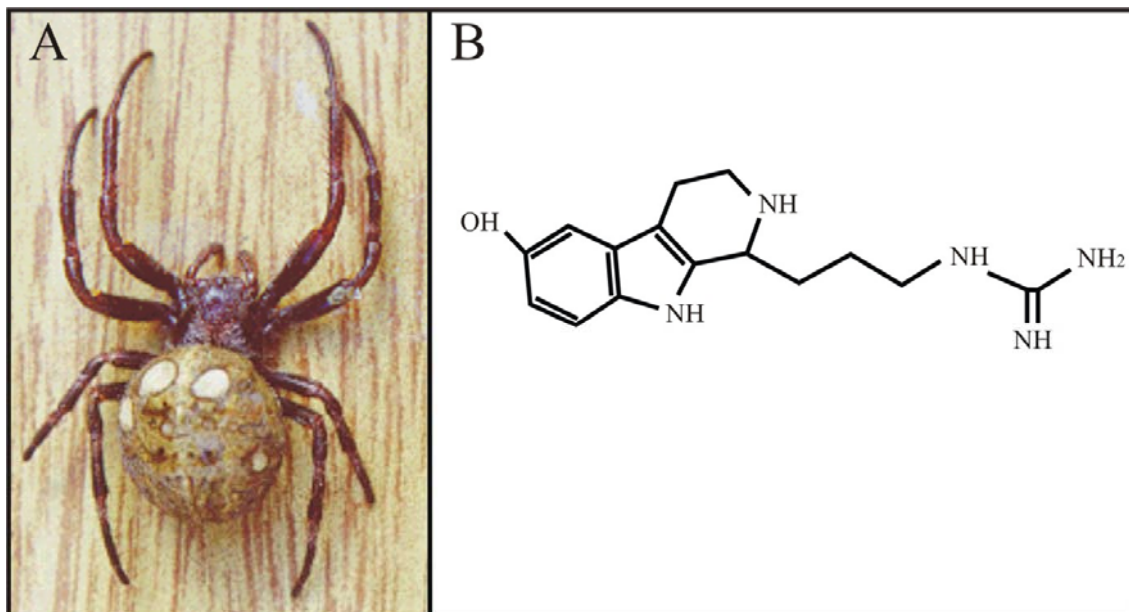


Figura 4: *Parawixia bistriata*. A: espécime fêmea. B) Fórmula química do composto  $\beta$ -carbólico isolado da peçonha dessa aranha.

Bioensaios realizados com a peçonha bruta de *P. bistriata* em abelhas e termitas causaram ações tremorigênicas, paralisia e até mesmo a morte de parte dos indivíduos (Cesar, 2000; Fontana 2000). Esses dados sugerem que a peçonha atue como um antagonista glutamatérgico no sistema nervoso de insetos provocando uma paralisia bastante rápida (Fontana, 2000). A peçonha bruta também apresentou atividade em mamíferos, sendo capaz de inibir cerca de 60% da captação de GABA e promover a captação de L-glutamato em preparações de sinaptossomos do córtex cerebral de ratos (Fontana *et al.*, 2000). Aumentar a disponibilidade de GABA, que é um neurotransmissor inibitório, e diminuir a disponibilidade de glutamato, um neurotransmissor excitatório, poderia significar uma ação potencialmente anticonvulsivante dessa peçonha *in vitro*. A peçonha bruta, administrada de maneira intracerebroventricularmente (*icv*), apresentou um efeito anticonvulsivante para as crises induzidas por pentilenotetrazol (Rodrigues *et al.*, 2002).

A peçonha bruta de *P. bistriata* foi injetada de modo *icv* em ratos Wistars (fig. 5 e 6) e sua ação foi observada por meio da expressão da proteína Fos. A proteína Fos é um fator de transcrição induzível, cuja

ativação é uma ferramenta sensível para mapear diferentes estímulos farmacológicos, elétricos e fisiológicos (Morgan & Curran, 1991; Lino-de-Oliveira *et al.*, 2001) em neurônios ativados nos sistemas nervoso central (Kobelt *et al.*, 2004). Entre as áreas Fos-imunorreativas à peçonha bruta estão o córtex cerebral, a área hipotalâmica lateral, a região perifornical, a área pré-óptica, o núcleo septal lateral e os núcleos paraventricular e dorsomedial do hipotálamo (Cesar, 2000). Esse padrão de marcação é muito semelhante ao encontrado em animais submetidos ao estresse por altas temperaturas (Harikai *et al.*, 2003), o que sugere que a peçonha cause desconforto ao animal, criando uma situação estressante. Essa ação causada pela peçonha parece agir em locais específicos do SNC, principalmente em regiões hipotalâmicas, que se encarregam de iniciar uma resposta específica ao estresse sofrido.



Figura 5: Cirurgia *icv*. Observa-se o animal devidamente preso no estereotáxico para o início dos procedimentos de colocação da cânula.

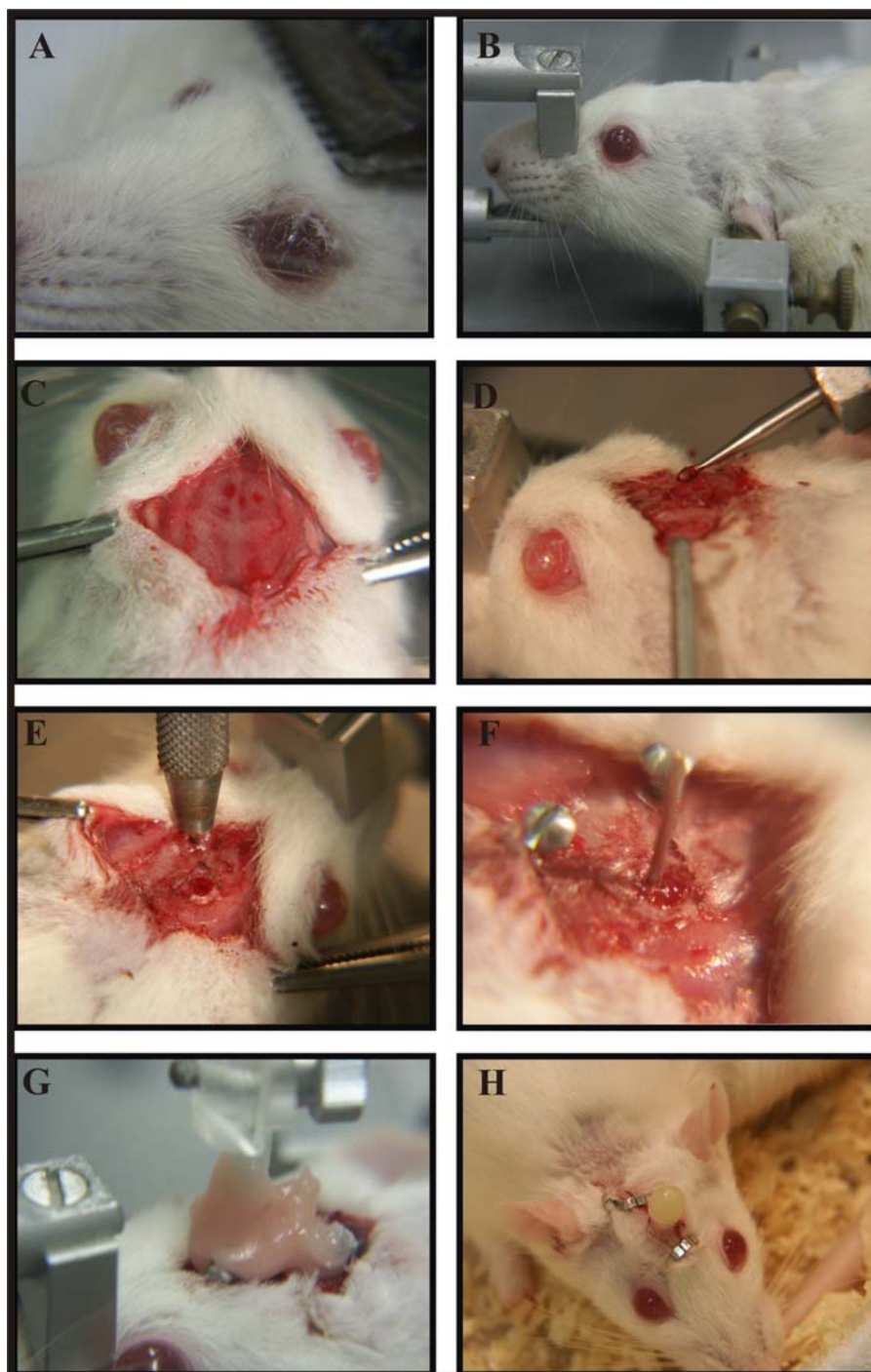


Figura 6: Procedimentos realizados na cirurgia *icv*. A: Preparação do animal para a cirurgia, corte da pelagem, B: animal preso no estereotáxico, C: incisão da pele, D: abertura de orifício para colocação da cânula, E: Local de introdução da cânula e broca manual utilizada na abertura de orifícios para a colocação de parafusos que auxiliarão no suporte da cânula, F: cânula *icv*, G: fixação da cânula e dos parafusos com acrílico polimerizante, H: animal em pós-operatório.



---

Duas frações isoladas da peçonha de *P. bistriata*, a PbTx 1.2.3 e a PbTx 2.2.1 tiveram suas ações estudadas e apresentaram um padrão de ação semelhante à da peçonha bruta. A PbTx 1.2.3 estimulou a recaptação de glutamato em sinaptossomos do córtex cerebral de ratos e em culturas de células (COS-7) (Fontana, 2003), enquanto a PbTx 2.2.1 inibiu a captação de GABA no modelo de sinaptossomos corticais de ratos (Fontana, 1997; Belebony, 2004).

Um nucleosídeo de inosina isolado da peçonha de *P. bistriata* apresentou ação convulsivante quando administrado, em alta concentração, de maneira *icv*, em ratos (Rodrigues *et al.*, 2004). A peçonha de *P. bistriata* apresenta componentes de baixas massas moleculares com propriedades pró-convulsivantes.

As  $\beta$ -carbolinas encontradas na peçonha da aranha *P. bistriata* são as primeiras a serem descritas nesse grupo. O composto 6-hidroxitripargina foi escolhido, como objeto de estudo do presente trabalho, por ser o mais abundante dos três compostos  $\beta$ -carbolínicos encontrados na peçonha e pelo fato de ter sido isolado da fração com maior ação inseto-específica. O estudo do mecanismo de ação desse composto foi abordado primeiramente por meio de injeção *icv* em ratos, observando-se um padrão de marcação com a proteína Fos que se assemelhou ao padrão obtido com a injeção *icv* da peçonha bruta, porém ainda mais significativo. Ensaio utilizando a administração da 6-hidroxitripargina por meio de injeções endovenosas (*ev*) também foram realizados, porém em menor número e evidenciaram uma indução da expressão de Fos similar à encontrada nos experimentos de *icv*, porém com marcações no núcleo central da amígdala, que não aparecem nos experimentos de *icv* e que devem ser melhor estudadas no futuro.

Partindo do princípio que a 6-hidroxitripargina é um composto derivado da tripargina, cujos estudos de mecanismos de ação encontram-se mais avançados que do análogo em questão, procurou-se traçar um paralelo comparativo entre os ensaios de injeções *icv* dos dois compostos: tripargina e 6-hidroxitripargina. Os resultados evidenciaram que as marcações observadas para os dois compostos apresentam um padrão bastante

semelhante, sendo a marcação de Fos nos ensaios observada principalmente em regiões hipotalâmicas e alguns núcleos talâmicos.

A partir da análise da marcação das áreas Fos-imunorreativas, iniciaram-se tentativas de se estabelecer à natureza desses neurônios que expressaram Fos. Para isso, foram realizadas duplas-marcações, utilizando anticorpos anti-Fos associados a outros anticorpos para os receptores AMPA (rGlu<sub>2/3</sub>) e NMDA (NMR<sub>1</sub>), para a enzima tirosina-hidroxilase e para o neurotransmissor orexina, abundantes nessas regiões marcadas. Observou-se a não existência de duplas marcações Fos/tirosina hidroxilase, o que permitiu concluir que neurônios pertencentes ao sistema catecolaminérgico não expressaram Fos durante a administração da 6-hidroxitripargina. Por outro lado, cerca de 53% de células corticais duplamente marcadas foram observadas nos experimentos de duplas-marcações com receptores NMDA do tipo NMR<sub>1</sub> e 10% nos experimentos com receptores AMPA do tipo rGlu<sub>2/3</sub>.

As duplas-marcações Fos/orexina também foram significativas com cerca de 30% das células duplamente marcadas. As orexinas (ou hipocretinas) são dois componentes de origem peptídica, que possivelmente tenham ação como reguladores homeostáticos dentro do SNC (Peyron *et al.*, 1998). Experimentos realizados com culturas de neurônios reforçam a hipótese de que as orexinas atuem como neurotransmissores excitatórios no SNC (Lecea *et al.*, 1998). As orexinas ligam-se a receptores pós-sinápticos aumentando a captação de íons Ca<sup>+2</sup> no citosol e também agem em receptores pré-sinápticos de axônios terminais, aumentando a liberação de glutamato e GABA. Esses peptídeos podem ser encontrados especificamente em neurônios das áreas hipotalâmica lateral e dorsal. Os neurônios orexinérgicos possuem axônios que se projetam para muitas outras regiões do sistema nervoso, incluindo ponte e tálamo (Lecea *et al.*, 1998).

Uma redução no número de neurônios orexinérgicos tem sido apontada como a causa de uma doença incurável denominada narcolepsia, cujos sintomas são ataques durante o sono, alucinações hipnagógicas, catalepsias e anormalidades do ciclo de sono do indivíduo (Thannickal *et al.*, 2000). As principais drogas utilizadas para o tratamento dessa doença são



anfetaminas ou compostos relacionados, porém os efeitos colaterais incluem a dependência e habituação do paciente à droga (van del Pol, 2000). Atualmente procura-se agonistas da orexina que possam substituir as anfetaminas. Talvez o entendimento do mecanismo de ação da 6-hidroxitripargina em neurônios orexinérgicos possa contribuir no estudo de drogas que auxiliem no tratamento da narcolepsia.

A 6-hidroxitripargina mostrou uma ação pró-convulsivante em experimentos eletrofisiológicos realizados em preparações hipocâmpais de ratos Wistar (fig. 7), utilizando-se como modelo de ensaio um sistema livre de íons  $Mg^{+2}$  e também ensaios de perfusão de Ringer normal com a administração da 6-hidroxitripargina. Esses resultados foram importantes pois justificaram a marcação de células Fos-imunorreativas em diversas áreas do SNC, incluindo regiões do córtex e hipocampo que são geralmente ativadas por drogas convulsivantes. As regiões hipotalâmicas marcadas por Fos, bem como os núcleos talâmicos e as regiões corticais são áreas relacionadas principalmente a respostas a situações de estresse e ansiedade sofridas pelo animal, que podem estar sendo direta ou indiretamente influenciadas pela ação pró-convulsivante da 6-hidroxitripargina.

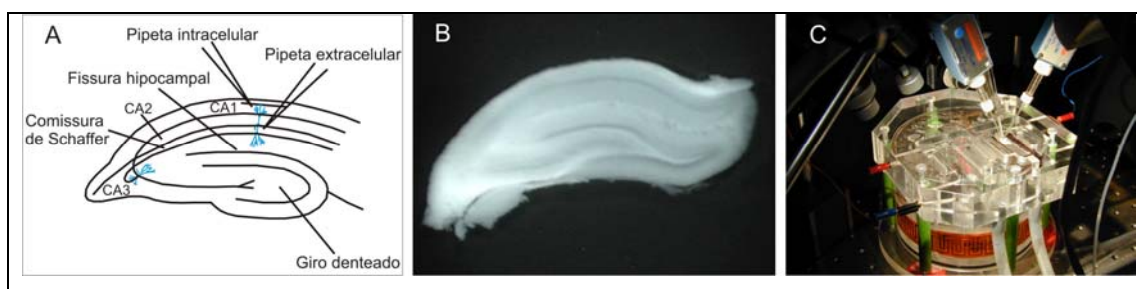


Figura 7: Experimento eletrofisiológico. A. Esquema ilustrando uma fatia de hipocampo. B: foto do hipocampo de rato (slice). C: cuba de perfusão utilizada nos ensaios eletrofisiológicos. (fonte: Salamoni, 2004).

Esse trabalho é composto por dois capítulos (I e II) feitos em forma de artigo para publicação, sendo o capítulo I referente aos experimentos de Fos e o capítulo II referente aos experimentos eletrofisiológicos. (Fig. 8).

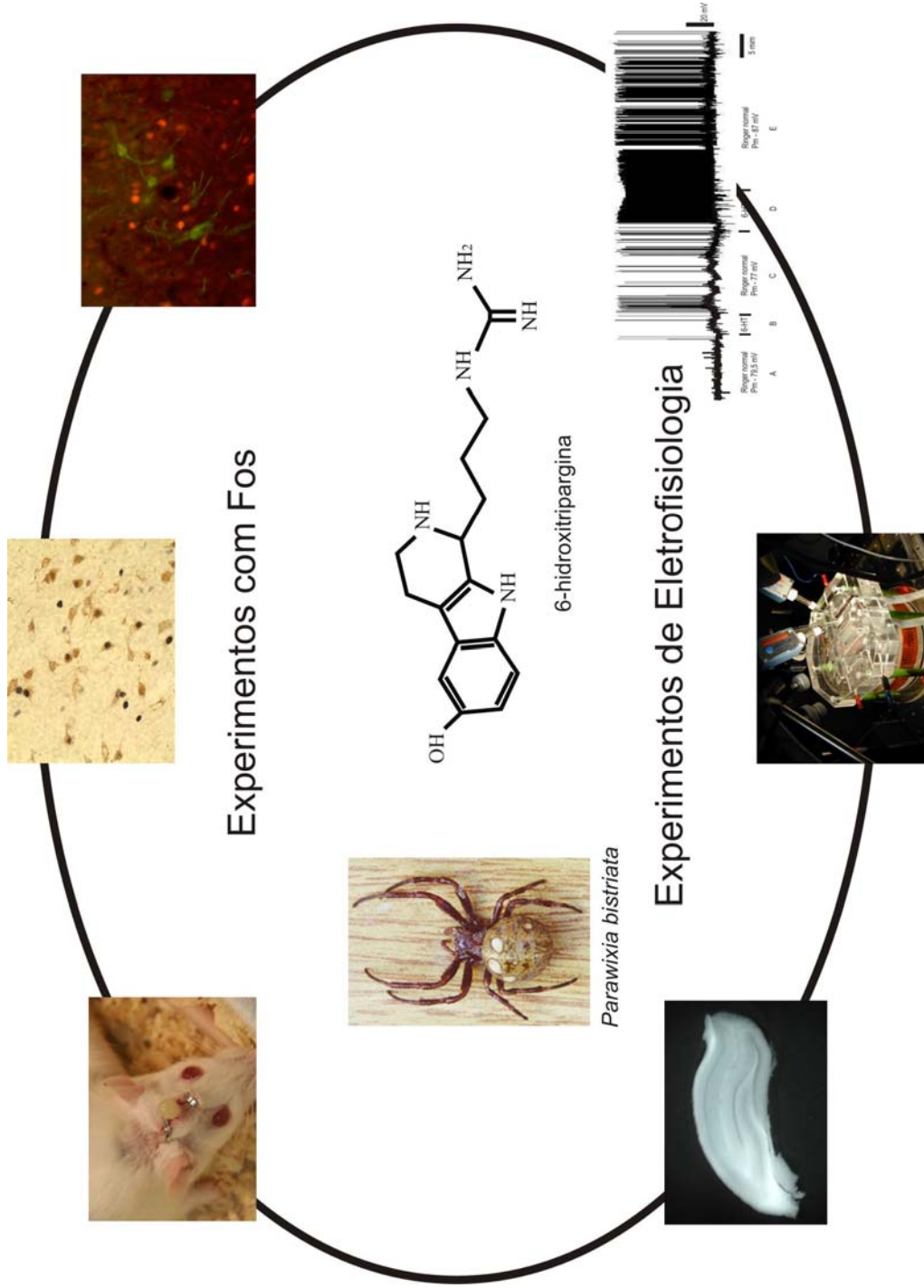


Figura 8: Esquema ilustrando os experimentos realizados no estudo da ação da 6-hidroxitriptargina.

## REFERÊNCIAS

- 1-Airaksinen, M.M.; Lecklin, A.; Saano, V.; Tuomisto, L.; Gynther, J. Tremorogenic effect and inhibition of tryptamine and serotonin receptor binding by  $\beta$ -carbolines. *Pharmacol. Toxicol.* 1987, 60, 5-8.
- 2- Akizawa, T.; Yamazaki, K.; Yasuhara, T.; Nakajima, T.; Roseghini, M.; Erspamer, G.F.; Espramer, Trypargine, a new tetrahydro- $\beta$ -carboline of animal origin: Isolation and chemical characterization from the skin of the African rhacophorid frog, *Kassina senegalensis*. *M. Biomedical Research.* 1982, 3, 232-234.
- 3-Beleboni, R.O.; Pizzo, A.B.; Fontana, A.C.K.; Carolino, R.O.G.; Coutinho-Netto, J.; dos Santos, W.F. Spider and wasps neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *Eur. J. Phamacology.* 2004, 493, 1-17.
- 3- Briingmann, G.; Friederich, H.; Birner, G.; Koob, M.; Sontag, K.H.; Hein, C.; Kolasiewicz, W.; Fahr, S.; Stablein, M.; God, R.; Feineis, D. Endogenous alkaloids in man XXVI. Determination of the dopaminergic neurotoxin 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline (TaClo) in biological samples using gas chromatography with selected ion monitoring. *J. Chromatography.* 1996, 687, 337 – 348.
- 4-Callaway, J. C.; Gynther, J.; Poso, A.; Vepsalainen, J.; Airaksinen, M. M. The Pictet-Spengler reaction and biogenic triptamines: formation of tetrahydro- $\beta$ -carbolines at physiological pH. *J. Heterocyclic Chem.* 1994, 31, 431-435.
- 5-Cesar, L.M.M. Molecular Structure Assigment and Investigation of Toxicity of the tetrahydro- $\beta$ -carbolines from the venom of the spider *Parawixia bistriata*; MSc. Monography, Rio Claro – SP. 2000, 67p.
- 6-Cesar, L.M.M.; Tormena, C.F.; Marques, M.R.; Silva, G.V.J.; Mendes, M.A.; Palma, M.S. Structure Determination of Hydroxytrypargine: A Tetrahydro- $\beta$ -carboline Toxin From the Venom of the Spider *Parawixia bistriata*. *Helvetica Acta Chemical.* 2005, 88, 00 (*in press*).

- 
- 7-Fontana, A.C.K. Caracterização química e biológica parcial da peçonha da aranha *Parawixia bistriata*. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto. 1997, 118p.
- 8-Fontana, A.C.K; Cairrão, M.A.; Colusso, A.J.; Santos, W.F.; Coutinho-Netto, J. Paralyzing activity of the *Parawixia bistriata* crude venom in térmites: a new bioassay. *Toxicon*. 2000, 38 (1), 133-138.
- 9-Fontana, A.C.; Guizzo, R.; de Oliveira beleboni, R.; MeirellesE Silva, A.R; Coimbra, N.C.; Amara, S.G.; dos Santos, W.F.; Coutinho-Netto, J. Purification of a neuroprotective component of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate uptake. *Br. J. Pharmacol*. 2003, 139 (7), 1297-1309.
- 10-Gerlach, M.; Xiao, A.Y.; Heim, C.; Lan, J.;God, R.; Feineis, D; Bringmann, G.; Riederer, P.; Sontag, K.H. 1-Trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline increases extracellular serotonin and stimulates hydroxyl radical production in rats. *Neurosci. Lett*. 1998, 257, 17-20.
- 11-Glennon, R.A.; Dukat; M.; Grella, B.; Hong, S.; Contantino, L.; Teitler, M.; Smith, C.; Ergan, C.; Davis, K.; Mattson, M.V. Binding of  $\beta$ -carbolines and related agents at serotonin (5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub>), dopamine (D<sub>2</sub>) and benzodiazepine receptors. *Drug Alcohol Depend*. 2000, 60, 121-132.
- 12-Grishin, E. V. Spider neurotoxins and their neuronal receptors. *Pure Appl. Chemical*. 1994, 66, 783-790.
- 13-Hagiwara, K.; Sakai, T.; Miwa, A.; Kawai, N.; Nakajima, T. Agelenin. A new neurotoxin from the venom of the spider, *Agelena opulenta*. *Peptide Chemistry*. 1991, 351-356.
- 14-Harikai, N.; Tomogane, K.; Sugawara, T.; Tashiro, S. Differences in hypothalamic Fos expression between two heat stress conditions in conscious mice. *Brain Res. Bull*. 2003, 61 (6,) 617-626.
- 15-Hostettmann, K.; Hostettmann, M.; Rodriguez, S.; Wolfender, J. L. LC-hyphenated techniques in the search for new bioactive plant constituents. In: "The biology-chemistry interface". Ed.: Nakanishi, K.; Cooper, R.; Snyder, J. K., USA, 1999, 120pp.

- 
- 16-Husbands, S.M.; Glennon, R.A.; Gorgerat, S.; Gough, R.; Tyacke, R.; Corsby, J.; Nutt, D.J.; Lewis, J.W.; Hudson, A.L.. Beta-carboline binding to imidazoline receptors. *Drug Alcohol Depend.* 2001, 64, 203.
- 17-Kawai N. & Nakajima, T. Neurotoxins from spider venoms. In: Harvey, A. Ed. Natural and synthetic neurotoxins. Academic Press. USA. 1993, 319-340.
- 18-Kawai, H.; Miwa, A.; Abe, T. Spider venom contains specific receptor blocker of glutaminergic synapses. *Brain Research.* 1982, 247, 169-171.
- 19-Kari, I.; Peura, P.; Airaksinen, M. M. Mass fragmentographic determination of tetrahydro-beta-carboline in human blood platelets and plasma. *Med. Biology.* 1979, 57, 6, 412-414.
- 20-Kobayashi, M.; Chen, Y.J.; Aoki, S.; Ishida, T.; Kitagawa, I. Four new  $\beta$ -carboline alkaloids isolated from two Okinawan marine sponges of *Xestospongia* sp. and *Halidona* sp. *Tetrahedron.* 1995, 51, 3727-3736.
- 21-Kobelt, P.; Tebbe, J.J.; Tjandra, I.; Bae, H.G.; Klapp, B.F.; Wiedenmann, B.; Monnikes, H. Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain. *Brain Res. Protocols.* 2004, 13 (1), 45-52.
- 22-Lecea, L.; Kilduff, T.S.; Peyron, C.; Gao, X.B.; Foye, P.E.; Danielson, P.E.; Fukuhara, C.; Battenberg, E.L.F.; Gautvik, V.T.; Bartlett, I.I.; Frankel, W.N.; van del Pol, A.N.; Bloom, F.E.; Gautvik, K.M.; Suckcliffe, J.G. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Neurobiology.* 1998, 95, 322-327.
- 23-Lichtenberg-Kraag, B.; Klinger, J. F.; Mühlbauer, E.; Rommelpacher, H. The natural  $\beta$ -carbolines facilitates inositol phosphate accumulation by activating small G-protein in human neuroblastoma cell (SH-SY5Y). *Neuropharmacology.* 1997, 36, 11/12, 1771-1778,
- 24-Lino de Oliveira, C.; Sales, A.J.; Del Bel, E.A.; Silveira, M.C.L.; Guimarães, F.S. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. *Brain Res. Bull.* 2001, 55 (6), 747-754.

- 
- 25-Marques, M.R.; Mendes, M.A.; Tormena, C.F.; Souza, B.M; Cesar, L.M.M.; Rittner, R.; Palma, M.S. Structure determination of a tetrahydro- $\beta$ -carboline of arthropod origin: a novel alkaloid toxin subclass from the web of spider *Nephila clavipes*. *Chem.Biodive*. 2005, 02,00 (*in press*).
- 26-McCormick, K.D. & Meinwald, J. Neurotoxic acypoliamines from spider venoms. *J. Chem. Ecology*. 1993, 19 (10), 2411-2451.
- 27-McCormick, J.; McCormick, K.; Duynstee, H.I.; van Engen, A.K.; van der Marel, G.A.; Ganem, B.; van Boon, J.H. Structure and total synthesis of HF-7, a neuroactive glyconucleoside disulfate from funnel-web spider *Hololena curta*. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 5661-5665.
- 28-Melchior, C.; Collins, M. A. The route and significance of endogenous synthesis of alkaloids in animals. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 1982, 9, 313 – 356.
- 29-Morgan, J.I. & Curran, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Ann. Rev.Neurosci.* 1991, 14,421-451.
- 30-Müller, W.E.; Fehske, K.J.; Borbe, H.O.; Wollert, U.; Nanz, C.; Rommelspacher, H. On the neuropharmacology of harmaline and other  $\beta$ -carbolines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1981, 14, 693-699.
- 31-Naranjo, C. Psychotherapeutic possibilities of new fantasy-enhancing drugs. *Clin. Toxicol.* 1969, 2, 209 – 224.
- 32-Nielsen, E.B.; White, F.J., Holohean, A.M.; Callahan, P.M.; Appel, J.B. Behavioral and biochemical evidence for serotonergic actions of tetrahydro-beta-carbolines. *Life Science.* 1982, 31, 2433-2439.
- 33-Nistico, G.; De Sarro, G. B.; Langer, S. Z. Behavioural and electrocortical power spectrum effects of 5-methoxytryptoline and other analogs after intraventricular administration in rats. *Eur. J. Pharmacology.* 1987, 142 (1), 121-128.
- 34-Palma, M.S.; Itagaki, Y.; Fujita, T; Hisada, M. Naoki, H.; Nakajima, N. T. Mass spectrometric structure determination of spider toxins: Arginine-

- 
- containing acylpolyamines from venoms of Brazilian garden spider *Nephilengys cruentata*. *Natural Toxins*. 1997, 5, 47-57.
- 35-Peura, P.; Johnson, J.V.; Yost, R.A.; Faull, K.F. Concentrations of triptoline and methtryptoline in rat brain. *J. Neurochemical*. 1989, 52, 847-852.
- 36-Peyron, C.; Tighe, D.K.; van del Pol, A.N.; Lecea, L.; Heller, H.C.; Sutcliffe, J.G.; Kilduff, T. Neurons containing Hypocretin (Orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci*. 1998, 18 (23), 9996-10015.
- 37-Pfau, W. & Skog, K. Exposure to  $\beta$ -carbolines norharman and harman. *J. Chromatogr*. 2004, 802, 115-126.
- 38-Rodrigues, M.C.; Guizzo, R.; dos Santos, W.F.; Cairasco, N.G. A comparative neuroethological study of limbic seizures induced by *Parawixia bistriata* venom and kainic acid injections in rats. *Brain Res Bull*. 2001, 55 (1), 79-86.
- 39-Rodrigues, M.C.; Guizzo, R.; Gobbo-Neto, L.; Ward, R.J.; Lopes, N.P.; dos Santos, W.F. The biological activity in mammals and insects of the nucleosidic fraction from the spider *Parawixia bistriata*. *Toxicon*. 2004, 43 (4), 375-383.
- 40-Rommelspacher, H.; May, T.; Salewski, B. Harman (1-methyl- $\beta$ -carboline) is a natural inhibitor of monoamine-oxidase type A in rats. *Eur. J. Pharmacol*. 1994, 252, 51-59.
- 41-Salamoni, S.D. Estudo da acilpoliamina JSTX-3 na atividade epileptiforme induzida em neurônios hipocâmpais *in vitro*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - Porto Alegre – RS. 2004, 161p.
- 42-Salmoun, M.; Devijver, C.; Daloz, D.; Braekman, J.C.; Gomez, R.; de Kluijver, M.; Van Soest, R.W.M. New Sesquiterpene/Quinones from two sponges of genus *Hyrtios*. *J.Nat. Prod*. 2000, 63, 452-456.
- 43-Seyama, I.; Yakehiro, M.; Nakajima, T. Triptamine blocks the sodium channels only from the inside of squid giant axon. *Jpn. J. Physiology*. 1985, 35 (2), 367-373.

- 
- 44-Shimizu, M.; Ishikawa, M.; Komoda, Y.; Nakajima, M. A new synthesis of (+) Trypargine. *Chem. Pharm. Bull.* 1982, 30, 909-913.
- 45-Shimizu, M.; Ishikawa, M.; Komoda, Y.; Nakajima, T; Yamaguchi, K.; Sakai, S. Asymmetric synthesis and absolute configuration of (-) Trypargine. *Chem. Pharm. Bull.* 1984, 32, 1313 – 1325.
- 46-Solis-Maldonado, C.; Quintanilla-Licea, R.; Tamez-Guerra, R.; Rodriguez-Padilla, C.; Gomez-Flores, R. Differential effects of synthetic indoloquinolizines on in vitro rat lymphocytes and macrophage functions. *International Immunopharmacol.* 2003, 3, 1261-1271.
- 47-Stroelin-Benedetti, M. & Dostert, P. *Advances in Drug Research*. Ed: Academic Press, Londres. 1992, 65 p.
- 48-Taggi, A.E.; Meinwald, J.; Schoroeder, F.C. A new approach to natural products discovery exemplified by the identification of sulfated nucleosides in spider venom. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 10364-10369.
- 49-Thannickal, T.C.; Moore, R.Y.; Nienhuis, R.; Ramanathan, L.; Gulyani, S.; Aldrich, M.; Cornford, M.; Siegel, J.M. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron.* 2000, 27, 469-474.
- 50-Tu, L.C.; Chou, C.K.; Chen, C.Y.; Chang, Y.T.; Shen, Y.C.; Yeh, S.F. Characterization of the cytotoxic mechanism of Mana-Hox, an analog of manzamine alkaloids. *Biochim Biophys Acta.* 2004, 1672(3),148-56.
- 51-van Del Pol, A. Narcolepsy: A neurodegenerative disease of the hypocretin system? *Neuron.* 2000, 27, 415-418.
- 52-Wagoner, R. M. V.; Jompa, J.; Tahir, A.; Ireland, C. M. Tripargine alkaloids from a previously undescribed *Eudistoma* sp. Ascidian. *J. Nat. Products.* 1999, 62, 794-797.



---

## Capítulo I

**Estudo da Ação da Toxina 6-Hidroxitripargina  
em Encéfalo de Rato Wistar, por meio da  
Análise da Expressão da Proteína Fos.**

---

---

## RESUMO

---

Os compostos  $\beta$ -carbolínicos são alcalóides com propriedades alucinógenas, encontrados em plantas e em tecidos e fluídos corpóreos de mamíferos. Os derivados  $\beta$ -carbolínicos formados endogenamente em mamíferos são considerados inibidores reversíveis da enzima monoamino oxidase (MAO). Devido a essa ação inibitória, as  $\beta$ -carbolinas são consideradas como neuromoduladores capazes de regular os níveis de aminas endógenas, tais como a serotonina, noradrenalina, tiramina e catecolaminas. Essa neuromodulação ocorre por meio do controle de processos metabolismo dessas aminas.

A  $\beta$ -carbolina usada neste trabalho foi extraída e isolada da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* (6-hidroxitripargina), sendo sintetizada pelo protocolo de síntese de tetrahydrocarbolinas (Shimizu *et al.*, 1982). Experimentos de injeções intracerebroventricular (*icv*) e endovenosa (*ev*) da 6-hidroxitripargina, nas respectivas concentrações de 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l e de 600 $\mu$ g/ $\mu$ l foram realizados em ratos Wistar machos adultos (n=18 e n=6 respectivamente). Esse composto induziu a expressão da proteína Fos em algumas regiões do sistema nervoso central (SNC), tais como, a área hipotalâmica anterior e área hipotalâmica lateral, epêndima dos ventrículos, a região perifornical, área pré-óptica lateral, núcleo septal lateral, córtex sensorial e motor, núcleos paraventricular e dorsomedial do hipotálamo, o hipocampo, zona incerta e alguns núcleos talâmicos: reuniens, central medial, rombóide, centro lateral e paracentral.

Para evidenciar a expressão de Fos foram realizados procedimentos imunohistoquímicos, utilizando anticorpo primário anti-Fos e reação de imunoperoxidase, sendo os cortes posteriormente intensificados com ósmio, para melhor visualização das áreas marcadas. A análise comparativa da expressão de Fos após a administração dos compostos 6-hidroxitripargina e tripargina foi realizada, sendo a tripargina administrada de modo *icv* na concentração de 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l (n=6). O padrão observado após a imunohistoquímica revela uma marcação bastante similar para ambos

compostos. A identificação dos neurônios Fos-imunorreativos a 6-hidroxitripargina ocorreu por meio de duplas-marcações com alguns receptores, enzima e neuropeptídeo (rGlu<sub>2/3</sub>, NMR<sub>1</sub>, tirosina-hidroxilase e orexina). Observou-se a ocorrência de células duplamente marcadas em todos os casos, exceto em neurônios que apresentam a enzima tirosina-hidroxilase. Essa marcação de Fos para neurônios diferentes após a ação da 6-hidroxitripargina evidencia uma das características peculiares dos compostos  $\beta$ -carbolínicos, que é capacidade de ligação a diferentes receptores do SNC.

Esses resultados abrem caminhos para um possível estudo de interação da 6-hidroxitripargina com algumas áreas específicas do SNC de roedores, áreas essas, que se encontram principalmente na região hipotalâmica e que estão relacionadas à atenção, ao estresse e ao alerta do animal. O estudo da ação desse composto possibilitará compreender melhor uma possível aplicação para essa neurotoxina.

---

---

## ABSTRACT

---

$\beta$ -carbolines are alkaloids compounds with hallucinogenic properties, found in plants, tissues and body fluids. Some endogenous  $\beta$ -carbolines are considered reversible inhibitors of monoamine oxidase enzyme (MAO). Such compounds are neuromodulators able to regulate the endogenous amine levels, such as serotonin, noradrenaline, tiramine and catecholamines. This neuromodulation occurs through the control of the release, reuptake and metabolism process of the amines.

The  $\beta$ -carboline used in this study, the 6-hydroxytrypargine, was extracted and isolated from *Parawixia bistrata* spider venom; its was synthetized throgh the tetrahydrocarbolines synthesis protocols, with adaptations for such structure (Shimizu *et al.*, 1982). Intracerebroventricular (*icv*) and endovenous (*ev*) injections of the 6-hydroxytrypargine under its respective concentrations of 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l and 600  $\mu$ g/ $\mu$ l were performed in adult male Wistar rats (n=18 and n=6, respectively). This compound induced the expression of Fos protein in some areas of the central nervous system (CNS), such as anterior hypothalamic area and lateral hypothalamic area, ependyma on the ventricles, perifornical region, lateral preoptic area, lateral septal nucleus, sensorial and motor cortex, paraventricular and dorsomedial nuclei of the hypothalamus, hippocampus, zona incerta and some thalamic nuclei: reuniens nucleus, central medial nucleus, rhomboid nucleus, centrolateral nucleus and paracentral nucleus.

Immunohistochemistry procedures revealed the Fos expression. They used anti-Fos primary antibody and immunoperoxidase reaction and were intensified with osmium to improve the visualization of the labeled areas. The comparative analysis of the Fos expression was performed after the administration of the 6-hydroxytrypargine and trypargine. Trypargine was administrated *icv* under concentration of 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l (n=6). After immunohistochemistry, the observed pattern was very similar for both compounds. The identification of Fos-immunoreactive neurons to 6-hydroxytrypargine occured through double-labeling with some receptors,

enzymes and neurotransmitters (rGlu<sub>2/3</sub>, NMR<sub>1</sub>, tyrosine-hydroxylase and orexin). The double-labeling just not occurred in neurons containing tyrosine-hydroxylase. The presence of different Fos-immunoreactive neurons to the 6-hydroxytryptamine shows the affinity of the  $\beta$ -carboline compounds with many different receptors of the CNS.

These results will allow new studies about the interaction of the 6-hydroxytryptamine with some specific areas of the CNS of rats, specially in the hypothalamic region, related to attention, stress and arousal. The study the mechanism of action of this neurotoxin will permit to discover practical application to this compound in near future.

---

## INTRODUÇÃO

A 6-hidroxitripargina é um composto de baixa massa molecular isolado recentemente da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* (Cesar, 2000). Para a elucidação dessa estrutura química, a peçonha bruta foi submetida a um fracionamento por meio de cromatografia líquida de alto desempenho, sendo cada uma das frações isoladas e estudadas separadamente. A fração mais abundante foi inicialmente escolhida por apresentar ação bioinseticida em presas dessa aranha. A elucidação estrutural dessa fração foi realizada com auxílio de técnicas espectroscópicas que revelaram que o composto em estudo é formado pela condensação de um triptofano com uma arginina, que resulta na formação da molécula de tripargina, que por sua vez sofre uma hidroxilação no grupo indol, na posição 6, formando o composto alcalóide denominado 6-hidroxitripargina (Cesar, 2000).

As toxinas de aranhas são classificadas em três grandes classes: proteínas de alta massa molecular; toxinas peptídicas e as toxinas de baixas massas moleculares (Kawai & Nakajima, 1993). Nesse último grupo encontram-se já descritas as acilpoliaminas, compostos isolados das peçonhas de algumas aranhas e vespas solitárias (Kawai *et al.*, 1982; Palma *et al.*, 1997). Essas acilpoliaminotoxinas apresentam ação neurobloqueadora em receptores de glutamato ionotrópico (Palma *et al.*, 1997). Existem também as nucleosídeo toxinas, encontradas em peçonhas de aranhas e serpentes, capazes de bloquearem receptores de cainato e canais de  $\text{Ca}^{+2}$  do tipo-L (McCormick *et al.*, 1999). O composto 6-hidroxitripargina é uma toxina de baixa massa, com propriedades químicas diferentes dos compostos já descritos nesse grupo, sendo considerada como a primeira tetrahydro- $\beta$ -carbolina encontrada numa peçonha de aranha (Cesar, 2000; Cesar *et al.* 2005).

As  $\beta$ -carbolinas são alcalóides farmacologicamente ativos que atuam inibindo a atividade da enzima MAO (Shimizu *et al.*, 1982). Esses compostos  $\beta$ -carbolínicos interferem na concentração cerebral de alguns

neurotransmissores, pois exercem uma ação neuromoduladora, capaz de regular o mecanismo de controle da liberação, da recaptação e do metabolismo de algumas aminas endógenas como: acetilcolina, serotonina, catecolaminas e tiraminas (Nielsen *et al.*, 1982). Estudos evidenciam que as  $\beta$ -carbolinas possuem alta afinidade de ligação por diferentes receptores neurais, tais como: imidazólicos (Husbands *et al.*, 2001), serotoninérgicos (Glennon *et al.*, 2000) e benzodiazepínicos (Airaksinen *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1991).

Os compostos  $\beta$ -carbolínicos foram descritos pela primeira vez em plantas da espécie *Peganum harmala* (Carreras & Alonso, 1967). Atualmente sabe-se da existência dessas substâncias também em tecidos e fluídos corpóreos de mamíferos (Rommelspacher *et al.*, 1991) e em outros grupos animais como esponjas marinhas do gênero *Eudistoma* (Wagoner, *et al.*, 1991), na pele da rã *Kassina senegalensis* (Akizawa *et al.*, 1982) e agora na peçonha de *P. bistrata* (Cesar, 2000).

O composto tripargina foi isolado pela primeira vez da pele de uma rã africana, denominada *Kassina senegalensis* (Shimizu *et al.*, 1982). Essa  $\beta$ -carbolina foi identificada posteriormente em encéfalo de rato e plaquetas humana (Peura *et al.*, 1989; Kari *et al.*, 1979). Esse alcalóide exerce ação inibitória sobre canais de  $\text{Na}^+$ , suprimindo a corrente desses íons, que por sua vez, reduzem o grau de abertura de canais de  $\text{Ca}^{+2}$  em membranas axonais de lula, agindo como um modulador da liberação de neurotransmissores em receptores serotoninérgicos (Akizawa *et al.*, 1982; Seyama, *et al.*, 1985).

Efeitos comportamentais e eletrocorticais da tripargina e de dois de seus derivados (5-metoxitripargina e 5-hidroxitripargina) foram estudados por meio de injeções *icv* em ratos (Nistico *et al.*, 1987). Segundo os autores, esses três compostos produziram uma dessincronização da atividade cerebral, de maneira dose dependente e uma síndrome de estimulação comportamental.

A expressão da proteína Fos tem sido empregada nos estudos de mapeamento da ação de muitos fármacos no SNC. Essa proteína é considerada como um marcador da ativação neuronal, por ser um fator de

---

transcrição induzível capaz de ser rapidamente expresso, após estimulações extrínsecas e cuja expressão pode ser observada em regiões distintas do SNC (Sagar *et al.*, 1988; Lino-de-Oliveira, 2001).

A N-metil- $\beta$ -carbolina-3-carboxamida (FG-7142) é uma  $\beta$ -carbolina caracterizada como uma droga ansiogênica, com ação em receptores benzodiazepínicos (Singewald *et al.*, 2003). Estudos da expressão da proteína Fos após a administração dessa  $\beta$ -carbolina evidenciaram um aumento de células Fos-imunorreativas em várias regiões do córtex, nos núcleos septal lateral e septal medial, no hipocampo dorsal, nos núcleos central, basolateral e medial da amígdala, nos núcleos paraventricular e dorsomedial do hipotálamo e na área hipotalâmica lateral. Segundo esses autores, expressões de Fos em regiões da amígdala, núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo septal lateral e córtex pré-frontal podem estar associados a mecanismos de ansiedade ativados pela ação desse composto.

Nesse trabalho, objetivou-se estudar a ação *icv* e *ev* da  $\beta$ -carbolina 6-hidroxitripargina no SNC de ratos, por meio da expressão da proteína Fos. Assim como outros derivados análogos à tripargina, procurou-se traçar um paralelo comparativo entre ensaios *icv* desses dois compostos, com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação da 6-hidroxitripargina e de auxiliar na descoberta de uma possível aplicação para esse composto.



## MATERIAL E MÉTODOS

### *Síntese da 6-hidroxitriptargina*

A síntese da 6-hidroxitriptargina foi realizada com base nos conhecimentos da síntese da triptargina de acordo com o protocolo descrito por Shimizu *et al.* (1982). A  $\beta$ -carbolina em estudo foi sintetizada a partir de 2-benzil – 3 - (metoxicarbonil) – 1,2,3,4 – tetrahidro - 9H – pirido [3,4 - b] indol -1-ácido propiônico, por meio da reação assimétrica de Pictet-Spengler de N<sub>b</sub>-benzil-(D)-triptofano metil ester. A análise da qualidade do material obtido na síntese foi realizada através da identificação de algumas propriedades físico-químicas da 6-hidroxitriptargina (mp 211-213 °C;  $[\alpha]_D^{+37}$  (MeOH); MS m/z:272 (M+H)<sup>+</sup>) com os dados obtidos na publicação já descrita (Shimizu *et al.*, 1982).

### *Animais*

Os animais utilizados nestes experimentos foram ratos Wistar machos adultos com 60 dias e peso aproximado de 250 a 300 g, trazidos para o Biotério de Experimentação do Depto. de Anatomia ICB/USP sete dias antes da experimentação para ambientação ao novo local, sendo alojados dois animais por gaiola, com ração e água *ad libitum* e permanecendo num ciclo de claro/escuro de 12:12 horas a partir das 7:00h, em temperatura ambiente de 21°C e umidade relativa do ar de 55%. Os experimentos foram conduzidos em conformidade com as normas do Instituto Nacional de Normas de Saúde e Cuidados na Utilização de Animais de Laboratório (1996) e da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

### *Cirurgia para a colocação da cânula icv e habituação*

A cânula guia foi implantada no ventrículo lateral (AP = - 0,4; ML = - 1,4; DV = - 3,4) (Paxinos & Watson, 1998) sob ação anestésica de cetamina, xylazina e acepromazina (25:5:1 mg/Kg peso corpóreo) sete dias antes da injeção da 6-hidroxitripargina. Durante esse período que antecedeu o experimento, os animais foram manipulados pelo experimentador, pelo menos duas vezes ao dia, durante 10 minutos, para promover a habituação do animal e minimizar o estresse, no momento da injeção icv, que poderia vir a interferir nos resultados finais.

### *Administração da 6-hidroxitripargina e da tripargina icv*

Para a injeção icv, a cânula de injeção foi introduzida pela cânula guia, cerca de duas horas antes do experimento e as duas  $\beta$ -carbolinas em estudo (6-hidroxitripargina e tripargina) foram administradas em dois grupos distintos. O primeiro grupo (n=18) recebeu cerca de 10 $\mu$ l de solução contendo 6-hidroxitripargina na concentração de 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l. Já o segundo grupo (n=6) recebeu cerca de 10  $\mu$ l de solução contendo tripargina na concentração de 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l. Nos animais dos grupos controles de ambos experimentos (n=18 e n=6 respectivamente) injetou-se apenas o veículo, 10 $\mu$ l de solução salina [0,9% (m/V)].

### *Cirurgia para a colocação da cânula ev*

A cânula ev foi introduzida pela veia femoral dos animais, sob a ação de uma solução anestésica composta de cetamina, xylazina e acepromazina. Após a incisão da pele e divulsão do tecido conjuntivo, a veia femoral foi isolada com auxílio de pinças cirúrgicas e a circulação local momentaneamente interrompida em dois pontos, com uma distância de cerca de 1cm de um ponto a outro. Após a interrupção da circulação, uma pequena secção na veia permitiu sua canulação. Essa extremidade da cânula utilizada na canulação foi devidamente fixada no tecido muscular do

animal, por meio de uma sutura muscular, enquanto a outra extremidade foi interiorizada através da região subcutânea do corpo do animal até atingir seu dorso, na altura dos ossos da escápula, sendo exteriorizada e fechada adequadamente. Esse procedimento foi realizado sete dias antes da injeção da 6-hidroxitripargina. Os animais foram manipulados da mesma forma que os submetidos à injeção icv.

#### *Administração da 6-hidroxitripargina ev*

A 6-hidroxitripargina foi injetada ev em 250µl, na concentração: 600µg/µl (n=6), dissolvida em solução salina [0,9% (m/V)], nos animais controle (n=6) foi injetado apenas solução salina [0,9% (m/V)].

#### *Perfusão transcardíaca*

Após duas horas decorridas da injeção da 6-hidroxitripargina, tempo em que a marcação da proteína Fos mostrou-se mais efetiva (Cesar, 2000), os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca, primeiramente com solução salina 0,9% (m/V) (cerca de 75ml), seguida pelo fixador de formaldeído a 4% (m/V) a 4°C (cerca de 750 a 800ml) durante 25 minutos.

#### *Pós-fixação dos encéfalos e microtomia*

Os encéfalos foram retirados e colocados em solução fixadora de paraformaldeído a 4% (m/V), contendo 10% (m/V) de sacarose para crioproteção e pós-fixados por 4 horas, sendo em seguida transferidos para uma solução salina de tampão fosfato de potássio (KPBS) contendo 10% de sacarose por cerca de 18 horas. Os encéfalos foram cortados em micrótomo de congelamento, com 30µm de espessura no plano coronal em 5 séries de 1 em 5 e armazenados a - 20°C em solução anticongelante de etileno glicol/glicerol.

### *Imunohistoquímica*

Uma série de cortes do encéfalo de cada um dos animais utilizados nos experimentos foi usada para a marcação imunohistoquímica. Os cortes foram tratados com 0,3% de peróxido em solução tampão de fosfato de potássio (KPBS) + 0,3% de Triton, por cerca de 30 minutos, sendo em seguida, incubados em anticorpo primário anti-Fos (Oncogene Ab5) feito em coelho, na concentração 1:20000 e 3% de soro normal de cabra em KPBS + 3% de Triton X-100, por 18 horas a temperatura ambiente, sob constante agitação e no escuro. Os cortes foram então lavados em KPBS e incubados, por 1 hora, em anticorpo secundário biotilado, feito em cabra contra coelho (Jackson Labs 1:1000) e por mais 1 hora em complexo de avidina-biotina (Vector, 1:500). Após esses procedimentos os cortes foram reagidos com tetrahidroclorato de diaminobenzidina (DAB, Sigma) e 0,01% de peróxido de hidrogênio dissolvidos em KPBS. Os cortes permaneceram reagindo por cerca de 3 minutos, e para cessar as reações foram realizadas lavagens sucessivas com KPBS (Gerfen & Sawchenko, 1984; Shu *et al.*, 1988; Sita *et al.*, 2003). Uma vez ocorrida a reação para a marcação de Fos os cortes foram montados em lâminas e intensificados em solução de ósmio 0,005% para realçar a reação imunohistoquímica.

### *Duplas-marcações*

Para investigar a neuroquímica dos neurônios que expressam Fos após a administração da 6-hidroxitriptargina foram realizadas duas técnicas diferentes de marcação: dupla imunohistoquímica e dupla imunofluorescência (somente no caso da tirosina-hidroxilase).

Nas reações de dupla imunohistoquímica, quatro séries de cortes foram tratadas com 0,3% de peróxido em solução tampão KPBS + 0,3% de Triton, por cerca de 30 minutos, sendo em seguida, incubados em anticorpo primário anti-Fos (Oncogene Ab5) feito em coelho, na concentração 1:20000 e 3% de soro normal de cabra em KPBS + 3% de Triton X-100, por 18 horas à temperatura ambiente, sob constante agitação e no escuro. Os cortes

foram então lavados em KPBS e incubados em anticorpo biotinilado secundário feito em cabra contra coelho (Jackson Labs 1:1000) e em complexo de avidina-biotina (Vector, 1:500), ambos por 1 hora. Após esse procedimento os cortes foram reagidos com tetrahydroclorato de diaminobenzidina e níquel (DAB-Ni, Sigma) e 0,01% de peróxido de hidrogênio dissolvido em KPBS. Os cortes permaneceram reagindo por cerca de 3 minutos e para cessar as reações foram realizadas lavagens sucessivas com KPBS. Em seguida, os cortes foram lavados e cada uma das séries foi incubada em KPBS + 0,3% de Triton X-100 e um dos seguintes anticorpos: anti-rGlu<sub>2/3</sub> (1:500); anti-NMR<sub>1</sub> (1:1000); anti-tirosina-hidroxilase (1:1000) e anti-orexina (1:5000), sendo incubados por 18 horas à temperatura ambiente, sob constante agitação. Os cortes foram lavados em solução de KPBS e incubados em solução contendo anticorpo secundário biotinilado de cabra contra coelho (Jackson Labs, 1:200) por 1 hora e 30 minutos, seguida por mais 1 hora e 30 minutos de incubação em complexo de avidina-biotina (Vector 1:500). Em seguida os cortes foram incubados em tetrahydroclorato de diaminobenzidina (DAB, Sigma) e 0,01% de peróxido de hidrogênio diluídos em KPBS, por cerca de 3 minutos, sendo a reação paralisada com sucessivas lavagens com KPBS. E os cortes montados em lâminas gelatinizadas.

Para a dupla imunofluorescência, uma série de cortes foi incubada em anticorpo primário policlonal anti-Fos feito em coelho (Oncogene Ab5), na concentração 1:1000 e 1% de BSA, em solução de KPBS e 0,3% de Triton X-100, por 18 horas a temperatura ambiente. Os cortes foram em seguida, lavados em KPBS e incubados em anticorpo secundário conjugado de fluoresceína (FITC) anti-coelho feito em mula (Jackson Labs), na concentração de 1:200, por 1 hora. Em seguida os cortes foram incubados em anticorpo policlonal anti-TH (tirosina-hidroxilase) feito em ovelha (Chemicon), na concentração 1:5000 e 1% de BSA em KPBS e 0,3% de Triton X-100, por 18 horas, a temperatura ambiente. Após serem lavados por KPBS, os cortes, foram incubados em anticorpo Cy3 secundário conjugado anti-ovelha, feito em mula (Jackson Labs), na concentração de 1:200, por 1

---

hora. Em seguida, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e cobertos com tampão glicerol (pH 8,5).

### *Aquisição das Imagens*

As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmera digital Spot RT (Instrumentos Diagnósticos) adaptada a um microcópio Leica DMR e a um computador PC Apple Macintosh Power. Para a aquisição utilizou-se o software Adobe PHOTOSHOP 5.0. As imagens foram trabalhadas usando o programa Corel Draw 11 e apenas ajustes finos, como brilho, contraste e balanço de cores foram utilizados.

### *Análise Estatística*

Para a análise quantitativa de células imunorreativas a Fos foram escolhidos cinco cortes representativos de cada uma das regiões cerebrais de interesse, doze áreas foram incluídas nas análises. Em cada um dos cortes, o número de células foi contado numa área tecidual de 0,2 mm<sup>2</sup> (para os núcleos: paraventricular do hipotálamo, septal lateral, dorsomedial, centro lateral, centro medial, paracentral, reuniens e para o córtex sensorial) ou 1 mm<sup>2</sup> (área hipotalâmica lateral, área perifornical, área pré-óptica, hipocampo e zona incerta). A análise estatística foi realizada de acordo com protocolo descrito por Beck e Fibiger (1995), sendo o teste-t utilizado para comparar os grupos controle e da 6-hidroxitripargina, com nível de significância da ordem de  $p < 0,05$ . Nessa estatística foram analisados somente os cortes de encéfalo de ratos utilizados nos experimentos icv com administração de 6-hidroxitripargina, pelo fato desse experimento ter um número amostral consideravelmente maior que o dos outros experimentos ensaiados, as informações foram consideradas estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ , para todas as áreas amostrais).

## RESULTADOS

A administração da  $\beta$ -carbolina 6-hidroxitripargina em ratos Wistar evidenciou o caráter neuroativo desse composto em mamíferos. Os efeitos da ação da 6-hidroxitripargina ministrada de forma icv foram representativos em algumas regiões do SNC desses animais, principalmente em regiões do hipotálamo e em alguns núcleos talâmicos. Entre essas áreas que expressaram Fos estão as regiões periventricular e perifornical, o núcleo septal lateral, os núcleos paraventricular e dorsomedial do hipotálamo, a área pré-óptica lateral, os núcleos talâmicos reuniens, paracentral, centro lateral, centro medial e rombóide, a zona incerta, o hipocampo e o córtex sensorial e motor (fig. 9A, 9C, 9E, 9G, 9I, 9K e 9M). Nos indivíduos controle (fig. 9B, 9D, 9F, 9H, 9J, 9L e 9N), observou-se uma marcação pouco expressiva nas áreas já descritas como Fos-imunorreativas à peçonha, já que somente cerca de 10% dos neurônios apresentavam-se marcados (tabela 1). Isso indica que as marcações observadas nos animais tratados com 6-hidroxitripargina são, na sua grande maioria, resultantes da possível ação dessa  $\beta$ -carbolina no SNC desses roedores e que a manipulação desses animais, durante os sete dias que antecederam a administração do composto, contribuiu para minimizar a ação do estresse sofrido durante os procedimentos de injeção icv.

Para esse primeiro experimento de administração icv da 6-hidroxitripargina, a contagem de células foi feita em 12 regiões diferentes, tanto para animais controle quanto para os tratados com essa  $\beta$ -carbolina (tabela 1). Uma análise estatística paramétrica (teste-t) foi realizada, evidenciando-se significância em nível de  $p < 0,05$ , para todas essas áreas. Os outros experimentos, embora, não façam parte dessa análise, evidenciam um padrão de expressão de Fos muito similar ao experimento analisado acima.

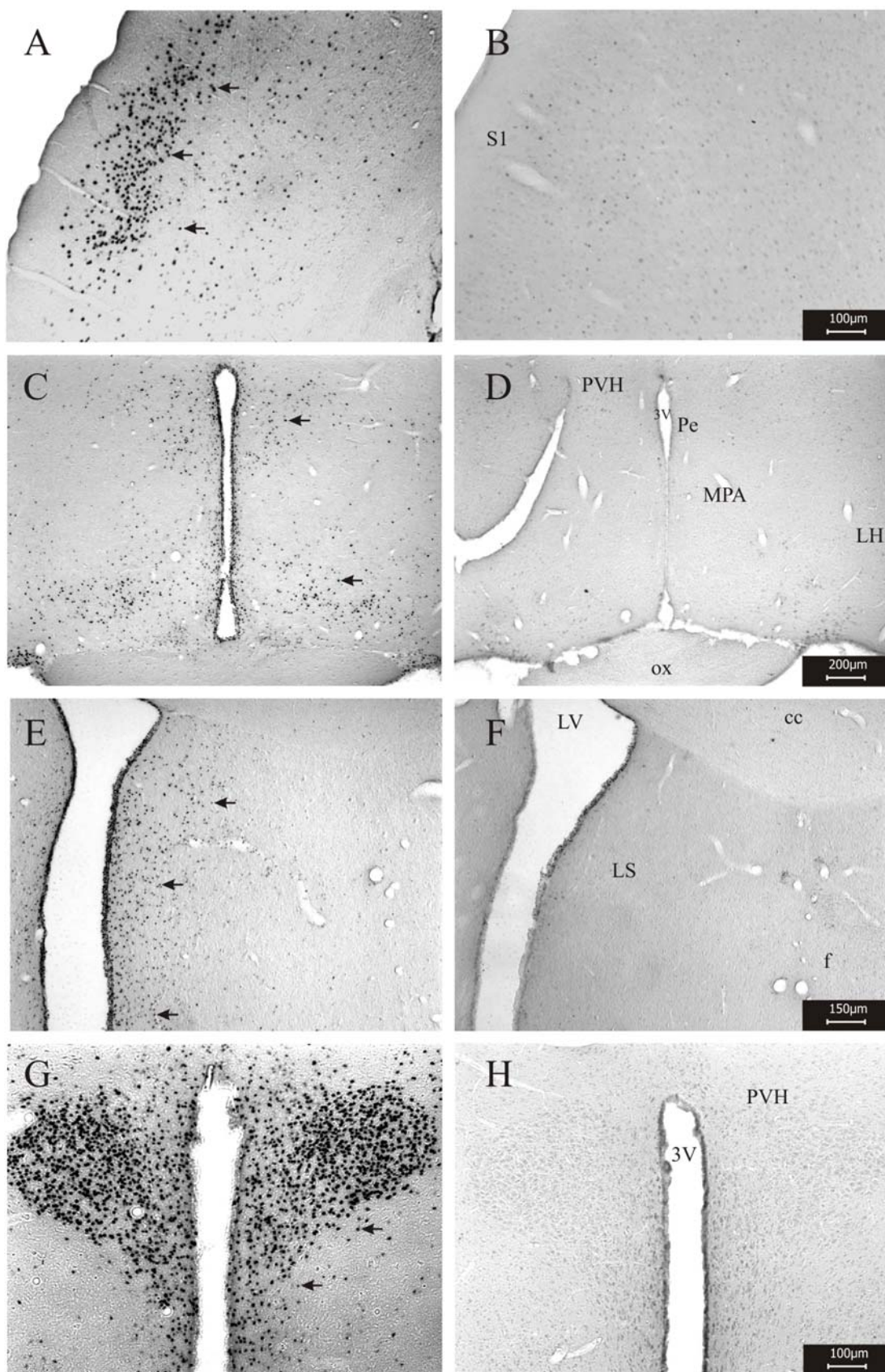
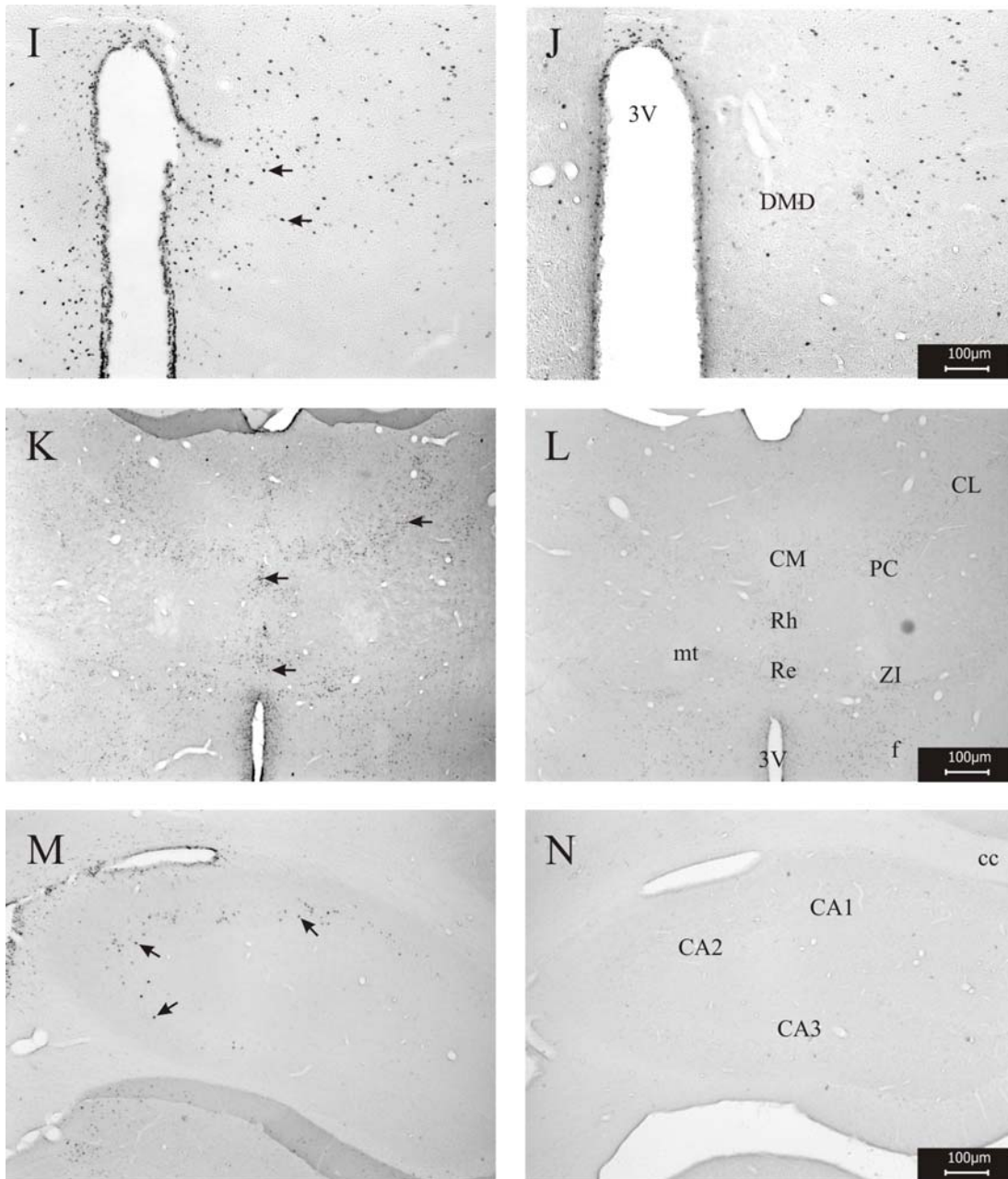


Figura 9 A-H.





**Figura 9:** Distribuição da presença da proteína Fos no SNC de rato. Fotomicrografias de campo claro evidenciando células imunorreativas à proteína Fos (setas) após administração intracerebroventricular da 6-hidroxitripargina (A-M) e em animais controle após administração de solução salina (B-N). A-B: córtex; C-D: área hipotalâmica; E-F: núcleo septal lateral; G-H: núcleo paraventricular do hipotálamo; I-J: núcleo dorsomedial do hipotálamo; K-L: núcleos talâmicos; M-N: hipocampo. Abreviações: 3V: terceiro ventrículo; CA1: região CA1 do hipocampo; CA2: região CA2 do hipocampo; CA3: região CA3 do hipocampo; cc: corpo caloso; CL: núcleo centro lateral; CM: núcleo centro medial; DMD: núcleo dorsomedial do hipotálamo; f: fórnice; LH: área hipotalâmica lateral; LS: núcleo septal lateral; LV: ventrículo lateral; MPA: área pré-óptica medial; mt: trato mamiló talâmico; ox: quiasma óptico; PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo; Pe: região periventricular; PC: núcleo paracentral; S1: córtex sensorial; Re: núcleo reuniens; Rh: núcleo rombóide; Zi: zona incerta. Barra de escala: 100 μm em A-B/ G-H/ I-J/ K-L/ M-N, 150 μm em C-D, 200 μm em E-F.

**Tabela 1. Número de células (média  $\pm$  SEM) mostrando a imunorreatividade das células Fos em ratos submetidos ao tratamento com salina [0,9% (m/V)] e com a 6-hidroxitripargina (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l).**

<b>Regiões</b>	<b>Salina</b>	<b>6-hidroxitripargina</b>
Córtex Sensorial	11,8 $\pm$ 4,32	92,0 $\pm$ 5,50
Hipocampo	8,4 $\pm$ 1,47	39,4 $\pm$ 4,45
Núcleo Septal Lateral	14,2 $\pm$ 2,60	139,8 $\pm$ 16,30
Núcleo Centro Lateral	5,0 $\pm$ 1,38	41,6 $\pm$ 7,23
Núcleo Centro Medial	7,0 $\pm$ 1,22	48,4 $\pm$ 13,44
Núcleo Paracentral	9,0 $\pm$ 1,52	39,8 $\pm$ 4,82
Núcleo Reuniens	6,0 $\pm$ 1,18	22,8 $\pm$ 0,97
Zona Incerta	7,6 $\pm$ 1,94	41,0 $\pm$ 5,68
Núcleo Paraventricular *	14,2 $\pm$ 4,45	206,6 $\pm$ 24,60
Núcleo Dorsomedial *	7,0 $\pm$ 1,67	31,60 $\pm$ 7,88
Área Hipotalâmica Lateral	12,0 $\pm$ 1,64	68,8 $\pm$ 23,67
Área Perifornical	12,6 $\pm$ 1,33	39,8 $\pm$ 7,57

As células imunorreativas foram contadas em áreas fixas (ver texto com descrição) nas regiões acima descritas. Os valores atribuídos na tabela são referentes às médias ( $\pm$  SEM) do número de células Fos positivas, n= 6, sendo  $p < 0,05$  (teste t ) para todas as áreas. (\*) núcleos do hipotálamo.

Com objetivo de caracterizar ainda melhor a ação da 6-hidroxitripargina e avaliar a capacidade da mesma de atravessar a barreira hemato-encefálica, experimentos com injeções *ev* foram realizados evidenciando que as regiões que expressaram Fos após esses ensaios foram basicamente às mesmas observadas nos experimentos de *icv* (fig. 10A, 10C, 10E, 10G, 10I, 10K e 10M), com exceção das marcações no núcleo central da amígdala (10K e 10L). As figuras 10B, 10D, 10F, 10H, 10J, 10L e 10N evidenciam a pouca expressão de Fos observada nos animais controle.

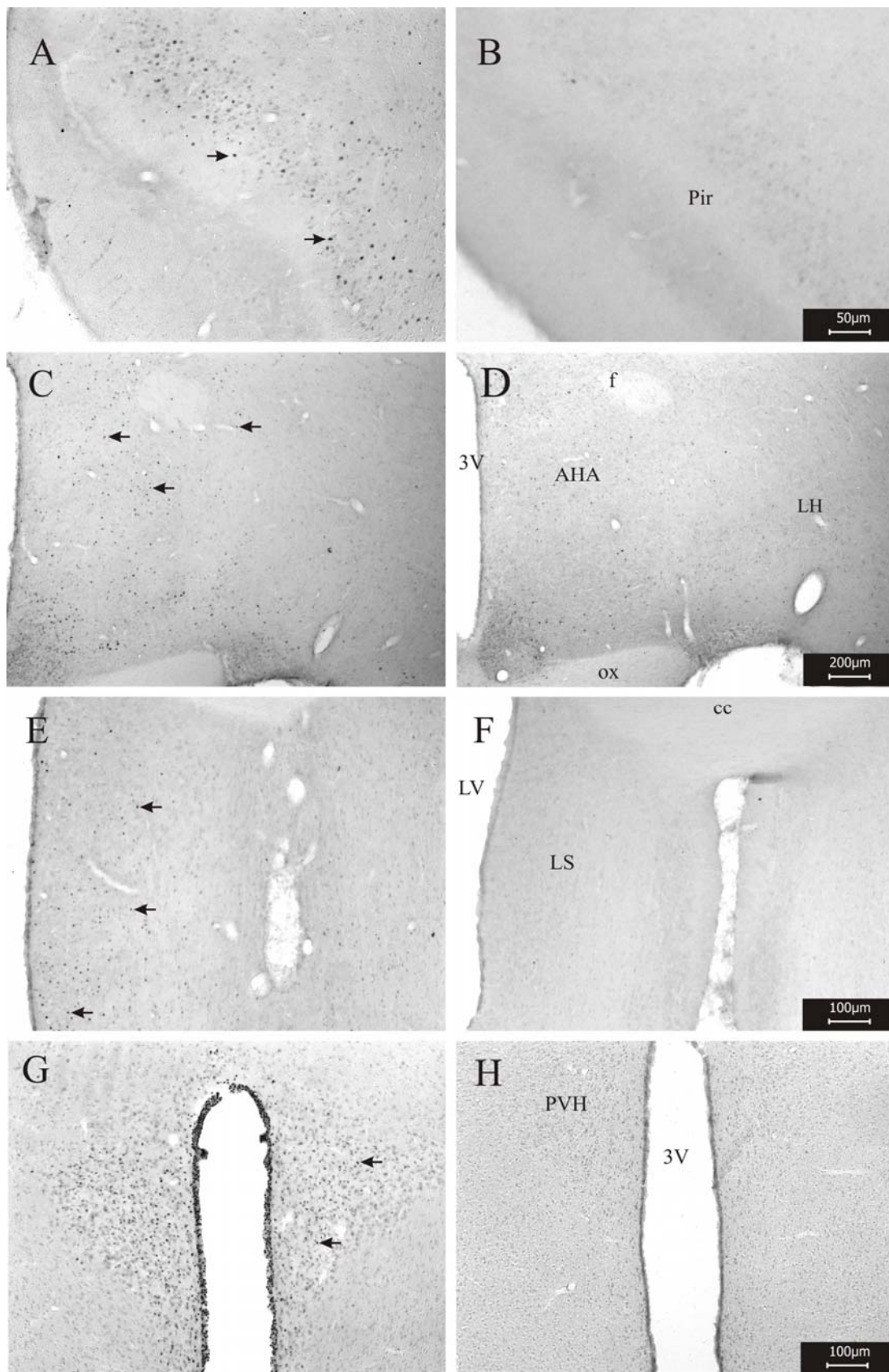
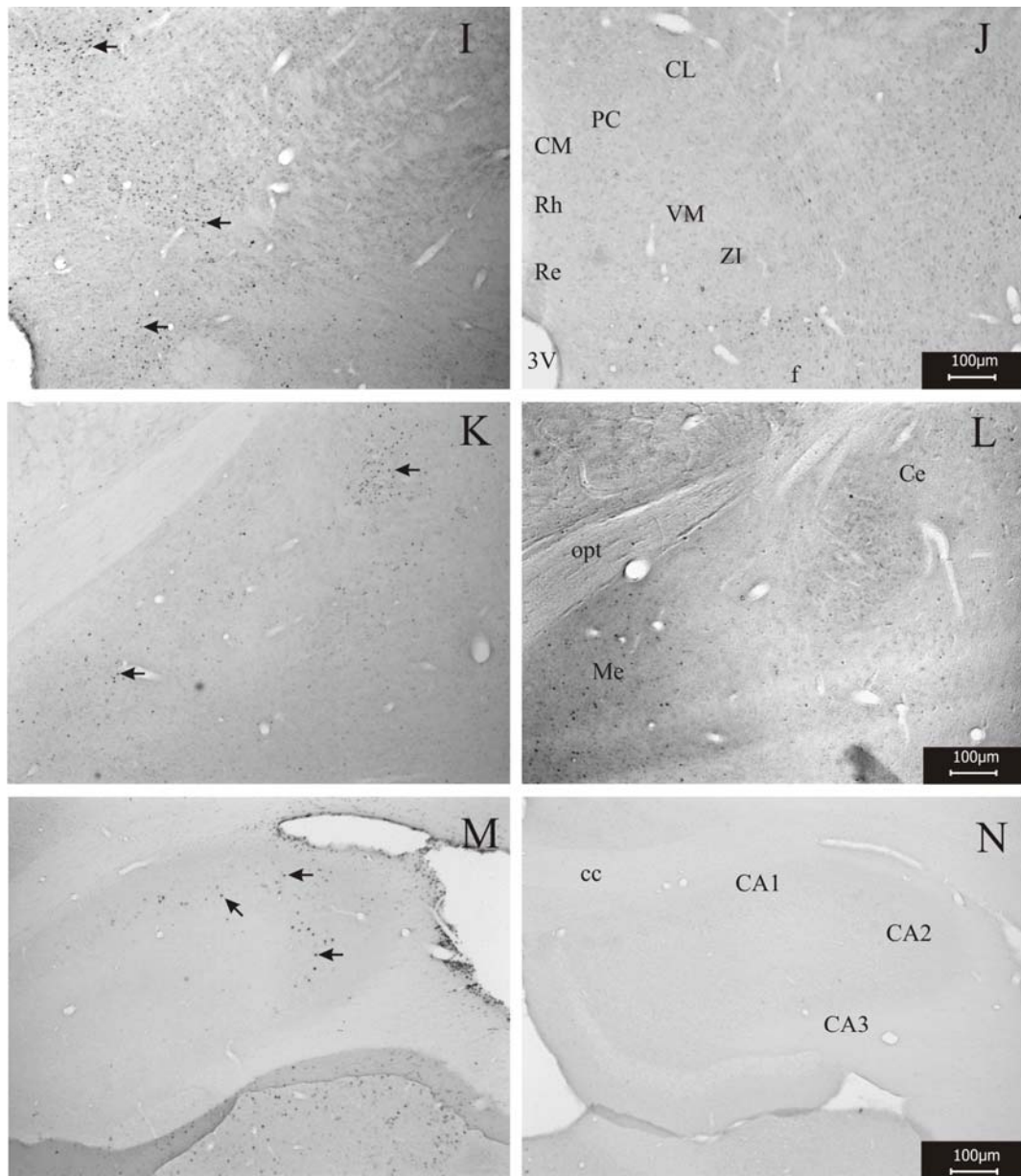


Figura 10 A-H.





**Figura 10:** Distribuição da presença da proteína Fos no SNC de rato. Fotomicrografias de campo claro evidenciando células imunorreativas à proteína Fos (setas) após administração endovenosa da 6-hidroxitriptargina (**A-M**) e em animais controle após administração de solução salina (**B-N**). **A-B:** córtex; **C-D:** área hipotalâmica; **E-F:** núcleo septal lateral; **G-H:** núcleo paraventricular do hipotálamo; **I-J:** núcleos talâmicos; **K-L:** região da amígdala; **M-N:** hipocampo. Abreviações: 3V: terceiro ventrículo; AHA: área hipotalâmica anterior; CA1: região CA1 do hipocampo; CA2: região CA2 do hipocampo; CA3: região CA3 do hipocampo; cc: corpo caloso; Ce: núcleo central da amígdala; CL: núcleo centro lateral; CM: núcleo centro medial; f: fórnice; LS: núcleo septal lateral; LV: ventrículo lateral; Me: medial da amígdala; opt: tracto óptico; ox: quiasma óptico; PVH: núcleo paraventricular; PC: núcleo paracentral; Pir: córtex piriforme, Re: núcleo reuniens; Rh: núcleo rombóide; VM: núcleo ventromedial; ZI: zona incerta. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  em A-B, 100  $\mu\text{m}$  em E-F/ G-H/ I-J/ K-L/ M-N, 200  $\mu\text{m}$  em C-D.

---

A 6-hidroxitripargina é uma  $\beta$ -carbolina recentemente caracterizada e descrita na literatura, cujas primeiras ações no SNC de mamíferos estão sendo elucidadas nesse trabalho. O composto análogo a 6-hidroxitripargina mais conhecido e com ações descritas na literatura é a tripargina. Essa  $\beta$ -carbolina isolada da rã *Kassina senegalensis* apresenta ações inibitórias sobre canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  e também é capaz de produzir mudanças fisiológicas e comportamentais, quando administrada *icv* em ratos. Embora bastante estudada, seu mapeamento por meio da expressão da proteína Fos, não havia sido ainda realizado.

Em nível de comparação, a tripargina foi administrada de maneira *icv* como observado nas figuras 11A, 11C, 11E e 11G e seus respectivos controles (fig. 11B, 11D, 11F e 11H). Evidenciando um padrão de expressão de Fos bastante similar ao da 6-hidroxitripargina, porém, as marcações dessa foram num maior número de células Fos-imunorreativas (fig.12).

**Figura 11:** Distribuição da presença de Fos no SNC de rato. Fotomicrografias de campo claro evidenciando células imunorreativas à proteína Fos (setas) após administração intracerebroventricular da tripargina (A-G) e em animais controle após administração de solução salina (B-H). A-B: área hipotalâmica anterior; C-D: núcleo septal lateral; E-F: núcleo paraventricular do hipotálamo; G-H: núcleos talâmicos; K-L: região da amígdala; M-N: hipocampo. Abreviações: 3v: terceiro ventrículo; CL: núcleo centro lateral; CM: núcleo centro medial; f: fórnice; LH: área hipotalâmica lateral; LHb: núcleo habenular lateral; LS: núcleo septal lateral; LV: ventrículo lateral; PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo; PC: núcleo paracentral; PVA: núcleo paraventricular anterior do tálamo. Barra de escala: 100 $\mu$ m em A-B-F, 150 $\mu$ m em E, 200 $\mu$ m em C-D/ G-H.

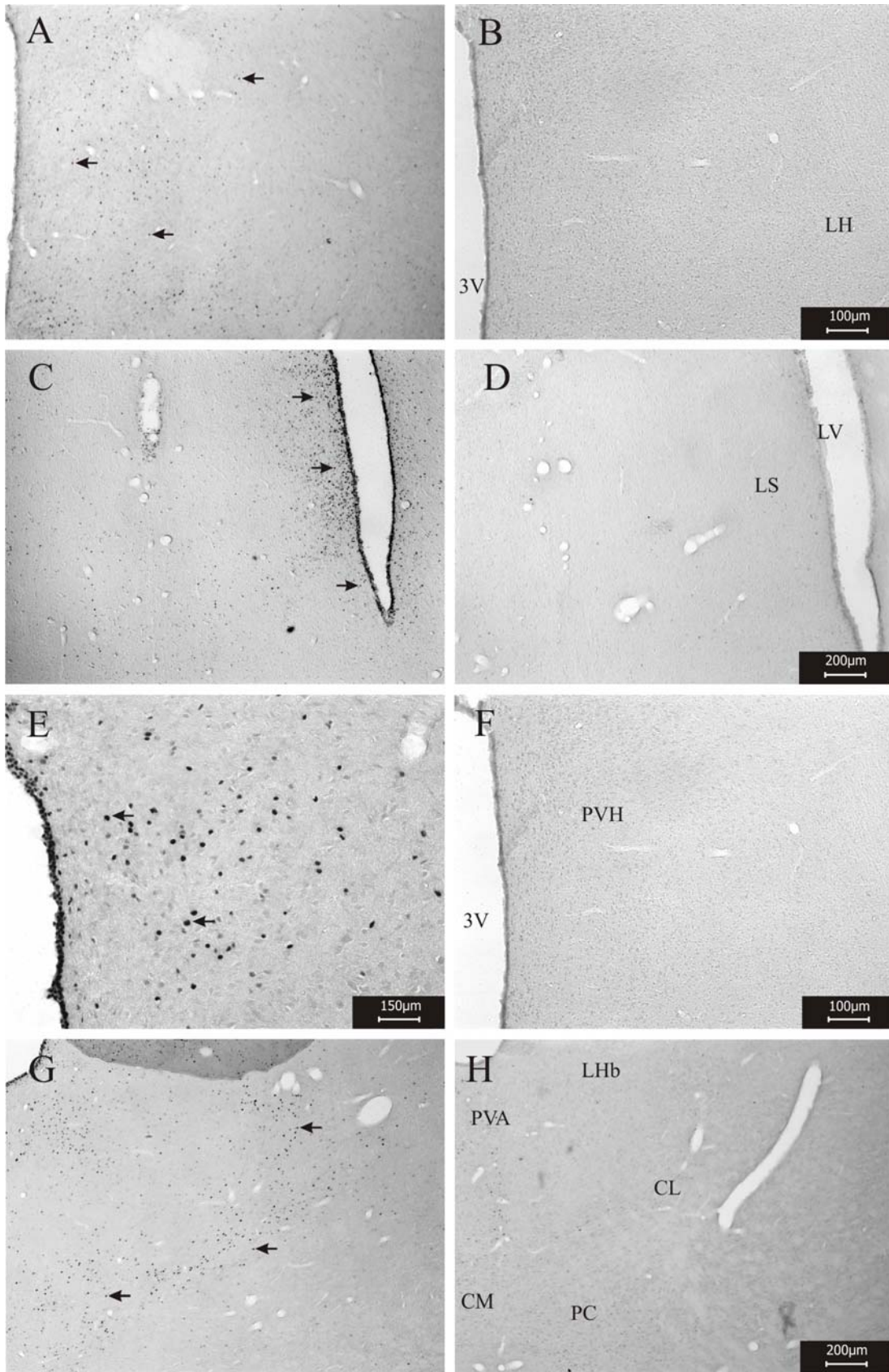
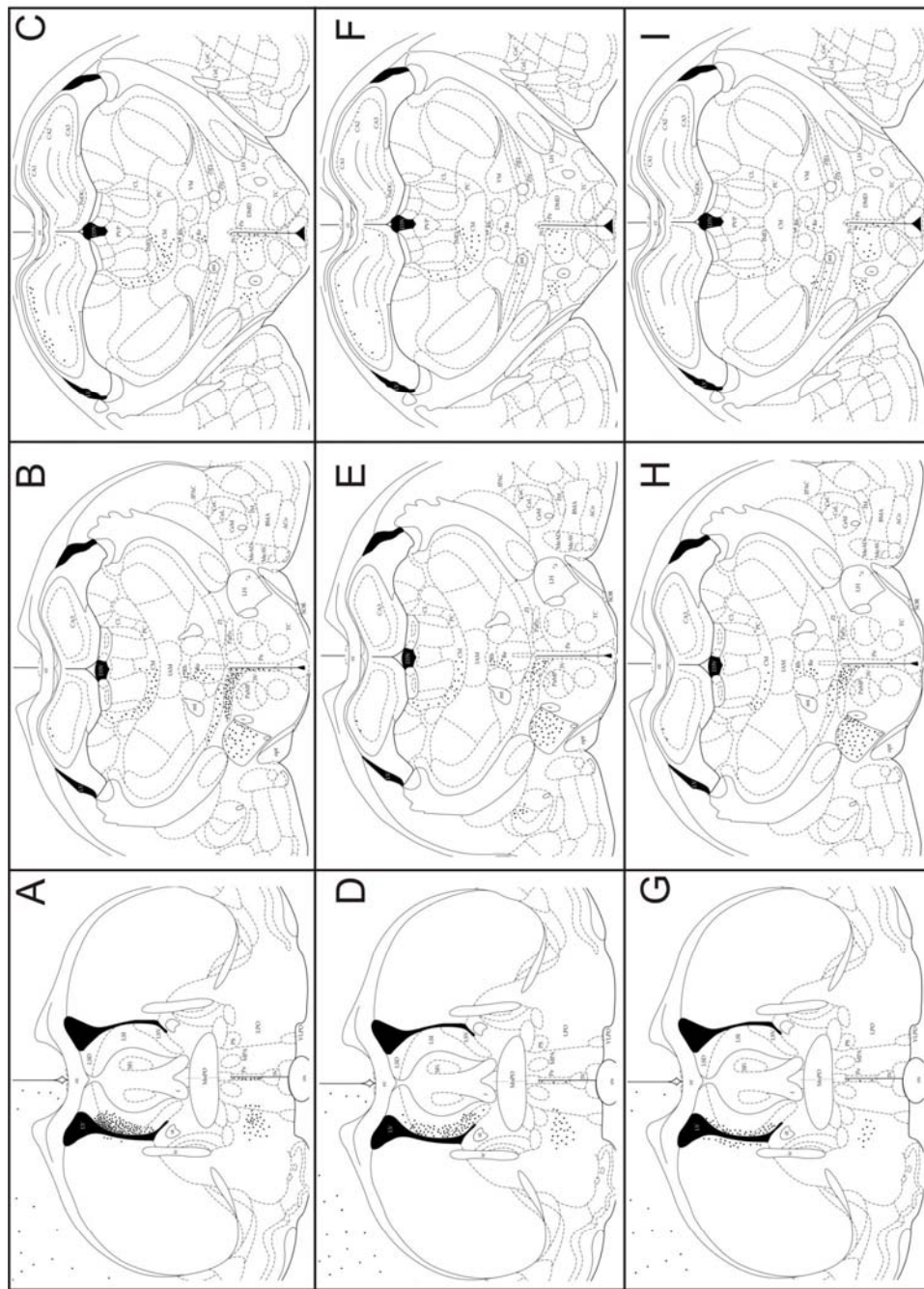


Figura 11 A-H.





**Figura 12:** Esquema comparativo ilustrando áreas que expressaram Fos após administração da 6-hidroxitripargina e da tripargina. A-C: expressão de Fos após administração intracerebroventricular da 6-hidroxitripargina; D-F: expressão de Fos após administração endovenosa da 6-hidroxitripargina G-I: expressão de Fos após administração intracerebroventricular da tripargina. Cada círculo representa a marcação de cinco células. As abreviações encontram-se citadas no início da tese.



---

Algumas duplas-marcações utilizando anticorpo anti-Fos associado a anticorpos contra alguns tipos de receptores ou mesmo neurotransmissores foram empregados com objetivo de se estudar a natureza dos neurônios que expressaram Fos, após a administração da 6-hidrotripargina. Entre os anticorpos testados estão os dos receptores: rGlu<sub>2/3</sub> e NMR<sub>1</sub>, da enzima tirosina hidroxilase e do neurotransmissor orexina. Duplas-marcações foram observadas em quase todos os casos, exceto com a tirosina hidroxilase (Fig. 13A a 13H). Com os experimentos de duplas-marcações Fos/tirosina hidroxilase, pôde-se comprovar que neurônios catecolaminérgicos não expressaram Fos, esse fato foi bem evidenciado pelas reações de imunofluorescência (13C a 13H) que indicaram a ausência de co-localizações de neurônios catecolaminérgicos e núcleos Fos-imunorreativos.

---

**Figura 13:** A não co-localização da proteína Fos e tirosina hidroxilase. Fotomicrografias de campo claro (A e B) e de imunofluorescência (C-H) evidenciando a ausência de duplas-marcações Fos/tirosina hidroxilase. A expressão de Fos (setas preenchidas) é evidenciada nos núcleos dos neurônios e a de tirosina hidroxilase no soma dessas células (setas sem preenchimento). A-H: núcleo paraventricular do hipotálamo. Abreviações: 3V: terceiro ventrículo; PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo. Barra de escala: 50 $\mu$ m em B/ D/ F/ H, 100 $\mu$ m A/ C/ E/ G.

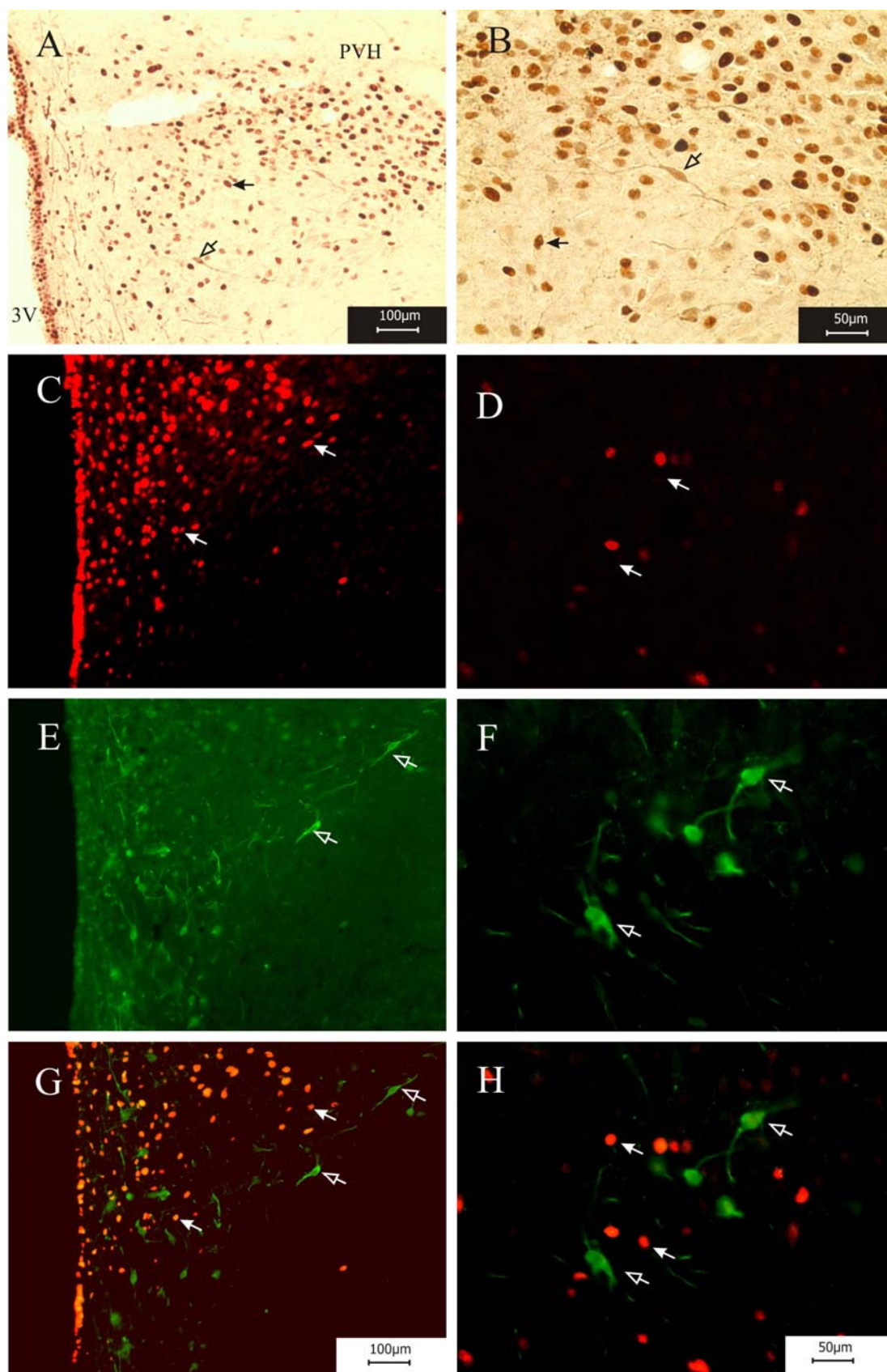


Figura 13 A-H.

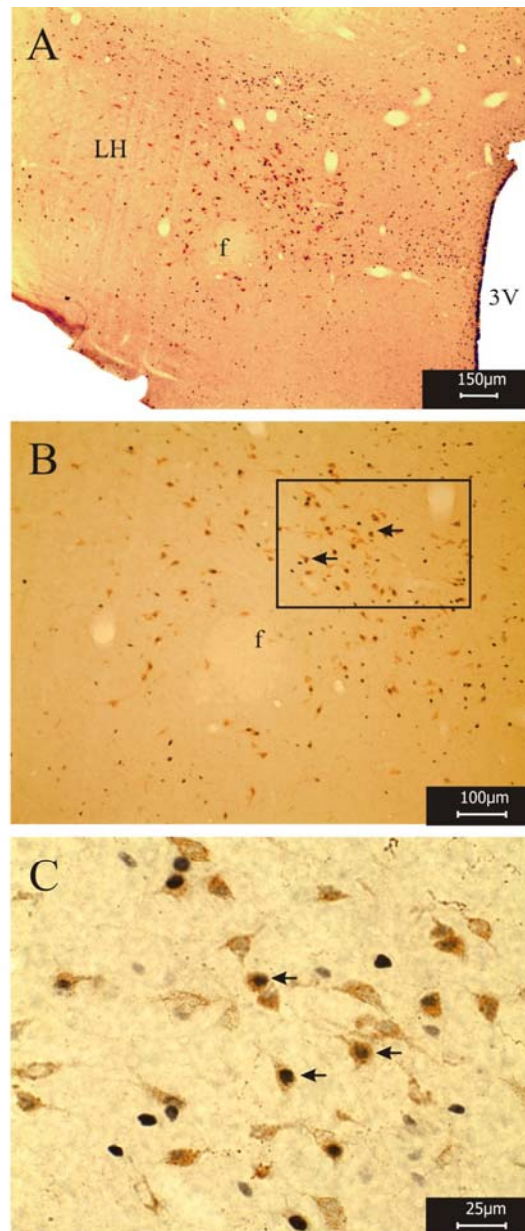
Em todos os outros experimentos com duplas-marcações (Fos/orexina, Fos/NMR<sub>1</sub>, Fos/rGlu<sub>2/3</sub>) foi possível observar uma quantidade significativa de neurônios duplamente marcados (tabela 2) em diferentes regiões cerebrais, que incluem córtex, regiões hipotalâmicas e talâmicas (fig. 14, fig. 15 e fig. 16). Esses resultados evidenciam que o composto 6-hidroxitripargina possui afinidade, a diferentes tipos de neurônios, incluindo os orexinérgicos.

**Tabela 2. Número de neurônios duplamente marcados Fos/NMR<sub>1</sub>, Fos/orexina e Fos/rGlu<sub>2/3</sub>**

% de duplas-marcações	NMR <sub>1</sub> <sup>a</sup>	Orexina <sup>b</sup>	RGlu <sub>2/3</sub> <sup>c</sup>
Fos	53,4%	30,6%	10,2%

As células duplamente marcadas em suas respectivas porcentagens estão representadas acima. Sendo **a** e **c**: contagem de células corticais região S<sub>1</sub> e **b**: contagem de células da área hipotalâmica lateral e dorsal.

A existência de duplas-marcações Fos/orexina ocorreram em cerca de 30% do total de células orexinérgicas (14A a 14C), evidenciando a descoberta de que neurônios orexinérgicos, possam estar de alguma maneira, associados à ação de compostos β-carbolínicos, como a 6-hidroxitripargina. Esses neurônios são encontrados exclusivamente na área hipotalâmica lateral e dorsal, sabe-se que seus axônios projetam-se para muitas outras regiões do sistema nervoso, incluindo ponte, tálamo e córtex cerebral.



**Figura 14:** Co-localização da proteína Fos e orexina. Fotomicrografias de campo claro evidenciando as duplas-marcações Fos / orexina (setas). A expressão de Fos (pontos escuros) é evidenciada nos núcleos dos neurônios e a de orexina no soma dessas células. **A, B e C:** área hipotalâmica lateral. Abreviações: 3V: terceiro ventrículo; f: fórnice; LH: área hipotalâmica lateral. Barra de escala: 25 µm em C, 100 µm em B 150 µm em A. Retângulo indica área com maior aumento visualizada em C.

---

Nas figuras 15A a 15H observam-se as duplas-marcações de Fos/NMR<sub>1</sub> em diferentes regiões do SNC, que incluem área hipotalâmica lateral, região perifornical, núcleo septal lateral, os núcleos talâmicos paracentral, centro medial e centro lateral, zona incerta, hipocampo e córtex sensorial. Cerca de 53% dos neurônios NMR<sub>1</sub> presentes na região S<sub>1</sub> do córtex cerebral expressaram Fos, evidenciando uma possível ação da 6-hidroxitripargina nessas células.

**Figura 15:** Co-localização da proteína Fos e NMR<sub>1</sub>. Fotomicrografias de campo claro evidenciando a presença de duplas-marcações Fos/ NMR<sub>1</sub> (setas). A expressão de Fos (pontos escuros) é evidenciada nos núcleos dos neurônios e a de NMR<sub>1</sub> no soma dessas células. A: área hipotalâmica; B: região perifornical; C: núcleo septal lateral; D: núcleos talâmicos; E e F: hipocampo; G e H: córtex. Abreviações: 3v: terceiro ventrículo; CA1: região CA1 do hipocampo; CL: núcleo centro lateral; CM: núcleo centro medial; f: fórnice; LH: área hipotalâmica lateral; LS: núcleo septal lateral; LV: ventrículo lateral, opt:quiasma óptico; ox: quiasma óptico; PC: núcleo paracentral ;PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo; S1: córtex sensorial; ZI: zona incerta. Barra de escala: 25µm F/ G/ H, 50µm em B, 100µm EM A/ C/ E, 200µm em D.



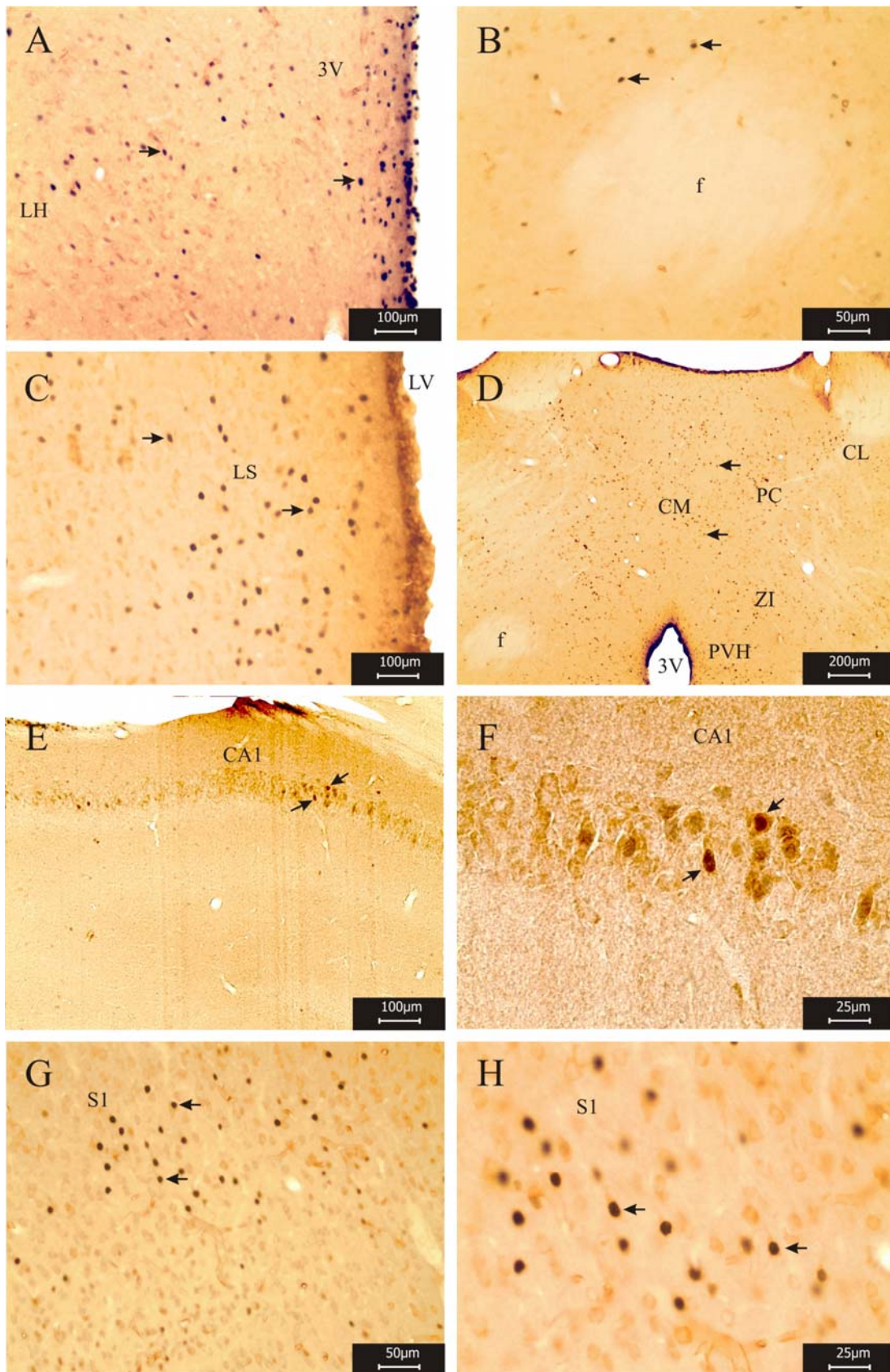
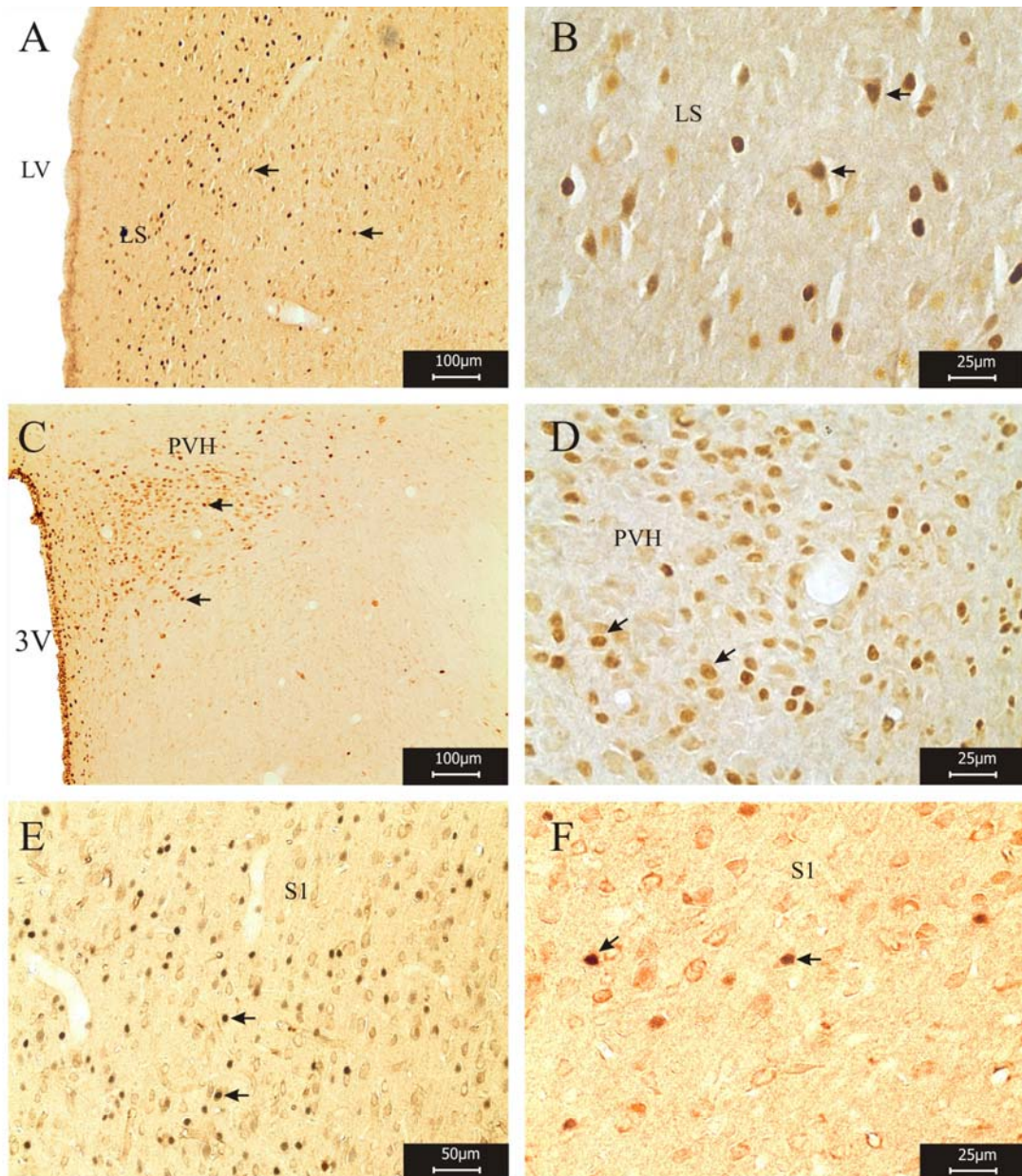


Figura 15 A-H.



---

As duplas-marcações Fos/rGlu<sub>2/3</sub> (fig. 16A a 16F) ocorrem em menor proporção que as observadas nos dois casos anteriores, com cerca de 10% das células corticais da região S<sub>1</sub> duplamente marcadas. Esse fato pode indicar que o composto 6-hidroxitripargina tem ação por diferentes tipos de neurônios, porém verifica-se que essa ação é proporcionalmente diferencial para cada um dos experimentos de duplas-marcações.



**Figura 16:** Co-localização da proteína Fos e rGlu2/3. Fotomicrografias de campo claro evidenciando as duplas-marcações Fos / rGlu2/3 (setas). A expressão de Fos (pontos escuros) é evidenciada nos núcleos dos neurônios e a de rGlu2/3 no soma dessas células. **A e B:** núcleo septal lateral; **C e D:** núcleo paraventricular do hipotálamo; **E e F:** córtex. Abreviações: 3V: terceiro ventrículo; LS: núcleo septal lateral; LV: ventrículo lateral; PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo; S1: córtex sensorial. Barra de escala: 25  $\mu\text{m}$  em B/ D/ F, 50  $\mu\text{m}$  em E, 100  $\mu\text{m}$  em A-C.

## DISCUSSÃO

Durante a padronização da dose de 6-hidroxitripargina a ser administrada de maneira *icv*, o primeiro grupo de animais recebeu o equivalente a 50µg/µl de 6-hidroxitripargina. Decorridos cerca de 5 minutos, após a administração do composto, os ratos apresentaram estado de mal epilético, caracterizado por atividades tônico-clônicas repetidas que perduraram por cerca de 1 hora e 30 minutos. Depois da perfusão desses animais, cortes de seus encéfalos foram estudados por meio de imunohistoquímica e pôde-se observar uma marcação bastante similar às apresentadas nesse trabalho, porém com maior número de células Fos-imunorreativas em regiões do córtex cerebral, tanto sensoriais, quanto motoras. Essa observação comportamental (do mal epilético), juntamente com o estudo da expressão da proteína Fos foram confirmados recentemente por ensaios de eletrofisiologia, que comprovaram a ação da 6-hidroxitripargina como um pró-convulsivante (Capítulo 2).

A 6-hidroxitripargina é pertencente à família das β-carbolinas, alcalóides farmacologicamente ativos caracterizados por suas propriedades hipotensivas, alucinógenas e tremorigênicas (Martin *et al.* 2003). Algumas β-carbolinas foram descritas como substâncias psico-estimulantes, com capacidade de induzir a expressão de genes de rápida transcrição em diferentes regiões do SNC (Singewald *et al.*, 2003). Entre esses genes está o *c-fos* que pode ser induzido por diversos estímulos e tem sido utilizado como uma ferramenta de estudo da ativação neuronal em diferentes sistemas cerebrais (Sagar *et al.*, 1988; Morgan & Curran, 1991). O componente em estudo foi injetado *icv* em ratos Wistar e observou-se a expressão de Fos em diferentes áreas específicas do encéfalo desses roedores. Entre as regiões que apresentaram marcações significativas após a administração da 6-hidroxitripargina, estão: a área hipotalâmica anterior e lateral e área pré-óptica, as regiões perifornical e periventricular, o hipocampo, o núcleo septal lateral, alguns núcleos hipotalâmicos como o núcleo paraventricular e o núcleo dorsomedial. Entre os núcleos talâmicos

---

Fos-imunorreativos a 6-hidroxitripargina estão o reuniens, o central medial, o rombóide, o centro lateral e o paracentral.

A 6-hidroxitripargina também foi administrada de modo *ev* e observou-se um padrão de marcação similar ao encontrado nos experimentos de injeção *icv*. Devido à grande semelhança das marcações encontradas nos dois tratamentos *icv* e *ev*, pode-se inferir que esse alcalóide é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, como já descrito para outras  $\beta$ -carbolinas (Back & Segel, 1977; Leino *et al.*, 1984; Krause & Mengel, 1990) e tem ação preferencial pelas regiões anteriormente descritas.

Ensaio realizado com a N-metil- $\beta$ -carbolina-3-carboxamida (FG-7142) evidenciaram a marcação de 28 regiões Fos-imunorreativas, algumas dessas relacionadas ao efeito ansiogênico da droga (Singewald, *et al.*, 2003). Entre as regiões ansiogênicas descritas encontram-se o córtex pré-frontal, o núcleo paraventricular do hipotálamo e a área septo lateral que também apresentaram marcação após a administração da 6-hidroxitripargina.

Entre as áreas relacionadas à ansiedade, destaca-se o núcleo central da amígdala (Hinks *et al.*, 1996). Esse núcleo é o responsável pela disseminação de informações relacionadas à ansiedade e medo, por meio de projeções eferentes (Saper, 1995). O núcleo central da amígdala encontra-se inter-relacionado neuroanatomicamente e funcionalmente ao septo lateral, ao núcleo paraventricular do hipotálamo e ao córtex pré-frontal, áreas diretamente envolvidas nas vias neurais de ansiedade (Herman & Cullinan, 1997). A ativação do núcleo septo lateral pode suprimir respostas a estímulos emocionais adversos, sendo alvo para tratamentos de problemas relacionados à ansiedade (Thomas, 1988). O núcleo paraventricular promove a liberação de uma variedade de hormônios que estão envolvidos nas respostas neuroendócrinas e autonômicas relacionadas ao medo e ao estresse psicológico (van de Kar & Blair, 1999). O córtex pré-frontal, incluindo o pré-límbico e o infra-límbico, é descrito por influenciar no controle de comportamento de ansiedade e medo, de modo a induzir ou inibir essas ações em resposta a uma determinada ação ansiolítica (Espejo, 1997; Jinks & McGregor, 1997). A modulação de reações autonômicas durante o estresse e a ansiedade são conferidas particularmente ao córtex pré-frontal

---

ventromedial (Jinks & McGregor, 1997). Outra área que parece estar relacionada ao controle vascular em casos de ansiedade e medo é a área hipotalâmica lateral (Singewald *et al.*, 2003).

Nos experimentos *icv*, o composto 6-hidroxitripargina induziu a expressão de Fos, em áreas relacionadas à ansiedade (núcleo septal lateral, núcleo paraventricular do hipotálamo, córtex cerebral, hipotálamo lateral), porém não se observou marcação na região da amígdala, principal alvo de drogas ansiogênicas. A amígdala, bem como outras regiões mais distais ao local da injeção *icv* da 6-hidroxitripargina (terceiro ventrículo), não foram marcadas pela expressão de Fos, talvez por uma difusão ineficiente da droga para essas regiões. O experimento *ev*, por sua vez evidenciou marcações em alguns núcleos amigdalóides, entre eles o central da amígdala; porém é necessária a realização de outros experimentos que possam confirmar esses dados.

Adell *et al.* (1996) descreveram a ação de duas  $\beta$ -carbolinas no sistema de termorregulação de mamíferos. Segundo esse autores, a administração sistêmica dessas  $\beta$ -carbolinas induz hipotermia em ratos, possivelmente por promover a liberação de 5-hidroxitriptamina (5HT) extracelular no interior da área pré-óptica. Essa região é a responsável pelo mecanismo central de regulação da temperatura (Myers, 1981; Harikai *et al.*, 2003). O evento de hipotermia possivelmente esteja associado à inibição da enzima MAO-A (Adell *et al.*, 1996). Em nosso experimento a região pré-óptica também apresentou a expressão de Fos, podendo-se inferir uma possível ação da 6-hidroxitripargina no mecanismo termorregulatório dos animais.

Grupamentos de neurônios termo-sensíveis também são encontrados no tálamo e na zona incerta (Baffi & Palkovits, 2000). Segundo esses autores, alguns núcleos como os da linha média do tálamo, o núcleo dorsomedial do hipotálamo e os núcleos parabraqial lateral e supramamilar apresentaram marcação de Fos após a exposição a estímulos de estresse induzido pelo frio. A zona incerta, o núcleo dorsomedial do hipotálamo e alguns núcleos da linha média do tálamo apresentaram a proteína Fos após a administração da 6-hidroxitripargina. A zona incerta é um centro de

geração de respostas diretas a estímulos recebidos do meio. Ela está relacionada a comportamentos que exigem alerta, atenção, controle visceral, locomoção e postura do animal, além de estar associada a termorregulação e ao estresse causado por baixas temperaturas (Mitrofanis, 2005). O núcleo dorsomedial do hipotálamo, por sua vez, está relacionado regulação de comportamentos alimentares, esse núcleo emite projeções para muitas áreas do hipotálamo, incluindo para o núcleo paraventricular, que é responsável pela secreção da corticosterona (Thompson & Swanson, 1998). Essas regiões marcadas, juntamente com a área pré-óptica, possivelmente sejam alvo de uma provável ação hipotérmica da 6-hidroxitripargina.

Os núcleos talâmicos que expressaram Fos, após a administração da 6-hidroxitripargina, estão funcionalmente relacionados a atividades do córtex cerebral. Cada núcleo parece ter uma atuação específica por áreas bem definidas do córtex sensorial, ou motor (Price, 1995). Os núcleos centrolateral e o paracentral e os núcleos centro medial e reuniens são denominados de núcleos da linha média e intralaminares respectivamente, pois se encontram agrupados ao espaço limitado pela lâmina medular interna e suas eferências projetam-se para o *striatum* (núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens e tubérculo olfatório), córtex cerebral (Jones & Leavitt, 1974) e amígdala (Turner & Herkenham, 1991). Recebem uma complexa gama de aferências de muitas áreas sensoriais (Price, 1995).

Esses núcleos da linha média do tálamo recebem estímulos de diferentes estruturas, como do hipotálamo (especialmente da área pré-óptica e hipotálamo medial), do núcleo septal lateral, do núcleo da estria terminal, do subiculum ventral e do córtex perirrinal (Cornwall & Phillipson, 1988) e talvez da amígdala (Price & Amaral, 1981). Acredita-se que possivelmente exista uma conexão entre esses núcleos talâmicos e a amígdala e que projeções sensoriais referentes ao medo e a outras respostas afetivas possam ser transmitidas por um modelo de projeções tálamo-cortical-amigdalóide (Price, 1995).

Um alcalóide do grupo indol, denominado ibogaina, da mesma natureza química da 6-hidroxitripargina, quando injetado *icv*, permitiu a observação de áreas Fos-reativas nas regiões do córtex frontal, área septal,

incluindo o núcleo septal lateral, caudado-putamen e hipocampo (Ali *et al.*, 1999). O padrão de ação da 6-hidroxitripargina também evidenciou uma marcação significativa no núcleo septal lateral, córtex e hipocampo. Segundo Ali *et al.* (1999), a expressão de Fos nessas regiões sugere uma possível mudança na neurotransmissão monoaminérgica, resultante de um aumento da neurotransmissão dopaminérgica e/ou serotoninérgica que poderiam estar correlacionadas a mudanças comportamentais.

O hipocampo tem sido hipotetizado por ter um papel no tônus basal do eixo HPA (hipotalâmico-hipófise-adrenal) e na magnitude e duração das respostas ao estresse, podendo estar associado a respostas neuroendócrinas (Yang, 2000). A marcação da região hipocampal também foi significativa nos animais que receberam a 6-hidroxitripargina, corroborando a hipótese de que essa  $\beta$ -carbolina esteja agindo de maneira a estimular regiões relacionadas principalmente ao estresse.

Pode-se inferir que de alguma forma esse composto  $\beta$ -carbolínico foi capaz de ativar áreas do hipotálamo, córtex cerebral e tálamo provavelmente relacionadas à ansiedade e ao estresse, o que é perfeitamente justificável levando-se em conta a natureza química do componente em estudo.

Pelo fato da tripargina ser um composto análogo à 6-hidroxitripargina e por ter seus mecanismos de ação estudados e descritos na literatura, procurou-se traçar um padrão comparativo entre as marcações com a proteína Fos para cada uma dessas drogas. Os dois compostos apresentam um padrão de marcação muito semelhante (principalmente nas áreas hipotalâmicas), sendo a marcação observada nos animais tratados com 6-hidroxitripargina mais intensa em determinadas regiões, como no núcleo paraventricular do hipotálamo e em núcleos talâmicos. Estudos realizados por Nistico *et al.* (1987) já descreviam dois compostos derivados da tripargina (5-metoxitripargina e 5-hidroxitripargina) com ações farmacológicas mais efetivas que as da própria molécula padrão. Essa maior marcação de Fos apresentada pela 6-hidroxitripargina talvez possa indicar que esse análogo seja mais efetivo que a própria tripargina, o que justificaria a observação de marcações mais intensas. Essas pequenas modificações estruturais, encontradas na maioria dos compostos químicos, como a

substituição de uma molécula de hidrogênio por uma hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), ou mesmo por um radical metila ( $\text{CH}^3$ ), são comumente encontradas na natureza, sendo uma maneira eficiente de se potencializar uma determinada ação das substâncias, sem grandes gastos para os organismos. O padrão similar de marcação, associado à semelhança estrutural da tripargina e da 6-hidroxitripargina pode indicar que esse composto possa ter os mesmos padrões de ação daquele, agindo preferencialmente sobre canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$ .

Os compostos  $\beta$ -carbolínicos possuem grande capacidade de se ligarem a diferentes tipos de receptores, devido à grande semelhança de seu grupamento indol, com a molécula de serotonina (Solis-Maldonado *et al.*, 2003). Por essa razão, alguns experimentos com duplas-marcações foram realizados com objetivo de reconhecer alguns dos tipos de neurônios que estariam expressando Fos após a administração *icv* da 6-hidroxitripargina. A primeira reação de dupla-marcação foi feita com o anticorpo para enzima tirosina-hidroxilase (TH), que está envolvida na síntese de catecolaminas do SNC. Embora saiba-se que as  $\beta$ -carbolinas estejam relacionadas ao metabolismo de várias aminas endógenas, por meio da inibição da MAO, o que pode ser observado é que nenhuma das células que expressaram Fos pertencia ao sistema catecolaminérgico, visto que não foi identificada nenhuma dupla marcação Fos/TH.

Baffi & Palkovits (2000) estudaram o estresse causado em ratos, por baixas temperaturas e a possível relação dos neurônios que expressaram Fos com o sistema catecolaminérgico. Para isso duplas-marcações Fos/tirosina-hidroxilase foram realizadas e nenhuma célula duplamente marcada foi observada, levando os autores a concluir que existem outros sistemas efetores importantes na manutenção da homeostase durante o estresse causado pelo frio. Esse trabalho corrobora nossos resultados, pois muito provavelmente a  $\beta$ -carbolina em estudo, possa estar agindo por um mecanismo de ação similar ao observado por Baffi & Palkovits (2000), o que parece bastante lógico se observarmos que muitos compostos alcalóides do tipo  $\beta$ -carbolínicos possuem ação hipotérmica descritas para ratos. Ou seja, no experimento acima descrito, os pesquisadores causaram um estresse por



frio, por meio da diminuição da temperatura externa do ambiente; em nosso experimento, a 6-hidroxitripargina pode ter causado um efeito semelhante por meio de uma possível ação hipotérmica desse composto.

As duplas-marcações para receptores de glutamato NMDA que expressam NMR<sub>1</sub> foram expressivas (cerca de 53% das células corticais da região S<sub>1</sub> apresentaram-se duplamente marcadas) enquanto que para os receptores do tipo AMPA que expressam rGlu<sub>2/3</sub> representaram pouco mais que 10% do total dessas células corticais. Esses resultados evidenciaram que essa  $\beta$ -carbolina realmente não possui uma afinidade específica a somente um determinado tipo de neurônio. Os receptores de glutamato do tipo AMPA e NMDA são pertencentes a família dos receptores ionotrópicos. Ambos por estarem inseridos no próprio canal iônico, atuam diretamente na abertura do mesmo, promovendo influxo de íons Na<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup> (Hwa & Avoli, 1992). Essas duplas marcações de Fos e neurônios NMR1 e Fos neurônios rGlu<sub>2/3</sub> sugerem, que assim como a tripargina e outras toxinas de aranhas, a 6-hidroxitripargina possa ter ação em canais catiônicos de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup>. Os receptores do tipo NMDA possuem funções importantes relacionadas ao estado convulsivo e ao aprendizado por repetição (Stone, 1995), a expressão de Fos em neurônios NMR<sub>1</sub> possivelmente esteja relacionada as propriedades epileptogênicas dessa  $\beta$ -carbolina (Capítulo 2).

Outro experimento está relacionado às duplas marcações Fos/orexina, que se apresentaram em aproximadamente 30% das células encontradas na área hipotalâmica lateral e dorsal e evidenciaram uma possível ativação de neurônios orexinérgicos após a administração da 6-hidroxitripargina. Os neurônios orexinérgicos embora sejam encontrados somente na área hipotalâmica lateral e dorsal, no núcleo perifornical e no núcleo dorsomedial do hipotálamo possuem projeções que são amplamente distribuídas para regiões do hipotálamo, córtex, ponte e tálamo, entre outras regiões do SNC (Peyron *et al.*, 1998). Segundo esses autores, essa distribuição de fibras sugere que os neurônios orexinérgicos possam estar envolvidos na regulação do comportamento alimentar, da pressão sangüínea, da liberação hormonal, da temperatura e do comportamento de alerta. Existem evidências que neurônios orexinérgicos possam estar

---

envolvidos na ativação do eixo HPA pelo estresse (Kuru *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.* 2004).

A diversidade de ligação dos compostos  $\beta$ -carbólicos poderia contribuir para seu amplo espectro de efeitos farmacológicos, que incluem efeitos alucinógenos quando agem sobre receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> (Lutes *et al.*, 1988; Ruiz-Durántez *et al.*, 2001) e com propriedades tremorigênicas, ansiogênicas e/ou ansiolíticas, quando atuam em receptores benzodiazepínicos (Glennon *et al.*, 2000). Sabe-se também que as  $\beta$ -carbólicas induzem efeitos de hipotermia através do aumento dos níveis de 5-hidroxitriptamina após a inibição da MAO (Adell *et al.*, 1996) e efeitos vasorrelaxantes pela liberação de óxido nítrico (NO) de células epiteliais (Shi *et al.*, 2000; Ruiz-Durántez *et al.*, 2001).

A 6-hidroxitripargina age sobre receptores do tipo NMDA, como observado nos experimentos de duplas-marcações, por meio da expressão da proteína Fos e confirmado pela ação epileptogênica desse composto em neurônios dessa natureza. Embora não existam ainda experimentos comprobatórios, é possível que a 6-hidroxitripargina possa agir também em receptores benzodiazepínicos, pois esses são encontrados com grande frequência em neurônios corticais, possuem sítio de ligação para  $\beta$ -carbólicas e também estão relacionados a reações tremorigênicas, como as observadas em experimentos preliminares *in vivo* de padronização da técnica.

## CONCLUSÕES

Após a realização desses experimentos de mapeamento da ação da 6-hidroxitripargina no encéfalo de ratos, pode-se concluir que:

1- assim como outros compostos dessa natureza química, a 6-hidroxitripargina, caracteriza-se como um alcalóide neuroativo em mamíferos.

2- essa  $\beta$ -carbolina apresenta ação em diferentes regiões do SNC, que incluem o córtex sensorial e motor, o hipocampo, algumas regiões hipotalâmicas e talâmicas.

3- por meio dos experimentos de duplas-marcações foi possível elucidar a ação dessa  $\beta$ -carbolina em diferentes tipos de neurônios, que compreendem os do tipo NMR<sub>1</sub> (NMDA), os do tipo rGlu<sub>2/3</sub> (AMPA) e os orexinérgicos.

4- neurônios do sistema catecolaminérgico não são ativados pela 6-hidroxitripargina.

5- pela ação desse composto no SNC é possível que a 6-hidroxitripargina esteja agindo na via ansiolítica e também em regiões relacionadas à ativação do eixo HPA.

---

## REFERÊNCIAS

- 1-Adell, A.; Biggs, T.A., Myers, R.D. Action of harman (1-methyl- $\beta$ -carboline) on the brain: Body temperature and in vivo efflux of 5-HT from hippocampus of the rat. *Neuropharmacol.* 1996, 35, 1101-1107.
- 2-Airaksinen, M.M.; Lecklin, A.; Saano, V.; Tuomisto, L.; Gynther, J. Tremorogenic effect and inhibition of tryptamine and serotonin receptor binding by  $\beta$ -carbolines. *Pharmacol. Toxicol.* 1987, 60, 5-8.
- 3-Ali, S.F.; Thiriet, N.; Zwiller, J. Acute ibogaine injection induces expression of the immediate early gene, *erg-1* and *c-fos*, in mouse brain. *Mol. Brain Research.* 1999, 74, 237-241.
- 4-Akizawa, T.; Yamazaki, K.; Yasuhara, T.; Nakajima, T.; Roseghini, M.; Erspamer, G.F.; Espramer, Trypargine, a new tetrahydro- $\beta$ -carboline of animal origin: Isolation and chemical characterization from the skin of the African rhacophorid frog, *Kassina senegalensis*. *M. Biomedical Research.* 1982, 3, 232-234.
- 5-Baffi, J.S, & Palkovits, M. Fine topography of brain areas activated by cold stress. A fos immunohistochemical study in rats. *Neuroendocrinology.* 2000, 72 (2), 102-113.
- 6-Back, G. & Seidel, G. Harmine action in rats with lymphostatic encephalopathy. *Pharmacology.* 1977, 15 (2), 127-133.
- 7-Beck, C.H. & Fibiger, H.C. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene *c-fos*: with and without diazepam pretreatment. *J. Neurosci.* 1995, 15, 709-720.
- 8-Carreras, L. & Alonso, M.G. Separation of the major alkaloids of *Peganum harmala* by high voltage ionophoresis. *J. Chromatogr.* 1967, 29, 388-390.
- 9-Cesar, L.M.M. Caracterização da estrutura molecular e da toxicidade das  $\beta$ -carbolinotoxinas da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* (Araneae: Araneidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro – SP, Brazil, 2000, p. 67.
- 10-Cesar, L.M.M.; Tormena, C.F.; Marques, M.R.; Silva, G.V.J.; Mendes, M.A.; Palma, M.S. Structure Determination of Hydroxytrypargine: A

- 
- Tetrahydro- $\beta$ -carboline Toxin From the Venom of the Spider *Parawixia bistrata*. *Helvetica Chimica Acta*. 2005, 88,00 (*in press*).
- 11-Cornwall, J. & Phillipson, O.T. Afferent projections to the dorsal thalamus of the rat as shown by retrograde lectin transport. I. The mediodorsal nucleus. *Neurosciense*. 1988, 24, 1035-1049.
- 12-Espejo, E.F. Selective dopamine depletion within the medial prefrontal cortex induces anxiogenic-like effects in rats placed on the elevated plus maze. *Brain Res*. 1997, 762, 281-284.
- 13-Gerfen, C.R. & Sawchenko, P.E. An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localizations of an axonally transported plantlectin *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *Brain Res*. 1984, 290, 219-238.
- 14-Glennon, R.A.; Dukat, M.; Grella, B.; Hong, S.; Contantino, L.; Teitler, M.; Smith, C.; Ergan, C.; Davis, K.; Mattson, M.V. Binding of  $\beta$ -carbolines and related agents at serotonin (5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub>), dopamine (D<sub>2</sub>) and benzodiazepine receptors. *Drug Alcohol Depend*. 2000, 60, 121-132.
- 15-Harikai, N.; Tomogane, K.; Sugawara, T.; Tashiro, S. Differences in hypothalamic Fos expression between two heat stress conditions in conscious mice. *Brain Res. Bull*. 2003, 61 (6), 617-626.
- 16-Herman, J.P. & Cullinan, W.E. Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *TINS*. 1997, 20, 78-84.
- 17-Hinks, G.L.; Brown, P.; Field, M.; Poat, J.A.; Hughes, J. The anxiolytics CI-988 and chlordiazepoxide fail to reduce immediate early gene mRNA stimulation following exposure to the rat elevated X-maze. *Eur. J. Pharmacol*. 1996, 312, 153-161.
- 18-Husbands, S.M.; Glennon, R.A.; Gorgeat, S.; Gough, R.; Tyacke, R.; Corsby, J.; Nutt, D.J.; Lewis, J.W.; Hudson, A.L. Beta-carboline binding to imidazoline receptors. *Drug Alcohol Depend*. 2001, 64, 203.
- 19-Hwa, G.G. & Avoli, M. Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA and non-NMDA receptors in the superficial/middle layers of

- 
- thye epileptogenic human neocortex maintained *in vitro*. *Neuroscience Lett*. 1992, 143, 83-86.
- 20-Jinks, A.L. & McGregor, I.S. Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res*. 1997, 772, 181-190.
- 21-Jones, E.G. & Leavitt, R.Y. Retrograde axonal transport and the demonstration of non-specific projections to the cerebral cortex and striatum from thalamic intralaminar nuclei in the rat, cat and monkey. *J. Comp. Neurol*. 1974, 154, 349-378.
- 22-Kari, I.; Peura, P.; Airaksinen, M. M. Mass fragmentographic determination of tetrahydro-beta-carboline in human blood platelets and plasma. *Med. Biology*. 1979, 57 (6), 412-414.
- 23-Kawai, H.; Miwa, A.; Abe, T. Spider venom contains specific receptor blocker of glutaminergic synapses. *Brain Research*. 1982, 247, 169-171.
- 24-Krause, W. & Mengel, H. Pharmacokinetics of the anxiolytic beta-carboline derivate abecarnil in the mouse, rat, rabbit, dog, cynomolgus monkey and baboon. Studies on species differences. *Arzneimittelforschung*. 1990, 40, 522-529.
- 25-Kuru, M. Ueta, Y.; Serino, R.; Nakazato, M.; Yamamoto, Y.; Shibuya, I.; Yamashita, H. Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport*. 2000, 11 (9), 1977-1980.
- 26-Leino, M.; Airaksinen, M.M.; Antikainen, R.; Gynther, J.; Kari, E.; Kari, I.; Peura, P. Distribution of 1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline and 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline in mice. *Acta Pharmacol. Toxicol (Copenh)*. 1984, 54, 361-371.
- 27-Lino de Oliveira, C.; Sales, A.J.; Del Bel, E.A.; Silveira, M.C.L.; Guimarães, F.S. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. *Brain Res. Bull*. 2001, 55 (6), 747-754.
- 28-Lutes, J.; Lorden, J.F.; Beales, M.; Lotmans, G.A. Tolerance to the tremorogenic effects of harmaline: evidence for altered olivo-cerebellar function. *Neuropharmacology*. 1988, 27, 849-855.

- 
- 29-Martin, L.; Léon, A.; Martin, M.A.; del Castilho, B.; Menédez, J.C. Detection and characterization of cyclodextrin complexes with  $\beta$ -carboline derivates by spectroscopic techniques. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2003; 32, 991-1001.
- 30-McCormick, J.; McCormick, K.; Duynstee, H.I.; van Engen, A.K.; van der Marel, G.A.; Ganem, B.; van Boon, J.H. Structure and total synthesis of HF-7, a neuroactive glyconucleoside disulfate from funnel-web spider *Hololena curta*. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 5661-5665.
- 31-Mitrofanis, J. Some certainty for the "zone of uncertainty"? Exploring the function of the zona incerta. *Neuroscience*. 2005, 130, 1, 1-15.
- 32-Morgan, J.I. & Curran, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Ann. Rev. Neurosci.* 1991, 14, 421-451.
- 33-Müller, W.E.; Fehske, K.J.; Borbe, H.O.; Wollert, U.; Nanz, C.; Rommelspacher, H. On the neuropharmacology of harmaline and other  $\beta$ -carbolines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1981, 14, 693-699.
- 34-Myers R.D. Serotonin and thermoregulation: old and new views. *Physiol (Paris)*. 1981, 77 (2-3), 505-513.
- 35-Nielsen, E.B.; White, F.J., Holohean, A.M.; Callahan, P.M.; Appel, J.B. Behavioral and biochemical evidence for serotonergic actions of tetrahydro-beta-carbolines. *Life Science*. 1982, 31, 2433-2439.
- 36-Nistico, G.; De Sarro, G. B.; Langer, S. Z. Behavioural and electrocortical power spectrum effects of 5-methoxytryptoline and other analogs after intraventricular administration in rats. *Eur. J. Pharmacology*. 1987, 142 (1), 121-128.
- 37- Palma, M.S.; Itagaki, Y.; Fujita, T; Hisada, M. Naoki, H.; Nakajima, N. T. Mass spectrometric structure determination of spider toxins: Arginine-containing acylpolyamines from venoms of Brazilian garden spider *Nephilengys cruentata*. *Natural Toxins*. 1997, 5, 47-57.
- 38 Paxinos, G. & Watson, C. The Rat Brain in stereotaxic coordinates. 3 ed. Academic Press, Sidney- Australia, 1998.

- 
- 39-Peura, P.; Johnson, J.V.; Yost, R.A.; Faull, K.F. J. Concentrations of triptoline and methtryptoline in rat brain. *Neurochemical*. 1989, 52, 847-852.
- 40- Peyron, C.; Tighe, D.K.; van del Pol, A.N.; Lecea, L.; Heller, H.C.; Sutcliffe, J.G.; Kilduff, T. Neurons containing Hypocretin (Orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci*. 1998, 18 (23), 9996-10015.
- 41-Price, J.L. & Amaral, D.G. An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. *J. Neurosci*. 1980, 1, 1242-1259.
- 42-Price, J.L. Thalamus. In: *The Rat Nervous System*. (G. Paxinos, Ed.) Academic Press, Sidney - Australia. 1995, 629-648.
- 43-Rommelspacher, H.; Schimidt, L.G; May, T. Plasma norharmane ( $\beta$ -carboline) levels are elevated in chronic alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 1991, 15, 533-539.
- 44-Ruiz-Durántez, E.; Ruiz-Ortega, J.A.; Pineda, J; Ugedo, L. stimulatory effect of harmane and other  $\beta$ -carboline on lócus coeruleus neurons in anaesthetized rats. *Neurosc. Lett*. 2001, 308, 197-200.
- 45-Sagar, S.M.; Sharp, F.R.; Curran, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*. 1988, 240, 1328-1331.
- 46-Sakamoto, F.; Yamada, S.; Ueta, Y. Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing-factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons. *Regul. Pept*. 2004, 118, 183-191.
- 47-Saper, C.B. Central autonomic system. In: *The Rat Nervous System*. (G. Paxinos, Ed.) Academic Press, Sidney - Australia. 1994.
- 48-Seyama, I.; Yakehiro, M.; Nakajima, T. Tripargine blocks the sodium channels only from the inside of squid giant axon. *Jpn. J. Physiology*. 1985, 35 (2), 367-373.
- 49-Shimizu, M.; Ishikawa, M.; Komoda, Y.; Nakajima, M. Total synthesis of (-) Trypargine. *Chem. Pharm. Bull*. 1982, 30, 909-913.



- 
- 50-Shi, C.C.; Chen, S.Y.; Wang, G.J.; Liao, J.F.; Chen, C. F. Vasorelaxant effect of harman. *Eur. J. Pharmacol.* 2000, 3, 319-325.
- 51-Shu, S.; Ju, G.; Fan, L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci. Lett.*, 1988, 85, 169-171.
- 52-Simerly, R. B. Anatomical Substrates of Hypothalamic Integration. In: *The Rat Nervous System.* (G. Paxinos, Ed.) Academic Press, Sidney - Australia. 1995, 353-376.
- 53-Singewald, N.; Salchner, P.; Sharp, T. Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biol. Psychiatry.* 2003, 15, 53, 275-283.
- 53-Sita, L.V.; Elias, C.F.; Bittencourt, J.C. Dopamine and melanin-concentrating hormone neurons are distinct populations in the rat rostromedial zona incerta. *Brain Res.* 2003, 970, 232-237.
- 55-Solis-Maldonado, C.; Quintanilla-Licea, R.; Tamez-Guerra, R.; Rodriguez-Padilla, C.; Gomez-Flores, R. Differential effects of synthetic indoloquinolizines on in vitro rat lymphocytes and macrophage functions. *International Immunopharmacol.* 2003, 3, 1261-1271.
- 56-Stone, T.W. *Neuropharmacology.* 1° Ed. W.H. Freeman Spektrum Editory. Oxford - New York. 1995, 140 pp.
- 57-Thomas, E. Forebrain mechanisms in the relief of fear: The role of the lateral septum. *Psychobiol.* 1988, 16, 34-44.
- 58-Thompson, R.H. & Swanson, L.W. Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Res. Rev.* 1998, 27,2, 89-118.
- 59-Turner, B.H. & Herkenham, M. Thalamoamygdaloid projections in the rat: A test of the amygdala's role in sensory processing. *J. Comp. Neurol.* 1991, 313, 295-325.
- 60-van de Kar, L.D. & Blair, M.L. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol.* 1999, 20, 426-430.

61-Wagoner, R. M. V.; Jompa, J.; Tahir, A.; Ireland, C. M. Tripargine alkaloids from a previously undescribed *Eudistoma* sp. Ascidian. *J. Nat. Products*. 1999, 62, 794-797.

62-Yang, Q. Central control of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis for stress response. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. 2000, 31 (3), 222-226.

---

## **Capítulo II**

### **Efeito da Toxina 6-Hidroxitripargina em Neurônios Hipocampais de Ratos Wistar**

---

---

## RESUMO

---

A 6-hidroxitripargina é uma  $\beta$ -carbolina isolada da peçonha da aranha *Parawixia bistriata*. As  $\beta$ -carbolinas são alcalóides caracterizados como inibidores reversíveis da enzima monoamino-oxidase (MAO), com propriedades alucinógenas, tremorigênicas e ansiolíticas comprovadas. Muitos dos compostos  $\beta$ -carbolínicos são encontrados em plantas e utilizados na preparação de uma bebida alucinógena por muitas tribos indígenas da América do Sul.

Nas peçonhas de aranhas existem muitos compostos de baixas massas moleculares, porém a 6-hidroxitripargina é a primeira  $\beta$ -carbolina a ser descrita nesse grupo. O mapeamento da ação desse composto em encéfalo de ratos evidenciou a expressão da proteína Fos no hipotálamo, tálamo, hipocampo e córtex. No presente trabalho objetivou-se estudar a ação da 6-hidroxitripargina na atividade epileptiforme de neurônios hipocampais de ratos, sendo ensaiada a atividade dessa toxina isoladamente e também associada ao modelo de epilepsia causado pela ausência de íons magnésio na preparação.

Para os ensaios foram utilizados oito ratos Wistar machos com peso aproximado de 200g. Esses animais foram anestesiados, decapitados e seus encéfalos foram submetidos a cortes coronais de 400 $\mu$ m de espessura para a retirada das “fatias” hipocampais. Para indução da atividade epileptiforme nas fatias hipocampais foi utilizada a aplicação da 6-hidroxitripargina por ejeção ou perfusão em Ringer normal e também o modelo da perfusão com Ringer sem magnésio. A indução da atividade epileptiforme foi observada para o modelo de perfusão com Ringer normal e administração da 6-hidroxitripargina. Nos experimentos de perfusão com Ringer sem magnésio, após a indução da atividade epileptiforme causada por esse modelo, a 6-hidroxitripargina foi administrada e essa não foi capaz de bloquear as descargas epileptiformes induzidas, confirmando sua ação de composto epileptogênico.

---

---

## ABSTRACT

---

The 6-hydroxytryptargine is a  $\beta$ -carboline isolated from the venom of the spider *Parawixia bistrata*. The  $\beta$ -carbolines are alkaloids characterized as reversible inhibitors of the monoamine-oxidase enzyme (MAO), with hallucinogenic, tremorigenic and anxyolytic properties studied. A lot of  $\beta$ -carbolines compounds are find in plants and used in the preparation of the alucinogen drinks of many Indian people of the South American.

The spider venoms have many compounds of lower molecular mass, but the 6-hydroxytryptargine is the first one to be described in this group. The mapping of the action of this coumpound in the brain of rats showed the expression of the Fos protein in the hypothalamus, thalamus, hippocampus and cortex. In the present work the action of the 6-hydroxytripargine was studied in the epileptiform activity of hippocampal neurons, being tested the isolsted activity of this toxin and after, its activity associated to the epileptic model for omission of the magnesium.

Eight male rats Wistar weighting 200g were used in the experiments. The animals were anaesthetized, decapitated and their encephalons were cut coronally into 400  $\mu$ m thick sections. The hippocampal slices were isolated. For inducting of the epileptic activity of the isolated hippocampal tissues, was used the perfusion model normal Ringer with application of 6-hidroxitripargine. A free magnesium Ringer model was used as well. In the perfusion experiments with normal Ringer, 6-hidroxitripargine was administrated by perfusion and ejection, showing epileptic activity after its administration. In the free magnesium Ringer experiments, 6-hidroxitripargine was not be able to block the crisis after inducting the epileptic acticity. Its confirm its action as a epileptogenic compound.

---

## INTRODUÇÃO

A grande maioria das aranhas possui substâncias neuroativas em suas peçonhas (Hagiwara *et al.*, 1991) que se caracterizam pela notável especificidade e afinidade de ligação em receptores e canais iônicos neuronais (Usherwood, 1994). Durante a captura de presas, a aranha utiliza-se de neurotoxinas capazes de causar paralisia preferencialmente por meio da ação sobre as junções neuromusculares da mesma. Entre os principais alvos dessas neurotoxinas está o bloqueio de canais de  $Ca^{+2}$  e a ação sobre receptores glutamatérgicos (Grishin, 1994).

Atualmente sabe-se que algumas dessas neurotoxinas agem também como antagonistas de receptores glutamatérgicos de mamíferos (Usherwood, 1994). Entre as toxinas de aranhas caracterizadas por apresentarem baixa massa molecular, as mais conhecidas são as acilpoliaminas (Kawai *et al.*, 1982). Esses compostos são considerados antagonistas não-competitivos de receptores glutamatérgicos e acredita-se que possam ser potenciais drogas neuroprotetoras e/ou anti-convulsivantes (McCormick & Meinwald, 1993). É o caso da acilpoliamina JSTX-3, isolada da peçonha da aranha *Nephila clavata*, que possui efeito na atividade epileptiforme em neurônios hipocâmpais CA1 *in vitro* (Salamoni *et al.*, 2005).

A 6-hidroxitripargina também pertence à classe das toxinas de baixa massa molecular, sendo o primeiro composto alcalóide da família das  $\beta$ -carbolinas descrito em aranhas (Cesar, 2000). As  $\beta$ -carbolinas foram descritas pela primeira vez, em plantas da espécie *Pergamum harmala* (Carreras & Alonso, 1967). São alcalóides farmacologicamente ativos caracterizados pela ação inibitória sobre a atividade da enzima monoaminoxidase (MAO) (Rommelspacher *et al.*, 1994), além de apresentarem propriedades hipotensivas, alucinógenas e tremorigências comprovadas (Martin, 2003). Possuem alta afinidade de ligação para diferentes tipos de receptores, tais como os benzodiazepínicos (Airaksinen *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1981), imidazólicos (Husbands *et al.*, 2001) e serotoninérgicos (Glennon *et al.*, 2000). Huttunen e Myers (1986) mostraram que  $\beta$ -carbolinas

administradas no hipocampo de ratos induziam um estado de ansiedade intenso, bem como um aumento na preferência por álcool. Por todas essas características farmacológicas, as  $\beta$ -carbolinas são compostos-chaves na preparação de uma bebida alucinógena, utilizada em rituais de várias tribos indígenas da América do Sul (Naranjo, 1969).

A 6-hidroxitripargina foi sintetizada e purificada em laboratório e utilizada em ensaios de administração intracerebroventricular (*icv*) e endovenosa (*ev*), sendo o mapeamento da ação observado por meio da expressão da proteína Fos. Dentre as regiões que apresentaram marcação com Fos estão regiões hipotalâmicas e alguns núcleos talâmicos, sendo essas áreas relacionadas aos estados de atenção, alerta, ansiedade e estresse do animal. Entre os neurônios que expressaram Fos, foi possível caracterizar a presença de neurônios do tipo NMDA ( $\text{NMR}_1$ ), AMPA ( $\text{rGlu}_{2/3}$ ) e orexinérgicos (Capítulo 1). As duplas-marcações Fos/ $\text{NMR}_1$  foram as mais significativas em termos quantitativos, com 53% das células duplamente marcadas. Os receptores NMDA possuem funções importantes relacionadas ao estado convulsivo e ao aprendizado por repetição (Stone, 1995). Também estão envolvidos no influxo de íons  $\text{Ca}^{+2}$  através dos canais, podendo ser super-ativados em alguns casos de doenças como a esquizofrenia cerebral e hemorragias (Stone, 1995).

Os modelos crônicos de epilepsia têm sido estudados *in vitro* utilizando-se a técnica de fatias de cérebro, mas conhecidas como “brain slices” (McIlmwin & Buddle, 1953; Salamoni, 2004), principalmente do hipocampo. Essa técnica consiste em manter os neurônios funcionantes *in vitro*, permitindo o estudo da atividade elétrica tanto extra como intracelular, há a possibilidade de visualização do local da estimulação elétrica, do registro eletrofisiológico e também a manipulação do meio externo (Bashir & Vignes, 1997; Salamoni *et al.*, 2005). Entre os modelos de indução da atividade epileptiforme *in vitro*, associados aos canais NMDA, destaca-se a modificação da composição do meio de perfusão, retirando-se o íon  $\text{Mg}^{+2}$  (Anderson *et al.*, 1986). Quando o glutamato liga-se ao receptor NMDA, o canal abre-se normalmente e o potencial de membrana é mantido pela entrada de íons de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  e saída de  $\text{K}^+$ . Em repouso, o canal NMDA

---

sofre um bloqueio voltagem-dependente dos íons  $Mg^{+2}$  que impedem a livre passagem de outros íons através desse canal (Traub *et al.*, 1994). Esses íons  $Mg^{+2}$  desobstruem o canal iônico somente quando ocorre a despolarização da membrana.

O presente estudo tem como objetivo verificar o efeito da  $\beta$ -carbolino-toxina 6-hidroxitripargina no padrão de descargas de neurônios de CA1 de hipocampo de ratos *in vitro* e na atividade epileptiforme induzida pela perfusão com Ringer sem magnésio.



## MATERIAL E MÉTODOS

### *Animais*

Durante o experimento foram utilizados oito ratos da linhagem Wistar, machos com 35 dias pesando cerca de 200g. Os animais foram mantidos num alojamento climatizado, com comida e água *ad libitum* e ciclo claro-escuro de 12 horas. Para a decapitação os animais foram anestesiados com Tiopental (40mg/Kg) intraperitonealmente, seus encéfalos retirados e submetidos a cortes coronais de 400 $\mu$ m de espessura. As “fatias de cérebro” contendo o hipocampo foram isoladas e permaneceram em solução de Ringer normal (LCRa contendo em mM: NaCl 130; NaHCO<sub>3</sub> 24; D-glicose 10; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,3; KCl 3,5; Mg<sup>+2</sup> 2; CaCl<sub>2</sub> 2; pH entre 7,0 e 7,4), por 1 hora, com constante oxigenação.

### *Drogas*

A 6-hidroxitripargina foi sintetizada com base nos conhecimentos da síntese da tripargina de acordo com o protocolo descrito por Shimizu *et al.* (1982). Cerca de 1 $\mu$ M de 6-hidroxitripargina foi aplicada em solução de Ringer normal ou em meio de 0-Mg<sup>+2</sup>.

### *Medidas eletrofisiológicas*

Para o estudo da ação do composto 6-hidroxitripargina sob os neurônios hipocâmpais de CA1, uma série de 4 slices foi perfundida em Ringer normal por 10 minutos. Decorrido esse tempo, em duas dessas fatias a 6-hidroxitripargina foi administrada por perfusão diluída em Ringer normal, enquanto nas outras duas fatias a administração dessa toxina foi feita, com auxílio de uma bomba pneumática ejetora (PV830, Pneumatic PicoPump WPI). A micropipeta contendo a solução de 6-hidroxitripargina foi posicionada próxima ao eletrodo de registro intracelular na região de CA1 do

hipocampo. Em ambos procedimentos a concentração final de 6-hidroxitripargina foi de 1 $\mu$ M e durante todo o registro eletrofisiológico foi observado o padrão de descargas.

A fim de estudar o efeito da 6-hidroxitripargina na atividade epileptiforme induzida, utilizou-se o modelo da perfusão das fatias de hipocampo com Ringer sem magnésio (contendo em mM: NaCl 130; NaHCO<sub>3</sub> 24; D-glicose 10; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,3; KCl 3,5; CaCl<sub>2</sub> 2; pH entre 7,0 e 7,4). Durante a manifestação dessa atividade a toxina 6-hidroxitripargina na concentração de 1 $\mu$ M foi aplicada sobre as fatias de hipocampo, com auxílio de uma bomba pneumática ejetora, posicionada próxima a região hipocampal de CA1, da mesma maneira já descrita nos experimentos realizados apenas com Ringer normal e a 6-hidroxitripargina.

### *Registro eletrofisiológico*

O meio de incubação para as fatias de cérebro incluiu oxigenação (O<sub>2</sub> 95% e CO<sub>2</sub> 5%) a temperatura de 34°C em pH 7,4. Os parâmetros de viabilidade neuronal foram verificados a partir de suas características elétricas, tais como: capacitância, resistência da membrana celular e amplitude do potencial de ação (Avoli & Oliver, 1989).

Os registros foram realizados em células-alvos da camada de CA1 dos hipocampos, com auxílio de microeletrodos de borosilicato preenchidos com acetato de potássio 3M (80-100M $\Omega$ ) para registro intracelular (IC) e Ringer normal (5-10M $\Omega$ ) para registro extracelular (EC) e a micropipeta contendo 6-hidroxitripargina (6-HT) foi posicionada próxima ao eletrodo de registro intracelular.

O potencial de membrana foi determinado após a penetração do microeletrodo na célula e 10 minutos após seu empalamento. Para essa avaliação aplicou-se corrente com variações de 0,1 nA num intervalo de -0,7 até 0,7 nA, utilizando o AxoClamp 2B. Além dessas verificações, o potencial de membrana também foi avaliado antes e após o tratamento com Ringer 0-Mg<sup>+2</sup>, com objetivo de caracterizar a viabilidade das células em estudo, durante todo o processo. Como critérios eletrofisiológicos de um neurônio

---

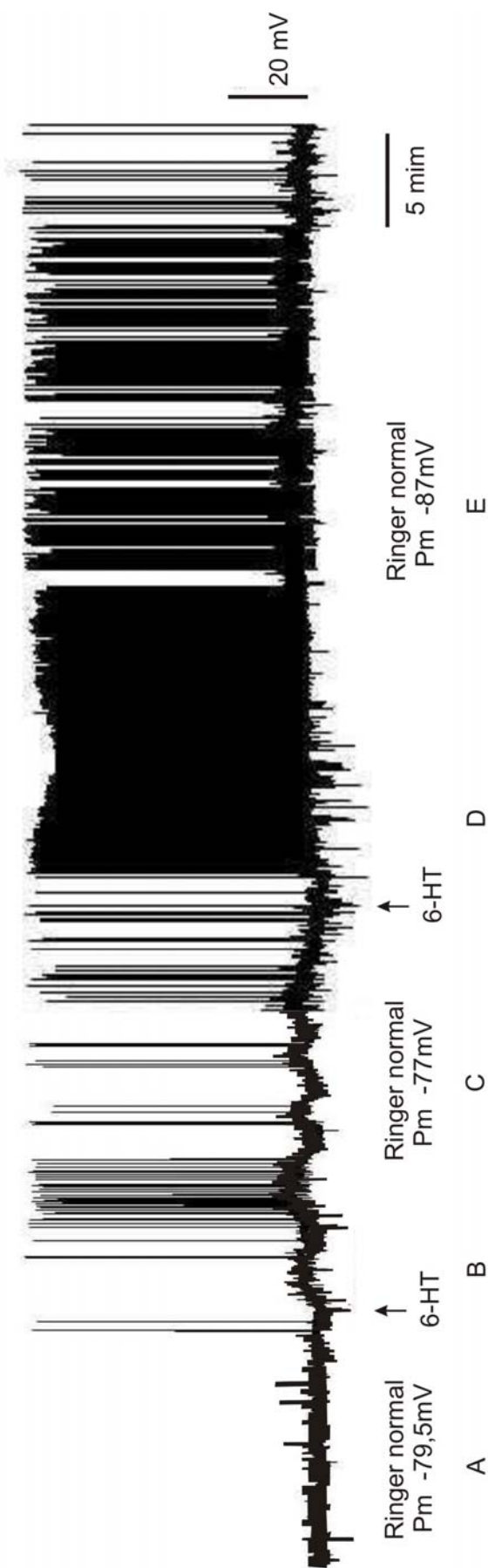
viável, foram considerados apropriados para o estudo, somente os neurônios que apresentaram potencial de membrana inferiores a  $-50\text{mV}$  e potenciais de ação com amplitudes superiores a  $50\text{mV}$ .

Os protocolos de estimulação para clampeamento de corrente foram desenvolvidos num sistema de registro eletrofisiológico *in vitro* (Bashir & Vignes, 1997) dentro de uma gaiola de Faraday, para isolamento da interferência eletromagnética (Axon, 1993). Os seguintes equipamentos foram utilizados para esse registro: câmara de perfusão e registro de interface, estimulador Máster 8, amplificador CyberAmp 380 e fixador de corrente (current clamp) AxoScope 2B (Axon Instruments). Os dados foram monitorizados e armazenados em PC, com programa AxonScope e posteriormente analisados com o “software” Origin 5.0.

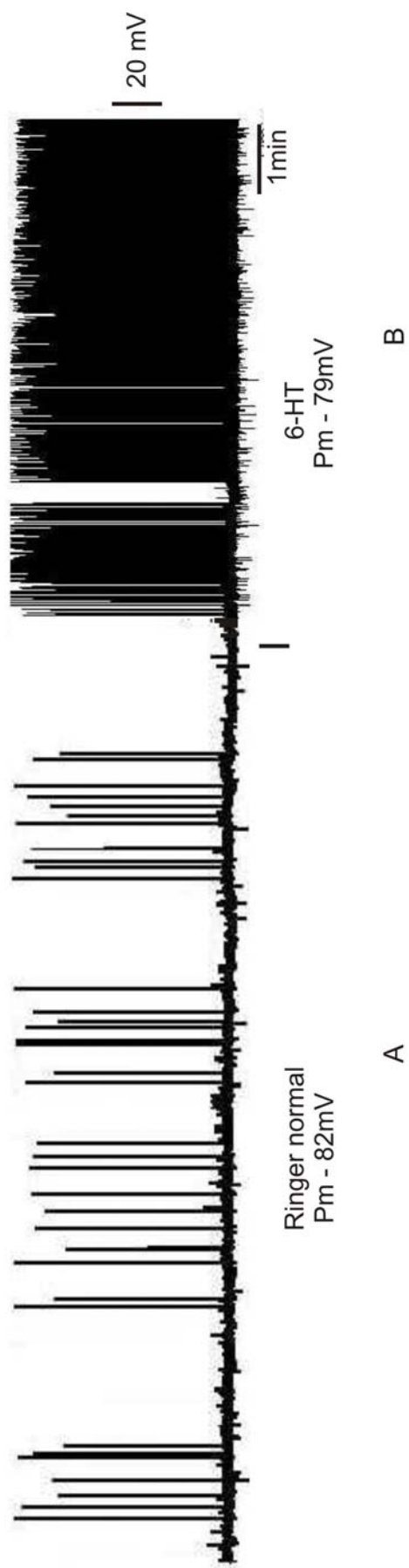
## RESULTADOS

Nos quatro registros obtidos após a administração de 1 $\mu$ M de 6-hidroxitripargina, por ejeção ou por perfusão, observou-se a atividade epileptiforme induzida pelo composto, ressaltando um efeito convulsivante da substância em questão (fig.17 e 18). Sendo essa ação reversível e hiperpolarizadora após o *washout* (a lavagem da preparação) (fig.19 e 20).

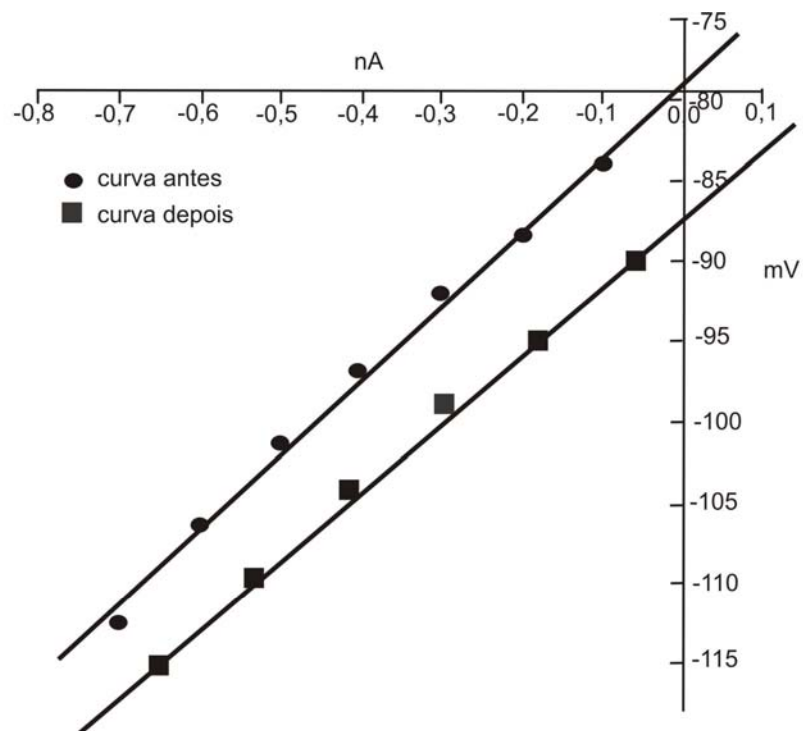
Foram analisados seis registros eletrofisiológicos de neurônios hipocâmpais de CA1 de ratos após indução de atividade epileptiforme pela perfusão de Ringer sem magnésio e posterior administração da toxina 6-hidroxitripargina. Nos registros considerados válidos os neurônios apresentaram atividade epileptiforme em respostas à perfusão com Ringer sem magnésio (30 min) e essa ação não foi bloqueada pela 6-hidroxitripargina e sim amplificada (fig.21), confirmando o efeito epileptogênico dessa toxina. O *washout* e nova indução da atividade epileptiforme permitiram verificar a reversibilidade desta ação, bem como o efeito de hiperpolarização do neurônio (fig.22).



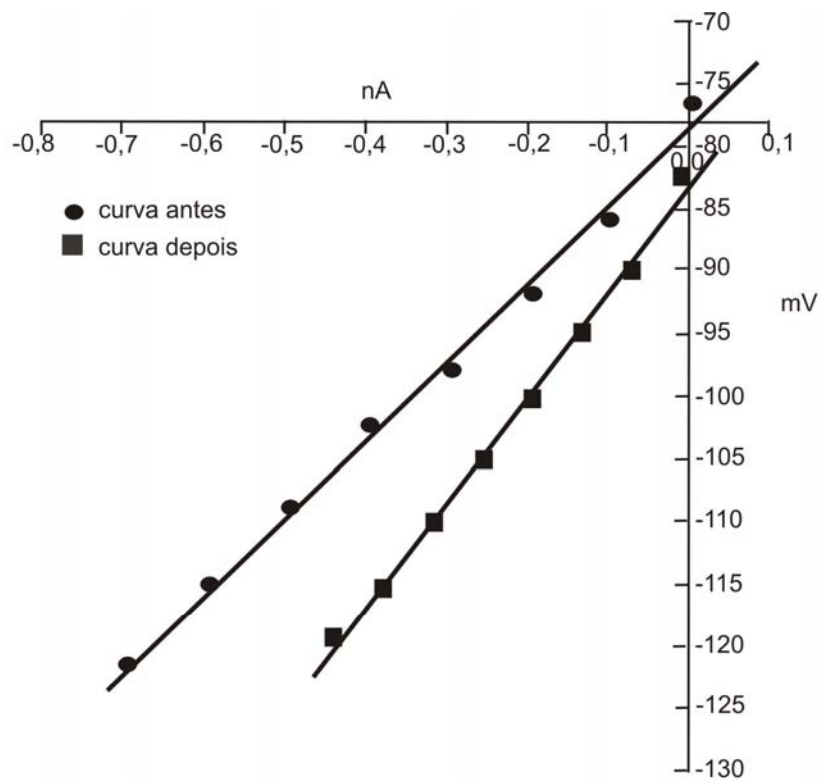
**Figura 17:** Registro intracelular de neurônio hipocampal de CA1. Em A- perfusão de neurônios com Ringer normal, Pm -79,5 mV. B- Crise eletrográfica com a aplicação da toxina 6-hidroxitriptargina (6-HT). C- "washout" com Ringer normal, Pm -77mV. D- Nova crise eletrográfica causada pela aplicação da 6-hidroxitriptargina. E- "washout" com Ringer normal, Pm -87mV.



**Figura 18:** Registro intracelular de neurônio hipocampal de CA1. Em A- perfusão de neurônios com Ringer normal, Pm -82mV. B- Crise eletrográfica com a perfusão da toxina 6-hidroxitirpargina (6-HT), Pm - 79mV.

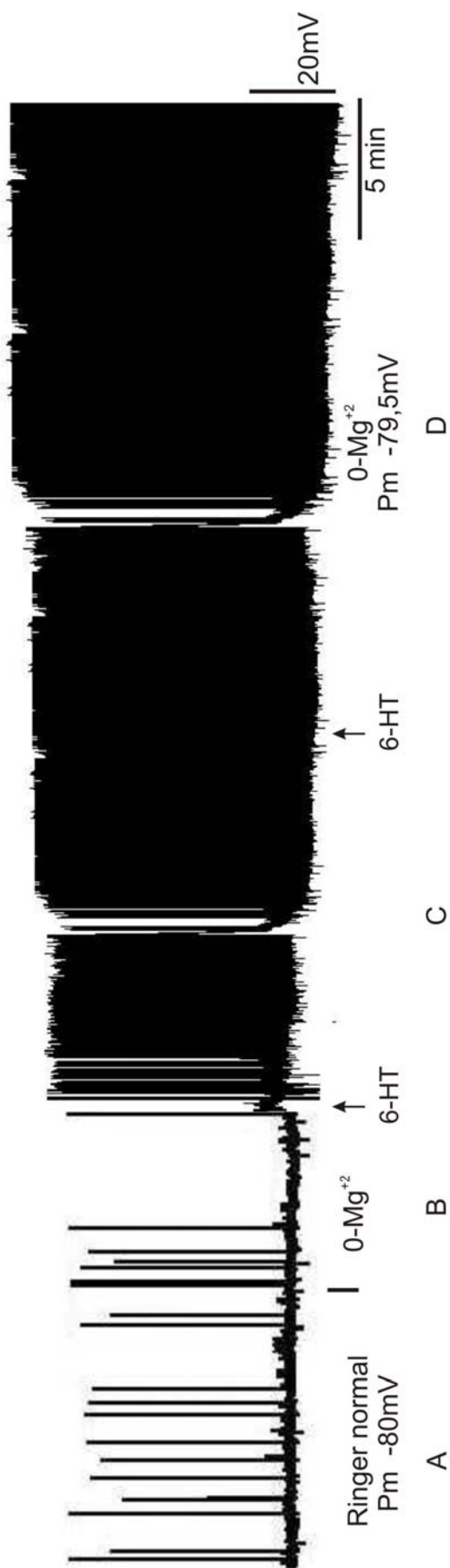


**Figura 19:** Curva de tensão (mV) x corrente (nA), antes e depois da aplicação da 6-hidroxitripargina em tecido hipocampal de ratos.



**Figura 20:** Curva de voltagem (mV) x corrente (nA), antes e depois da perfusão com 6-hidroxitriptargina em tecido hipocampal de ratos.





**Figura 21:** Registro intracelular de neurônio hipocampal de CA1. Em A- perfusão de neurônios com Ringer normal, Pm - 80,0 mV. B- Crise eletrográfica com a aplicação de 0-Mg<sup>+2</sup>. C- aplicação da toxina 6-hidroxitriptargina (6-HT). D- "washout" com Ringer 0-Mg<sup>+2</sup>, Pm - 79,5 mV.

## DISCUSSÃO

As  $\beta$ -carbolinas são compostos estruturalmente similares à molécula de serotonina (Solis-Maldonado *et al.*, 2003). Acredita-se que essa semelhança estrutural tenha conferido a essa classe de alcalóides a capacidade de ligação a diferentes tipos de receptores. Entre esses benzodiazepínicos (Airaksainen *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1981), imidazólicos (Husbands *et al.*, 2001) e serotoninérgicos (Glennon *et al.*, 2000) são alvos certos desses compostos.

A 6-hidroxitripargina é uma  $\beta$ -carbolina extraída da peçonha da aranha *Parawixia bistriata*, cuja estrutura química é análoga à molécula da tripargina. A tripargina é um composto  $\beta$ -carbolínico isolado da pele da rã africana *Kassina senegalensis* (Akizawa *et al.*, 1982) e mais recentemente identificado também em tecidos e fluídos corpóreos de mamíferos (Peura *et al.*, 1989). Estudos eletrocorticais da tripargina revelaram que esse composto causa uma dessincronização da atividade cerebral e uma síndrome de estimulação comportamental em ratos (Nistico *et al.*, 1987). A ação da tripargina está relacionada com a inibição de corrente de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  quando aplicado em superfícies internas de membranas axonais de lula e também com ação modulatória em receptores do tipo 5-hidroxitriptamina (Seyama *et al.*, 1985; Nistico *et al.*, 1987).

A ação da 6-hidroxitripargina foi mapeada em encéfalo de ratos Wistar, por meio da análise da expressão da proteína Fos após administração desse alcalóide. Entre as áreas evidenciadas por esse tipo de marcação estão regiões do hipotálamo, do tálamo, do córtex e o hipocampo. E entre os tipos de receptores existentes nesses neurônios Fos-reativos, destaca-se a presença do subtipo NMDAR1, evidenciado por meio de duplas-marcações.

Os receptores NMDA estão vastamente distribuídos no cérebro, especialmente no córtex cerebral e hipocampo (Ashwood & Wheal, 1987). Sua função está associada a processos neurofisiológicos relacionados à memória e ao aprendizado (Stone, 1995). Esses receptores também estão envolvidos no influxo de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Na}^+$  podendo ser super-ativados em

processos patológicos que influenciam na epilepsia e nos efeitos de isquemia cerebral (Ashwood & Wheal, 1987).

Durante a crise epiléptica existe aumento da atividade glutamatérgica. A ativação contínua do glutamato em receptores NMDA promove um aumento da permeabilidade de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  (Nowak *et al.*, 1984) capazes de causar lesões em estruturas sensíveis, como o hipocampo e o desenvolvimento da atividade epileptogênica (Cavalheiro *et al.*, 1991).

Os receptores NMDA são constituídos por canais de voltagem glutamato-dependentes e o bloqueio dos mesmos é realizado por íons  $\text{Mg}^{+2}$ . Os íons  $\text{Mg}^{+2}$  ligam-se aos canais NMDA quando o neurônio encontra-se em seu potencial de repouso, impedindo a passagem de outros íons. Com o início de um potencial de ação ocorre a saída dos íons  $\text{Mg}^{+2}$  e a entrada de íons  $\text{Ca}^{+2}$  promovendo-se a aceleração da despolarização (Prince & Connors, 1986). O modelo de indução de atividade epileptogênica utilizado nesse experimento é baseado na retirada dos íons  $\text{Mg}^{+2}$  do Ringer utilizado na perfusão da fatia de hipocampo, determinando um estado de hiperexcitabilidade decorrente do aumento da condutância aos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  nos receptores NMDA. Além desse modelo, a aplicação da toxina em fatias de hipocampo perfundidas com Ringer normal foi utilizada com objetivo de estudar a ação desse composto em situação basal.

A hiperexcitabilidade na epilepsia do lobo temporal é atribuída em parte pela função aumentada de uma sub-população de sinapses glutamatérgicas que utilizaria receptores NMDA (Köhr & Mody, 1994; Bernard & Wheal, 1995). Acredita-se que não só os receptores do tipo NMDA, mas também os do tipo AMPA estejam envolvidos nos mecanismos da atividade epileptiforme (Babb *et al.*, 1996), possibilitando mudanças no aumento da permeabilidade aos íons  $\text{Ca}^{+2}$  que poderiam ter conseqüências importantes em outras propriedades cinéticas do neurônio (Nakanishi, 1992).

Nos experimentos realizados com a 6-hidroxitripargina, esse composto demonstrou um efeito epileptogênico sob neurônios hipocampais de  $\text{CA}_1$ , quando perfundido em solução de Ringer normal. Em ensaios utilizando-se a perfusão com Ringer 0- $\text{Mg}^{+2}$ , a 6-hidroxitripargina não foi capaz de bloquear a atividade epileptiforme induzida, mas ao contrário,

potencializou ainda mais esta atividade, aumentando a frequência das descargas epilépticas. Isso sugere que a 6-hidroxitripargina seja um composto epileptogênico (pró-convulsivante) que poderia estar agindo em receptores NMDA de modo a impedir o fechamento dos canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$ .

Os dados existentes na literatura descrevem outros compostos  $\beta$ -carbolínicos com ações tremorigênicas, ansiogênicas e ansiolíticas atribuídas a ligações dos mesmos a receptores benzodiazepínicos (Airaksinen & Mikkonen, 1980; Saano & Airaksinen, 1982; Lutes *et al.* 1988; Rommelspacher *et al.*, 1985; Pähkla *et al.*, 1996). Porém nenhuma outra  $\beta$ -carbolína, além da 6-hidroxitripargina, havia sido relacionada até agora como ligante de receptores do tipo NMDA e por esse fato associada a possíveis crises convulsivas.

O primeiro experimento de padronização da quantidade de 6-hidroxitripargina ministrada de modo intracerebroventricular (*icv*) (Capítulo 1) evidenciou que os animais que receberam  $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$  da toxina apresentaram crises convulsivas com duração de 1 hora e 30 minutos. Com os resultados eletrofisiológicos essa observação pôde ser confirmada e a ligação da 6-hidroxitripargina a receptores NMDA foi relacionada ao processo epileptogênico.

Esses resultados eletrofisiológicos possibilitaram a caracterização da 6-hidroxitripargina como um provável composto pró-convulsivante de ação reversível, pois ao final da administração dessa  $\beta$ -carbolina, os neurônios voltaram a sua condição normal, com potenciais muito semelhantes aos observados no início de cada experimentação, porém mais negativos que os iniciais, esse fato pode indicar um evento de hiperpolarização do neurônio em decorrência da ação dessa  $\beta$ -carbolina.

Pode-se constatar que embora pertencente ao grupo de toxinas de aranhas de baixa massa molecular, como as acilpoliaminas, a ação da 6-hidroxitripargina frente ao mesmo modelo eletrofisiológico experimental ( $0\text{-Mg}^{+2}$ ) é diferente e com características inversas ao composto já descrito. A acilpoliamina JSTX-3 apresenta um efeito anticonvulsivante e neuroprotetor;

---

já a toxina 6-hidroxitripargina evidencia um potencial pró-convulsivante, porém ambas ações são reversíveis.

Sabe-se que os receptores NMDA apresentam pelo menos seis sítios para ligantes intra e extracelulares (L-glutamato, glicina, penicilidina, íons magnésio, íons zinco e poliaminas). A 6-hidroxitripargina pode estar agindo num sítio de ligação específico desses receptores NMDA, que poderia ser talvez um sétimo sítio específico para  $\beta$ -carbolinas, ou talvez poderia estar ligando-se num dos seis sítios pré-existentes, porém não mapeados na presente investigação. Algumas tentativas de se correlacionar a ação pró-convulsivante da 6-hidroxitripargina sobre os receptores NMDA e um possível bloqueio desse efeito, proporcionado pela ação anti-convulsivante da JSTX-3 foram realizadas, porém em todas as tentativas a atividade epileptiforme foi induzida pela perfusão com Ringer normal com administração da 6-hidroxitripargina, mas ocorreu o desampalamento dos neurônios no momento da ejeção da JSTX-3. Esses estudos devem ser ainda retomados na tentativa de elucidar uma possível ação conjugada dessas duas toxinas que poderiam ser associadas a modelos de epilepsia em pesquisa científicas.

A característica da 6-hidroxitripargina como droga pró-convulsivante auxiliou na compreensão das marcações de Fos observadas após administração icv e ev desse composto (Capítulo 1). Observou-se que as regiões relacionadas à ação da 6-hidroxitripargina foram principalmente áreas e núcleos hipotalâmicos e também talâmicos, córtex e hipocampo e talvez amígdala. Essas áreas estão relacionadas ao estado de alerta e atenção, ansiedade e estresse sofridos em decorrência da ação dessa  $\beta$ -carbolina no SNC desses animais. A eletrofisiologia associada ao mapeamento da 6-hidroxitripargina, por meio da expressão da proteína Fos possibilitaram a caracterização inicial dessa  $\beta$ -carbolina e a comprovação de sua natureza neuroativa e pró-convulsivante.

## CONCLUSÕES

A partir do mapeamento da ação da 6-hidroxitripargina no SNC de ratos, utilizando-se a proteína Fos como marcador da atividade neuronal, associado aos experimentos eletrofisiológicos em neurônios hipocâmpais de ratos, pôde-se elucidar, pelo menos em parte o mecanismo de ação dessa  $\beta$ -carbolina. A 6-hidroxitripargina é uma toxina isolada da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* que mostrou ser neuroativa com ação comprovada em regiões hipotalâmicas, núcleos talâmicos, córtex, hipocampo e talvez amígdala. A administração de 6-hidroxitripargina em neurônios hipocâmpais de CA1 perfundidos em Ringer normal evidenciou a ação epileptogênica dessa  $\beta$ -carbolina. Essa ação poderia estar associada à ligação da 6-hidroxitripargina a receptores do tipo NMDA de modo a impedir o fechamento dos canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$ . Além da ação sobre esses receptores, é provável que a 6-hidroxitripargina possa estar agindo também em receptores do tipo AMPA e em neurônios orexinérgicos, atribuindo essa variedade de ligações a uma característica peculiar aos compostos alcalóides da família das  $\beta$ -carbolinas.

---

## REFERÊNCIAS

- 1-Airaksinen, M.M. & Mikkonen, E. Affinity of  $\beta$ -carbolines on rat brain benzodiazepine and opiate receptors. *Med. Biol.* 1980; 58, 341-344.
- 2-Airaksinen, M.M.; Lecklin, A.; Saano, V.; Tuomisto, L.; Gynther, J. Tremorogenic effect and inhibition of tryptamine and serotonin receptor binding by  $\beta$ -carbolines. *Pharmacol. Toxicol.* 1987, 60, 5-8.
- 3-Akizawa, T.; Yamazaki, K.; Yasuhara, T.; Nakajima, T.; Roseghini, M.; Erspamer, G.F.; Espramer, M. *Biomedical Res.* 1982, 3, 232-234.
- 4-Anderson, W.W.; Lews, D.V.; Swaartsweider, H.S.; Wilson, W.A. Magnesium-free medium activates seizure-like events in the rat hippocampal slice. *Brain Res* (1986), 398, 215-219.
- 5-Ashwood, T.J. & Wheal, H.V. The expression of N-methyl-D-aspartate-receptor-mediated component during epileptiform synaptic activity in hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* 1987, 91, 815-822.
- 6-Avoli, A & Oliver, A. Electrophysiological properties and synaptic responses in the deep layers of the human epileptogenic neocortex in vitro. *J. Neurophysiology.* 1989, 61(3), 589-606.
- 7-Axon, T.G. The Axon guide for electrophysiology & biophysics. Laboratory Techniques. *Axon Instruments INC, Ca.* (1993), pp. 17-24
- 8-Babb, T.L.; Mathern, G.W.; Leite, J.P.; Pretorius, J.K.; Yeoman, K.M.; Kuhlman, P.A. Glutamate AMPA receptors in the fascia dentata of human and kainate rat hippocampal epilepsy. *Epilepsy Research.* 1996, 26, 193-205.
- 9-Bashir, Z.I. & Vignes, M. Electrophysiological recording in brain slices. Neuroscience. LABFAX series. Lynch, M.A. & O'Mara, S.M. (Eds.). Academic Press, London (1997), 13-31.
- 10-Bernard, C. & Wheal, H.V. Plasticity of AMPA and NMDA receptor-mediated epileptiform activity in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research.* 1995, 95-107.
- 11-Carreras, L. & Alonso, M.G. Separation of the major alkaloids of *Peganum harmala* by high voltage ionophoresis. *J. Chromatogr.* 1967, 29, 388-390.

- 
- 12-Cavalheiro, E.A.; Leite, J.P.; Bortolotto, Z.A.; Turski, W.A.; Ikonomidou, C.; Turski, L. Long-term effects of pilocarpina in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. 1991, 32, 778-782.
- 13-Cesar, L.M.M. Caracterização da estrutura molecular e da toxicidade das  $\beta$ -carbolinotoxinas da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* (Araneae: Araneidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro – SP, Brazil, 2000, p. 67.
- 14-Glennon, R.A.; Dukat, M.; Grella, B.; Hong, S.; Contantino, L.; Teitler, M.; Smith, C.; Ergan, C.; Davis, K.; Mattson, M.V. Binding of  $\beta$ -carbolines and related agents at serotonin (5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub>), dopamine (D<sub>2</sub>) and benzodiazepine receptors. *Drug Alcohol Depend.* 2000, 60, 121-132.
- 15- Grishin, E. V. Spider neurotoxins and their neuronal receptors. *Pure Appl. Chemical*. 1994, 66, 783-790.
- 16-Hagiwara, K.; Sakai, T.; Miwa, A.; Kawai, N.; Nakajima, T. Agelenin. A new neurotoxin from the venom of the spider, *Agelena opulenta*. *Peptide Chemistry*. 1991, 351-356.
- 17-Husbands, S.M.; Glennon, R.A.; Gorgerat, S.; Gough, R.; Tyacke, R.; Corsby, J.; Nutt, D.J.; Lewis, J.W.; Hudson, A.L. *Drug Alcohol Depend.* 2001, 64, 203.
- 18-Huttunen, P. & Myers, R.D. Tetrahydro- $\beta$ -carboline micro-injected into the hippocampus induces an anxiety-like state in the rat. *Pharmacology Biochem. Behav.* 1986, 24, 1733-1738.
- 19-Kawai, H.; Miwa, A.; Abe, T. Spider venom contains specific receptor blocker of glutaminergic synapses. *Brain Research* (1982), 247, 169-171.
- 20-Köhr, G. & Mody, I. Kindling increases N-methyl-D-aspartate potency at single N-methyl-D-aspartate channels in dentate gyrus granule cells. *Neurosci.* 1994, 62, 975-981.
- 21-Luttes, J.; Lorden, J.F.; Beales, M.; Lotmans, G.A. Tolerance to the tremorogenic effects of harmaline: evidence for altered olivo-cerebellar function. *Neuropharmacol.* 1988, 27, 849-855.



- 
- 22-Martin, L.; Léon, A.; Martin, M.A.; del Castilho, B.; Menédez, J.C. Detection and characterization of cyclodextrin complexes with  $\beta$ -carboline derivates by spectroscopic techniques. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2003; 32, 991-1001.
- 23-McCormick, K.D. & Meinwald, J. Neurotoxic acypoliamines from spider venoms. *J. Chem. Ecology*. 1993, 19 (10), 2411-2451.
- 24-McIlmwin, H. & Buddle, H.L. Techniques in tissue metabolism 1 a mechanical chopper. *Bioch. Journal*. 1953, 53, 412-420.
- 25-Müller, W.E.; Fehske, K.J.; Borbe, H.O.; Wollert, U.; Nanz, C.; Rommelspacher, H. On the neuropharmacology of harmaline and other  $\beta$ -carbolines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1981, 14, 693-699.
- 26-Nakanishi, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. 1992, 5082, 597-603.
- 27-Naranjo, C. Psychotherapeutic possibilities of new fantasy-enhancing drugs. *Clin. Toxicol.* 1969, 2, 209 – 224.
- 28-Nistico, G.; De Sarro, G. B.; Langer, S. Z. Behavioural and electrocortical power spectrum effects of 5-methoxytryptoline and other analogs after intraventricular administration in rats. *Eur. J. Pharmacology*. 1987, 142 (1), 121-128.
- 29-Nowak, L.; Bregestovski, P.; Ascher, P.; Herbert, A.; Prochiantz, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*. 1984, 307, 462-465.
- 30-Pähkla, R.; Harro, J.; Rägo, L. Behavioural effects of the pinoline in the rat forced swimming open field and elevated plus-maze tests. *Pharmacology Res.* 1996, 34, 73-78.
- 31-Peura, P.; Johnson, J.V.; Yost, R.A.; Faull, K.F. Concentrations of tryptoline and methtryptoline in rat brain. *J. Neurochemistry*. 1989, 52, 847-852.
- 32-Prince, D.A. & Connors, B.W. Mechanisms of interictal epileptogenesis. *Adv. Neurol.* 1986, 44, 275-299.
- 33-Rommelspacher, H.; Brüning, G.; Susilo, R.; Nick, M.; Hill, R. Pharmacology of harmaline (1-methyl-3,4-dihydro- $\beta$ -carboline). *Eur. J. Pharmacol.* 1985, 109, 363-371.

- 
- 34-Rommelspacher, H.; May, T.; Salewski, B. Harman (1-methyl- $\beta$ -carboline) is a natural inhibitor of monoamine-oxidase type A in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1994, 252, 51-59.
- 35-Saano, V & Airaksinen, M.M. Binding of  $\beta$ -carbolines and caffeine on benzodiazepine receptors: Correlation to convulsions and tremor. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1982, 51, 300-308.
- 36-Salamoni, S.D. Estudo da acilpoliamina JSTX-3 na atividade epileptiforme induzida em neurônios hipocâmpais *in vitro*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - Porto Alegre – RS. 2004, 161p.
- 37-Salamoni, S.D.; Da Costa, J.C.; Palma, M.S.; Konno, K.; Ken-Ichi, N.; Tavares, A.A.; Abreu, D.S.; Venturin, G.T.; Cunha, F.B.; Oliveira, R.M.; Breda, R.V. Antiepileptic effect of acypoliaminetoxin JSTX-3 on rat hippocampal neurons. *Brain Research*. 2005, 00, 00-00 (in press).
- 38-Seyama, I.; Yakehiro, M.; Nakajima, T. Tripargine blocks the sodium channels only from the inside of squid giant axon. *Jpn. J. Physiology*. 1985, 35 (2), 367-373.
- 39-Shimizu, M.; Ishikawa, M.; Komoda, Y.; Nakajima, M. Total synthesis of (-) Trypargine. *Chem. Pharm. Bull.* 1982, 30, 909-913.
- 40-Solis-Maldonado, C.; Quintanilla-Licea, R.; Tamez-Guerra, R.; Rodriguez-Padilla, C.; Gomez-Flores, R. Differential effects of synthetic indoloquinolizines on *in vitro* rat lymphocytes and macrophage functions. *International Immunopharmacol.* 2003, 3, 1261-1271.
- 41-Stone, T.W. Neuropharmacology. 1 Ed. W.H. Freeman Spektrum Editory. Oxford - New York. 1995, 140 pp.
- 42-Traub, R.D.; Jefferys, J.G.; Whittington, M.A. Enhanced NMDA conductance can account for epileptiform activity induced by low Mg<sup>2+</sup> in the rat hippocampal slice. *Journal Physiology*. 1994, 478, 379-393.
- 43-Usherwood, P.N. Insects glutamate receptor. *Adv. Insect. Physiol.* 1994, 24, 309-341.

## CONCLUSÕES FINAIS

Os estudos dos mecanismos de ação da 6-hidroxitripargina comprovam que essa  $\beta$ -carbolina extraída da peçonha da aranha *P. bistriata* é um composto neuroativo capaz de estimular a expressão da proteína Fos em diferentes regiões do SNC de roedores. Entre essas destacam-se regiões hipotalâmicas, talâmicas, corticais e hipocâmpais, sendo que algumas dessas áreas podem estar relacionadas aos mecanismos de respostas ao estresse e ansiedade possivelmente causados pela ação desse composto.

Os experimentos de duplas-marcações evidenciaram que após a administração da 6-hidroxitripargina, a expressão de Fos foi observada em neurônios do tipo rGlu<sub>2/3</sub>, NMR<sub>1</sub> e orexinérgicos, concluindo-se que essa  $\beta$ -carbolina é capaz de agir em diferentes tipos de células neuronais. Ensaios eletrofisiológicos realizados em neurônios CA1 do hipocampo revelaram o caráter epileptogênico da 6-hidroxitripargina, utilizando como modelo, receptores do tipo NMDA. Acredita-se que a 6-hidroxitripargina ligue-se a esses receptores NMDA de modo a impedir o fechamento dos canais de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup> e assim sejam capazes de induzir as crises epileptogênicas observada nos experimentos *in vitro*.

A possibilidade de associar o mapeamento da ação da 6-hidroxitripargina por meio de técnicas imunohistoquímicas a ensaios eletrofisiológicos, contribuiu para dar início à caracterização da atividade de mais um composto químico isolado de peçonhas animais, no SNC de mamíferos.