
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA/ATIVIDADE
PARA AS AÇÕES NEUROTÓXICA/NEUROPROTETORA
DAS ACILPOLIAMINOTOXINAS NSTX-3 E JSTX-3
EM SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS

FERNANDA PESSOA DE SALES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biologia Celular e Molecular.

Maio de 2009

FERNANDA PESSOA DE SALES

**ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA/ATIVIDADE
PARA AS AÇÕES NEUROTÓXICA/NEUROPROTETORA
DAS ACILPOLIAMINOTOXINAS NSTX-3 E JSTX-3
EM SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO SERGIO PALMA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biologia Celular e Molecular.

Rio Claro
2009

FERNANDA PESSOA DE SALES

**ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA/ATIVIDADE
PARA AS AÇÕES NEUROTÓXICA/NEUROPROTETORA
DAS ACILPOLIAMINOTOXINAS NSTX-3 E JSTX-3
EM SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biologia Celular e Molecular.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich

Profa. Dra. Maria Izabel Matias Camargo

Rio Claro, 14 de Abril de 2009.

“Tu não és ainda para mim senão um garoto inteiramente igual a cem mil outros garotos. E eu não tenho necessidade de ti. E tu não tens necessidade de mim. Não passo a seus olhos como uma raposa igual a cem mil outras raposas. Mas se tu me cativas, nós teremos necessidade um do outro. Serás único para mim. E eu serei para ti única no mundo...”.

“Só se vê bem com o coração. O essencial é invisível para os olhos”.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas...”.

(Antoine de Saint-Exupéry, em “O Pequeno Príncipe”).

*Aos meus pais, Salés e Dirce,
e aos meus irmãos,
por me cativarem de modo
tão doce e sincero.
Dedico...*

Agradecimentos

A Deus pela maravilha da vida, pelas oportunidades e desafios que possibilitam meu crescimento. Por me permitir experimentar as delícias da vida, dando-me uma família e amigos maravilhosos.

Ao Prof. Dr. Mario Palma pela oportunidade, dedicada orientação e ensinamentos, por todos os conselhos nesses anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt por me receber de forma tão acolhedora, permitindo o convívio em seu laboratório, nas reuniões de grupo, nas quais aprendi muito e, principalmente, pela disposição em ensinar. Obrigada!!! Sem o LNQ o mestrado não teria sido tão enriquecedor.

À FAPESP por financiar esse trabalho.

À minha família, que apesar dos desencontros, é a base do meu viver, sempre me apoiando e encorajando a seguir caminhos até então desconhecidos. À minha mãe, Dirce, tão fundamental para mim, por ser tão amiga, me ouvindo, aconselhando, se preocupando (às vezes mais que o necessário... faz parte!), por este amor incondicional e confortador. Ao meu pai, Sales, que nunca hesitou em me apoiar e acreditar no meu potencial, sobretudo na vida profissional, incentivando cada passo a ser dado. À Camila, minha amada irmã, que a cada dia mostra o quão maravilhosa é, sempre amiga e companheira. E agora estaremos ainda mais próximas, seremos quase vizinhas!! Ao Gustavo, uma pessoa acima de tudo íntegra e ética, preocupada com a condição do próximo, amo muito você. Por você ser essa pessoa grandiosa e amável. Ao Rodrigo, que tanto amo, e por amar tanto, acabo decepcionando em alguns momentos... Mas nada que o amor não supere.

Ao Hernandez, meu namorado especial, que entrou em minha vida no início desse trabalho e desde então me apóia, incentiva, dá sugestões e broncas com muito rigor científico. Por ser tão meu amigo e zelar por mim...

Aos agregados Karina e Lilach. Por cuidarem dos meus irmãozinhos e os fazerem mais felizes! E continuem cuidando, senão... rs

A todos meus familiares, em especial, às minhas avós, Dalila e Olívia que fazem com que eu me sinta maior diante das dificuldades, ao Matheus, meu afilhado lindo, ao Danillo, à Chum, à Aline, ao tio Dú e a Érika que me acompanham e me ajudam sempre que preciso.

Aos meus grandes amigos Vivian, Cacá, Paula, Lú, Fio, Gabi, Mari Botelho, Mari A., Paulinha, Quel, Thais, Mari Duó e Júlia. Nossa amizade nasceu em Rio Claro e, hoje, apesar da distância e da saudade ela continua forte e a certeza do nosso companheirismo é muito confortante.

Aos amigos de laboratório e fora dele também, Alê, Beto, Vanessa, Nicoli, Daniel, Dom, Paulo, Nathy, Bibi, Lillian, Roberta pelas conversas, momentos de descontração.

Aos compadres, Lucy e Paulinho, que causaram no início de 2008, mas depois nos deram a Mãe, uma menininha linda... Obrigada pela amizade e por todos os ensinamentos.

Aos antigos do lab, que não estão mais em Rio Claro, Keity fofet's, pela amizade sincera e conversas sempre agradabilíssimas, por todo apoio em SP, (tenho que agradecer a OI por ter chegado à SP e permitir que a gente converse ainda mais hehe); Ao Mau, à Virgínia, Evelyn e Susan. Vocês são muito queridos.

Aos novos amigos de SP, Jô e Renatinha (as piriguetes do LNQ hehe), Fernando, André, Carlos, Marília, Sabrina, Luciano, Ceci, Amanda, Luciane. Obrigada pelos ensinamentos sobre neurociência, pelas conversas, desabafos e apoio. A vida em São Paulo fica mais leve com a amizade de vocês!

A todos que de alguma maneira contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Agradeço a Deus por cada momento vivido, por cada caminho escolhido, pela oportunidade de poder recomeçar, sempre que necessário, porém sem nunca esquecer os que se foram e tentando, ao máximo, valorizar os que se fazem presentes...

A todos vocês, MUITO OBRIGADA!!!

Fernanda Pessoa de Sales.

“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 manhas e as manhãs,
o sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar,
é preciso paz pra poder sorrir
É preciso 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
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
De ser feliz

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história
E cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz...”

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xvii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1. <i>Material biológico.....</i>	40
3.1.1. <i>Toxinas sintéticas.....</i>	40
3.1.2. <i>Animais.....</i>	40
3.2. <i>Cirurgia para implantação da cânula guia e habituação.....</i>	40
3.3. <i>Administração intracerebroventricular (icv) da neurotoxina.....</i>	42
3.4. <i>Perfusão transcardíaca.....</i>	42
3.5. <i>Pós-fixação dos encéfalos e microtomia.....</i>	43
3.6. <i>Imunoistoquímica.....</i>	43
3.7. <i>Quantificação das células Fos-IR.....</i>	45
3.8. <i>Aquisição das imagens.....</i>	45
3.9. <i>Desenho Experimental.....</i>	46

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5. CONCLUSÃO.....	82
6. REFERÊNCIAS.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

3V	Terceiro Ventrículo
ACTH	Adrenocorticotrofina
Agel-489	α -agatoxina-489
Agel-505	α -agatoxina-505
AHC	Área Hipotalâmica Anterior, porção central
AHP	Área Hipotalâmica Anterior, porção posterior
Ala	Alanina
ALS	Esclerose Amiotrófica Lateral
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol ácido propiônico
AP	Antero-posterior
ArgTX-636	Argiotoxina-636
ArgTX-659	Argiotoxina-659
ArgTX-673	Argiotoxina-673
Asp	Asparagina
AVP	Vasopressina-Arginina
BLA	Núcleo Basolateral da Amígdala, parte anterior
BMA	Núcleo Basomedial da Amígdala, parte anterior
CA1	Região CA1 do Hipocampo
CA2	Região CA2 do Hipocampo
CA3	Região CA3 do Hipocampo
cAMP	AMP cíclico
CeC	Núcleo Central da Amígdala, porção capsular
CeL	Núcleo Central da Amígdala, porção lateral
CeM	Núcleo Central da Amígdala, porção medial
CM	Núcleo Talâmico Central Medial
CRF	Fator Liberador de Corticotrofina
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
D ₁ -like	Receptores de Dopamina dos subtipos D ₁ e D ₅
D ₂ -like	Receptores de Dopamina dos subtipos D ₂ , D ₃ e D ₄
Da	Dalton
DA	Dopamina

DAB	Diaminobenzidina
Den	Núcleo Endopiriforme Dorsal
DG	Giro Denteado
DV	Dorso-ventral
EPSP	Potencial Excitatório Pós-sináptico
Fos-IR	Imunorreativas à Fos
g	Grama
GC	Glicocorticóide
Glu	Glutamato
GluR	Receptor de Glutamato
GluR1-7	Receptores AMPA dos subtipos 1-7
GR	Receptor de Glicocorticóide
HDB	Banda Diagonal do Núcleo Límico Horizontal
HPA	Hipófise-Pituitária-Adrenal
icv	intracerebroventricular
IEG	Gene de Expressão Precoce
iGluR	Receptor Ionotrópico de Glutamato
IPSP	Potencial Inibitório Pós-sináptico
JSTX	Joro Spider Toxin
JSTX-3	Joro Spider Toxin 3
KA	Receptor Cainato
KA1-2	Receptores KA dos subtipos 1-2
KDa	Kilo Dalton
KPBS	Tampão Fosfato de Potássio
LHA	Área Hipotalâmica Lateral
LPO	Área Pré-óptica Lateral
LTD	Depressão de Longa Duração
LTP	Potencial de Longa Duração
Lys	Lisina
m/V	Relação Massa/Volume
MAO	Monoaminoxidase
MDL	Núcleo talâmico Mediodorsal, parte lateral
MDM	Núcleo talâmico Mediodorsal, parte medial

MeAD	Núcleo Medial da Amígdala, parte anterodorsal
Mfb	Componente “b” do Feixe Prosencefálico Medial
mg	miligrama
mGluR	Receptor Metabotrópico de Glutamato
MHb	Núcleo Habenular Medial
mL	mililitro
ML	Médio-lateral
MM	Massa Molecular
MPA	Área Pré-óptica Medial
MPOL	Núcleo Pré-óptico Medial, parte lateral
MPOM	Núcleo Pré-óptico Medial, parte medial
MR	Receptor de Mineralocorticoide
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
N	Número Amostral
ng	Nanograma
NGS	Soro Normal de Cabra
nmol	Nanomol
NMDA	N-metil-D-aspartato
nmol	Nanomol
NPTX-8	Nephilatoxina-8
NR1-NR3	Receptor NMDA dos subtipos 1-3
NSTX-3	Nephilatoxina-3
°C	Grau Celsius
opt	Trato Óptico
Ox	Quiasma Óptico
PaDC	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo, cap dorsal
PaLM	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo, porção magnocelular lateral
PaMP	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo, porção magnocelular medial
PaV	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo, porção ventral
Pe	Núcleo Periventricular do Hipotálamo
pH	Potencial Hidrogeniônico

Pir	Córtex Piriforme
PoDG	Camada Polimorfa do Giro Denteado
POMC	Pró-opiomelanocortina
PTSD	Transtorno por Estresse Pós-traumático
PVA	Núcleo Paraventricular do Tálamo, parte anterior
SNC	Sistema Nervoso Central
SO	Núcleo Supra-óptico
TH	Tirosina Hidroxilase
VDB	Banda Diagonal do Núcleo Límbico Vertical
VLH	Núcleo Hipotalâmico Ventrolateral
VLPO	Núcleo Pré-óptico Ventrolateral
VMPO	Núcleo Pré-óptico Ventromedial
ZI	Zona Incerta
δ-PhTX	δ-Philanthotoxina
μL	microlitro

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de toxinas do tipo poliaminas isoladas dos venenos de aranhas.....	27
Figura 2: Estrutura básica de acilpoliamina do veneno de aranha.....	28
Figura 3: Principais vias de transdução de sinal que induzem Fos em neurônios.....	35
Figura 4: Perfil temporal da indução de genes de expressão precoce (IEG), com o pico de mRNA ocorrendo à 0,5 h e, o de proteína, 2 h após estimulação.....	35
Figura 5: Estrutura e Massa Molecular das acilpoliaminas JSTX-3 e NSTX-3.....	38
Figura 6: Cirurgia para implantação da cânula guia no ventrículo lateral direito do encéfalo de rato.....	41
Figura 7: Regiões Fos-IR após tratamento com NSTX-3 (7,5 nmol).....	51
Figura 8: Regiões Fos-IR após tratamento com NSTX-3 (7,5 nmol).....	52
Figura 9: Regiões Fos-IR após tratamento com JSTX-3 (18 nmol).....	55
Figura 10: Regiões Fos-IR após tratamento com JSTX-3 (18 nmol).....	56
Figura 11: Gráfico do número médio de neurônios, do SNC de ratos Wistar, Fos-IR após administração intracerebroventricular de NSTX-3 7,5 nmol e JSTX-3 8,8 nmol, em relação aos animais controle (salina 0,9% [m/V]).....	57
Figura 12: Gráfico do número médio de neurônios, do SNC, Fos-IR após administração intracerebroventricular de NSTX-3 7,5 nmol e JSTX-3 8,8 nmol, relacionadas entre si, estatisticamente.....	58

Figura 13: Gráfico do número médio de neurônios Fos-IR, do SNC de ratos Wistar, após administração intracerebroventricular de NSTX-3 15 nmol e JSTX-3 18 nmol, em relação aos animais controle (salina 0,9% [m/V]).....	59
Figura 14: Gráfico do número médio de neurônios Fos-IR, do SNC de ratos Wistar, após administração intracerebroventricular de NSTX-3 15 nmol e JSTX-3 18 nmol, relacionadas entre si, estatisticamente.....	60
Figura 15: O eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) responde a estressores agudo e crônico. ACTH: adrenocorticotrofina; AVP: vasopressina-arginina, CRF: fator liberador de corticotrofina; POMC: pro-opiomelanocortina.....	61
Figura 16: Principais componentes da cascata de resposta ao estresse.....	63
Figura 17: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de receptor GluR1 (em marrom) após administração icv da acilpoliaminotoxina NSTX-3 (7,5 nmol).....	67
Figura 18: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de receptor GluR2,3 (em marrom) após administração icv da acilpoliaminotoxina NSTX-3 (7,5 nmol).....	68
Figura 19: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de receptor GluR4 (em marrom) após administração icv da acilpoliaminotoxina NSTX-3 (7,5 nmol).....	69
Figura 20: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de tirosina hidroxilase (TH) (em marrom) após administração icv da acilpoliaminotoxina NSTX-3 (7,5 nmol).....	70
Figura 21: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de receptor GluR1 (em marrom) após administração icv da acilpoliaminotoxina JSTX-3 (18 nmol).....	73

Figura 22: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de receptor GluR2,3 (em marrom) após administração icv da acilpoliaminotoxina JSTX-3 (18 nmol).....	74
Figura 23: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de receptor GluR4 (em marrom) após administração icv da acilpoliaminotoxina JSTX-3 (18 nmol).....	75
Figura 24: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de tirosina hidroxilase (TH) (em marrom) após administração icv da acilpoliaminotoxina JSTX-3 (18nmol).....	76
Figura 25: Interação de acilpoliaminas com receptores do subtipo AMPA.....	79
Figura 26: Esquema do corte sagital do encéfalo de ratos indicando as áreas com neurônios Fos-IR após administração <i>icv</i> de NSTX-3 7,5 nmol (A) e JSTX-3 18 nmol (B) e os principais subtipos de receptores neuronais ativados por tais toxinas.....	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Toxinas que atuam em Receptores de Glutamato.....	26
Tabela 2: Média do número de neurônios Fos-IR ($\pm$ SD), do encéfalo de ratos Wistar, após a administração de diferentes doses de NSTX-3, em relação aos animais controle.....	50
Tabela 3: Média do número de neurônios Fos-IR ($\pm$ SD), do encéfalo de ratos Wistar, após a administração de diferentes doses de JSTX-3, em relação aos animais controle.....	54
Tabela 4: Número de Células (em %) imunorreativas a Fos e a receptores de glutamatérgicos (GluR1, GluR2,3 e GluR4) e Fos e à tirosina hidroxilase (TH), após administração de NSTX-3, dose 7,5 nmol.....	71
Tabela 5: Número de Células (em %) imunorreativas a Fos e a receptores de glutamato (GluR1, GluR2,3 e GluR4) e a Fos e à tirosina hidroxilase, após administração de JSTX-3, dose 18 nmol.....	77
Tabela 6: Principais sítios de ação das toxinas NSTX-3 e JSTX-3 no SNC de ratos.....	80

RESUMO

As neurotoxinas são excelentes ferramentas moleculares para ativar ou bloquear seletivamente diversos componentes do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, incluindo neuroreceptores, neurotransmissores e canais iônicos. O conhecimento das estruturas e dos mecanismos de ação de diferentes neurotoxinas pode direcionar o desenvolvimento de drogas mais eficazes no tratamento de doenças neurológicas. Durante as décadas de 80 e 90, os compostos de baixas massas moleculares oriundos das secreções tóxicas de aranhas e vespas foram alvos de intensa investigação, as toxinas de aranhas *Nephilinae*, como NSTX-3 e JSTX-3 são exemplos caracterizados estrutural e funcionalmente. Estudos sobre a função dessas toxinas foram realizados *in vitro* em junções neuromusculares de crustáceos e em preparações de porções encefálicas de mamíferos. Já os estudos realizados *in vivo* contemplaram a avaliação comportamental de camundongos, usados como modelo experimental, em detrimento dos aspectos bioquímicos da ação de toxinas. Considerando-se a importância da estrutura desses compostos para a ligação a receptores de membrana e a elevada similaridade das estruturas moleculares das acilpoliaminas NSTX-3 e JSTX-3 a proposta deste trabalho foi a caracterização funcional *in vivo* dessas duas toxinas. Essas toxinas possuem o mesmo grupo cromóforo e uma longa cadeia de poliaminas, que se diferenciam apenas pela presença de um grupo arginil na extremidade da cadeia da NSTX-3. As acilpoliaminotoxinas NSTX-3 e JSTX-3 foram administradas no ventrículo lateral do cérebro de ratos Wistar (*icv*), e tiveram suas ações mapeadas no SNC pela análise da proteína Fos. A administração *icv* da NSTX-3 resultou na ativação de regiões encefálicas relacionadas às vias de resposta ao estresse (hipotálamo), controle das emoções (amígdala e tálamo), resposta a estímulos aversivos (córtex piriforme). Já a JSTX-3, promoveu aumento da proteína Fos em regiões do SNC relacionadas à memória e aprendizado (hipocampo). Ambas as toxinas ativaram vias de resposta ao estresse (hipotálamo) e a estímulos aversivos (córtex piriforme). Os neurônios imunorreativos à Fos foram caracterizados por meio de duplas marcações, com anticorpos para receptores glutamatérgicos (GluR1, GluR2/3, GluR4) e para o marcador molecular, tirosina hidroxilase (TH), com o objetivo de identificar os sítios de ação de ambas as toxinas. Observa-se uma intensa interação da NSTX-3 com

receptores GluR2,3 na amígdala, região que auxilia na consolidação da memória e comportamentos de medo. Já a JSTX-3 interage intensamente com receptores GluR1 e GluR4 em células hipocâmpais, estrutura envolvida em processos cognitivos. Ambas as acilpoliaminas se ligam a neurônios do sistema dopaminérgico no hipotálamo, estrutura que auxilia na resposta a eventos aversivos. Os resultados desse trabalho sugerem que as toxinas NSTX-3 e JSTX-3 podem ser utilizadas como ferramentas moleculares em pesquisas direcionadas às doenças neurológicas que envolvam estresse, depressão, memória e aspectos emocionais, como o medo.

Palavras-chave: Bioprospecção. Acilpoliaminas. Desenvolvimento de Drogas. Relação Estrutura/Função. Neuroproteção.

ABSTRACT

The neurotoxins are excellent tools for the selective activation or blockage of different components of the central nervous system (CNS) of mammals, including neuroreceptors, neurotransmitters and ion channels. The understanding of different neurotoxins structures and mechanisms of action can direct the development of effective drugs for the therapy of neurological diseases. Since the 80 and 90's, the compounds of low molecular masses from the toxic secretions of spiders and wasps have been one of the main targets of research in this field. The toxins of *Nephilinae* spiders such as NSTX-3 and JSTX-3 are examples of well known low molecular mass toxins. Studies developed to elucidate part of their actions were performed *in vitro* both in crustacean neuromuscular junctions and in portions of mammalian brains. Studies were performed *in vivo*, analyzing mice behaviors upon the effect toxin administration, as an experimental model, in detriment of the action of toxins. Considering the importance of the structure of these toxins for the binding to membrane receptors and the high structural similarity between these acylpolyamines, the goal of this study was to carry-out a comparative functional characterization *in vivo* of both toxins. They possess the same aromatic group and a long-chain of polyamines, which differ from each other only by the presence of an arginyl group at the end of polyamine chain of NSTX-3. The acylpolyaminetoxins NSTX-3 and JSTX-3, were administered in lateral ventricle of rats brain (*icv*), and their sites of action were mapped through the detection of Fos protein. The *icv* administration of NSTX-3 resulted in activation of brain regions related to response to stress (hypothalamus), emotions control (amygdala and thalamus), respond to aversive stimuli (piriform cortex). Meanwhile, JSTX-3 increased Fos protein in regions of CNS related to memory and learning (hippocampus). Both toxins activated pathways of stress response (hypothalamus) and response to aversive stimuli (piriform cortex). The immunoreactive neurons to Fos were characterized by double staining using antibodies for glutamate receptors (GluR1, GluR2/3, GluR4) and for the molecular marker, tyrosine hydroxylase (TH), to identify the sites of action of acylpolyamines. The results revealed a high interaction of the acylpolyamine NSTX-3 to the GluR2,3 receptors on amygdala, region related with memory consolidation and fear behavior. On the other hand, JSTX-3 interacts with GluR1 and GluR4 receptors on hippocampus, structure related to cognitive processes. Both acylpolyamines

activated dopaminergic system, in hypothalamus, region involved in the response to aversive events. The results presented here suggest that these neurotoxins can be used as molecular tools in researches involving neurological diseases which involves stress, depression, memory and emotional aspects.

Key words: Acylpolyaminetoxins. Development of Drugs. Structure/Function Studies. Neuroprotection.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A Ordem Aranaea é constituída por 40.700 espécies agrupadas em 3.733 Gêneros e 109 Famílias (PLATNICK, 2009), entre elas a família Nephilinae que agrupa as aranhas *Nephila clavata* e *Nephila maculata*. Os primeiros fósseis de aranhas remetem ao período Carbonífero, cerca de 300 milhões de anos (PLATNICK, 1993 apud RASH e HODGSON, 2002). Dada à idade evolutiva das aranhas e as pequenas variações morfológicas ocorridas neste grupo, acredita-se que seus venenos tenham se desenvolvido muito rapidamente (BETTINI e BRIGNOLI, 1978 apud RASH e HODGSON, 2002).

O Brasil tem inúmeras espécies de aranhas da família Araneidae, entretanto, pouco se sabe sobre a composição química, estrutura e mecanismos de ação destas toxinas.

As secreções tóxicas de aranhas têm como principal propósito a paralisia ou morte da presa, mas também podem auxiliar na pré-digestão de presas e em mecanismos defensivos. Assim como ocorre em outros animais como serpentes e escorpiões, os venenos de aranhas são heterogêneos não somente entre as espécies como também intra-espécie.

Nesse contexto, o estudo do veneno de aranhas possui grande importância devido ao grande número de espécies, pelo poder de adaptação ativa desses animais às variações do ambiente e, finalmente pela existência de espécies cuja picada e inoculação do veneno podem ser perigosas para humanos (BUCHERL, 1971).

Venenos de aranhas são misturas complexas, constituídos de sais e íons inorgânicos (Ca^{2+} , Na^{2+} , K^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-), ácidos livres (cítrico, láctico, dididrofenilacético), glicose, aminoácidos livres, aminas biogênicas (espermina, espermidina, putrescina, cadaverina), neurotransmissores (glutamato, aspartato, GABA, histamina, dopamina, serotonina, epinefrina, epinina), peptídeos e proteínas. A diversidade e abundância dos componentes do veneno podem refletir a importância relativa na dieta de aranhas, ingerindo insetos e vertebrados, além de demonstrar uma adaptação a diferentes nichos ecológicos e modos de predação (ESCOUBAS et al., 2000; RASH e HODGSON, 2002).

Os avanços nas técnicas de isolamento de moléculas, determinação das

estruturas primárias, modelagem e dinâmica molecular têm permitido a descoberta de novas moléculas. Entre esses compostos, as neurotoxinas de muitas espécies de aranhas ganham destaque (KAWAI e NAKAJIMA, 1993).

Considerando-se que a principal finalidade do veneno de aranhas é a paralisia de presas, as aranhas produzem uma variedade de toxinas que atuam no sistema nervoso e que se caracterizam por sua rápida ação, afetando principalmente transmissões sinápticas, bloqueando canais de cálcio e atuando em receptores glutamatérgicos (GRISHIN, 1994). Também aparecem na composição desses venenos substâncias de efeitos locais, responsáveis por causar inflamação e dor, podendo intensificar a ação neurotóxica de outros compostos (ATINKSON e WRIGHT, 1992).

Inúmeras toxinas de artrópodes já foram isoladas e sintetizadas (JACKSON e SCHEIDELER, 1996). Seus sítios de ação no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos podem incluir canais iônicos, receptores neuronais ou proteínas de membranas pré-sinápticas envolvidas na liberação de neurotransmissores (KONNO et al., 2000; PIZZO et al., 2000; YOKOTA et al., 2001; CARNEIRO et al., 2003; FONTANA et al., 2003; PIZZO et al., 2004).

Assim, essas moléculas representam uma fonte valiosa de modelos nos estudos dos mecanismos de transmissão sináptica (USHERWOOD e BLAGBROUGH, 1991; OLIVERA e CRUZ, 2001), auxiliando na descoberta de novos inseticidas e também na bioprospecção de novas drogas para os tratamentos de doenças neurológicas (QUISTAD et al., 1991; BLOOMQUIST et al., 1996; HARVEY et al., 1998; HEADING, 2002).

Kawai e Nakajima (1993) classificaram as toxinas dos venenos de aranhas em três grandes grupos, de acordo com as massas moleculares e ação fisiológica: I. as toxinas de Elevadas Massas Moleculares ($MM > 10$ KDa) com ação nas terminações nervosas pré-sinápticas, abrindo canais catiônicos; II. as toxinas de Massas Moleculares entre $3 < MM < 10$ KDa que atuam no bloqueio de canais de cálcio, em axônios pré-sinápticos, como por exemplo, as agatoxinas; e III. as toxinas de Baixas Massas Moleculares ($MM < 1$ KDa), do tipo acilpoliaminas, características da família Araneidae, que agem nos receptores de glutamato na transmissão de estímulos pós-sinápticos. Este último grupo ainda pode ser subdividido em outras classes de acordo com a natureza química da toxina (MARQUES et al., 2004).

Acilpoliaminas, peptídeos e proteínas são os tipos de compostos mais relevantes e estudados do arsenal tóxico do veneno de aranhas e vespas (McCORMICK e MEINWALD, 1993; OLIVEIRA et al., 1994). Dentre esses, as acilpoliaminas se destacam pela sua potencial aplicabilidade clínica.

Os primeiros componentes do veneno de aranhas a serem estudados foram as poliaminotoxinas, encontradas tanto em veneno de aranhas Araneomorpha (aranhas derivadas) como em Mygalomorpha (aranhas basais) e em veneno de vespas parasíticas (KING, 2004). Alguns exemplos estão mostrados na Tabela 1 (BELEBONI et al., 2004).

As acilpoliaminas, consideradas um elo natural entre venenos de vespas e aranhas, são compostos não-oligoméricos de baixas massas moleculares, porém de elevado potencial de interação com canais iônicos ou receptores. Esta elevada especificidade e afinidade de toxinas com seus alvos neuronais podem apresentar efeitos pró-convulsivantes (SANDOVAL & LEBRUN, 2003) ou anti-convulsivante (WANG et al., 2001; CAIRRÃO et al., 2002), sendo de fundamental importância em estudos neurobiológicos. Os alvos potenciais das acilpoliaminas são receptores de aminoácidos excitatórios do sistema nervoso de mamíferos e insetos.

As acilpoliaminotoxinas, presentes apenas nas glândulas de veneno de aranhas e vespas e especificamente envolvidas na paralisia da presa (MUELLER et al., 1995), podem ser subdivididas em 2 grupos: Acilpoliaminas contendo resíduos de aminoácidos em sua estrutura geral e as acilpoliaminas que não apresentam resíduos de aminoácidos.

Até o por volta do ano 2000, foram utilizadas três nomenclaturas diferentes para nomear estas toxinas: NSTX, nephilatoxina inicialmente isolada do veneno da aranha *Nephila maculata*; JSTX, toxina inicialmente isolada do veneno aranha *Nephila clavata*, conhecida no Japão como Joro Spider e, argiotoxina, inicialmente isolada do veneno de aranhas do gênero *Argiope*. Todas estas toxinas são estruturalmente relacionadas entre si.

Tabela 1: Toxinas que atuam em Receptores de Glutamato*

Toxina	Origem	Natureza Química	Principais Ações	Referências
Argiopines, argiopinines e pseudoargiopinines	Aranha <i>Argiope</i> sp	Acilpoliamina	Bloqueia receptores dos tipos glutamato e cainato ativados, voltagem-dependentes. Em altas concentrações, também bloqueiam receptores acetilcolinérgicos.	Kiskin et al. (1989)
Argiotoxina (Arg-636), α -agatoxina-489 (Agel-489) e α -agatoxina-505 (Agel-505)	Aranha <i>A.lobata</i> e <i>A. aperta</i>	Acilpoliamina	Potente bloqueador de receptores do sub-tipo AMPA e/ou NMDA, em cultura de células granulares de cerebelo.	Adams et al. (1989), Fagni and Bockaert (1995), Williams (1993)
Joro spider toxin (JSTX)	Aranha <i>N. clavata</i>	Acilpoliamina	Bloqueia especificamente receptores do sub-tipo AMPA em sinaptossomas corticais. Não-competitivo.	Kawai et al. (1982, 1983)
Joro spider toxin 3 (JSTX-3)	Aranha <i>N. clavata</i>	Acilpoliamina	Antagonista específico de receptores do sub-tipo AMPA em SNC de mamíferos.	Himi et al. (1990)
Nephilatoxina-3 (NSTX-3)	Aranha <i>N. maculata</i>	Acilpoliamina	Bloqueador não-competitivo de receptores de glutamato.	Blagbrough et al. (1996)
δ -Philanthotoxina (δ -PhTX)	Vespa <i>P. triangulum</i>	Acilpoliamina	Bloqueia canais abertos de receptores de glutamato juncional e extrajuncional, em músculo de gafanhoto. Em ovócitos de <i>Xenopus</i> expressam clones de receptores GluR ₁ , GluR ₂ e NMDA, cainato e NMDA, ação antagonista-reversível.	Clark et al. (1982), Eldefrawi et al. (1988), Brackley et al. (1993)
<i>P. negrивenter</i> Peptídeo toxina 4	Aranha <i>P. negrивenter</i>	Peptídeo 5175 Da	Inibe de modo reversível receptores do sub-tipo NMDA em neurônios hipocâmpais de ratos.	De Figueiredo et al. (2001)

(*) Beleboni et al., 2004.

Apesar de acilpoliaminas estarem presentes no veneno de aranhas de diferentes gêneros e nichos ecológicos, há elevada similaridade estrutural entre as moléculas (Figura 1). A estrutura básica consiste de uma cadeia de poliaminas, com um anel aromático numa extremidade, e um grupamento amina ou guanidina em outra (Figura 2). No caso das toxinas NSTX-3 e JSTX-3 o anel aromático é o 2,4-dihidroxifenilacetil. Variações nos componentes das poliaminas incluem diferenças nos números de grupos metileno separados por grupos amina, ou pela presença de amidas, como ocorre nos casos das poliaminas NSTX-3 e JSTX-3.

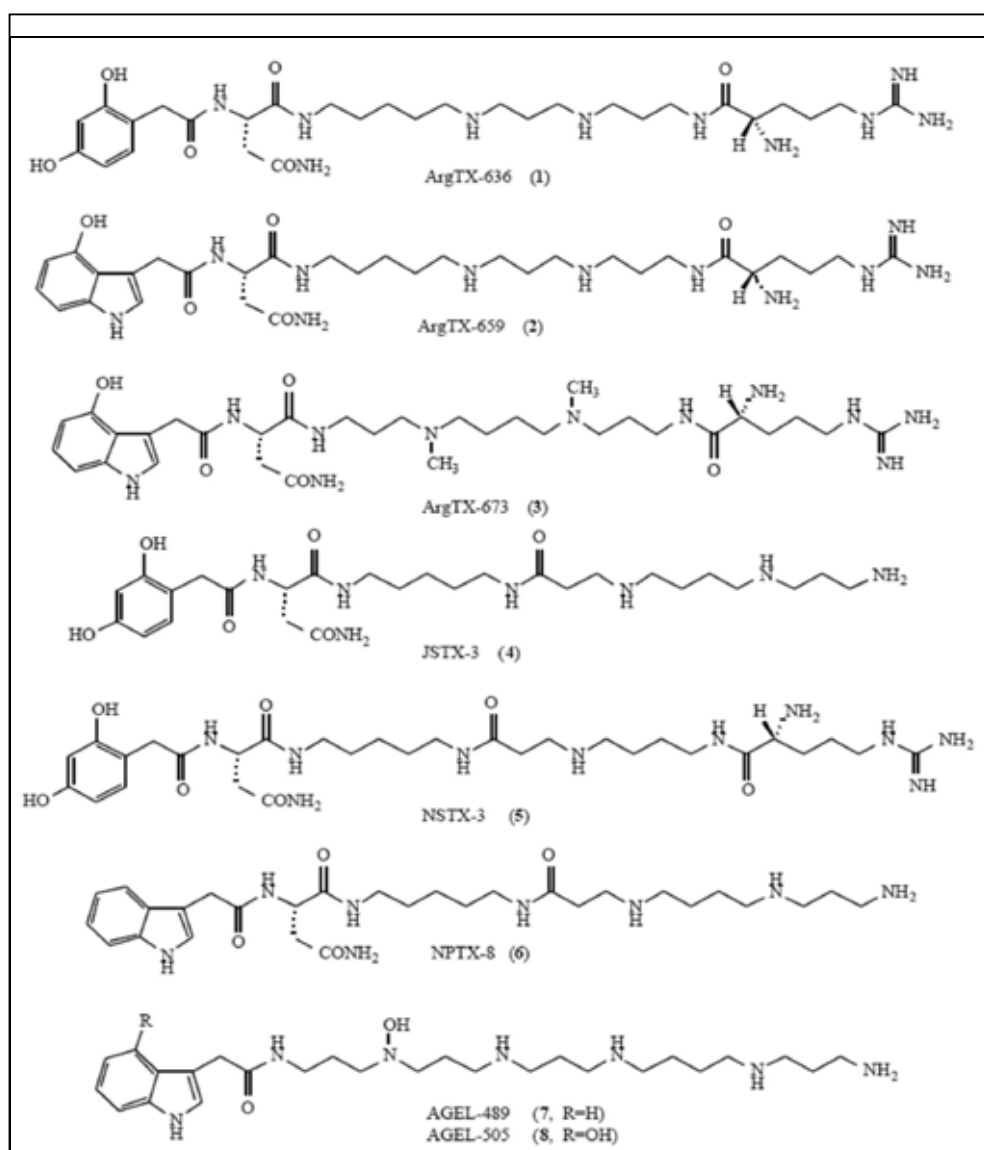


Figura 1: Exemplos de toxinas do tipo poliaminas isoladas dos venenos de aranhas (HISADA et al., 1998).

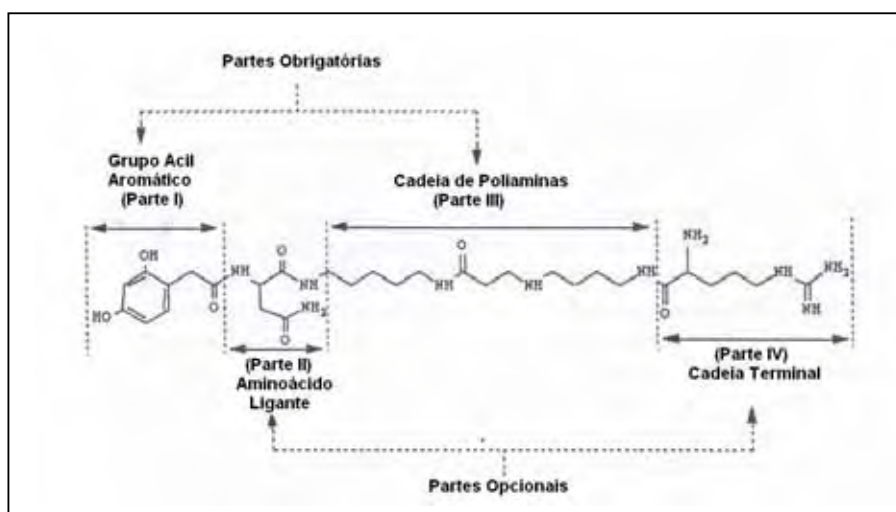


Figura 2: Estrutura básica de acilpoliamina do veneno de aranha (PALMA e NAKAJIMA, 2005).

Presumivelmente, a estrutura contendo a cadeia poliamina tem um papel importante na ligação da toxina ao receptor de glutamato, fazendo com que esta module a atividade tóxica (KAWAI & NAKAJIMA, 1993). A presença de resíduos de aminoácidos básicos, e, portanto, de cargas positivas na porção terminal (“cauda”) da cadeia de acilpoliaminas é muito importante para o seu potencial de bloquear receptores de glutamato, determinando a irreversibilidade de ação dessas toxinas (PALMA et al., 1998).

As acilpoliaminas isoladas dos venenos de aranhas e vespas também apresentam similaridades farmacológicas, que incluem uma variedade de atividades neurológicas, como por exemplo, ação bloqueadora nas junções neuromusculares de insetos, e ação primariamente em receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR). De modo geral, acilpoliaminas que contêm aminoácidos em sua “cauda” atuam de forma similar em junções neuromusculares de insetos, provocando abertura de canais (uso-dependente), de ação irreversível ou com reversão muito lenta, bloqueando de modo não-competitivo receptores glutamatérgicos (JACKSON e PARKS, 1989). Entretanto, seu modo de ação, suas seletividade e especificidade por receptores de glutamato em vertebrados são controversas (RASH e HODGSON, 2002).

O L-glutamato (ácido glutâmico) é considerado o mediador de sinais excitatórios de maior importância tanto em SNC de mamíferos quanto no sistema nervoso periférico de insetos. O glutamato também está envolvido em diversas

funções cerebrais de mamíferos, incluindo aspectos cognitivos, da memória e aprendizado (FONNUN, 1984; COLLINGRIDGE e LESTER, 1989).

A caracterização de antagonistas de receptores de glutamato isoladas do veneno de aranhas teve início na década de 80 e possui papel importante na compreensão da fisiologia de receptores e neurotransmissores no sistema nervoso. A ativação excessiva de receptores glutamatérgicos está envolvida e é parcialmente responsável por danos cerebrais ocorridos nos transtornos neurológicos, e também em diversas doenças neurodegenerativas como Huntington, Alzheimer, esclerose amiotrófica lateral (ALS), AIDS encefalopática e epilepsia (COUTINHO-NETTO et al., 1981; OLNEY, 1990; VAJDA, 2002, PELLEGRINI-GIAMPIETRO et al., 1997). O desenvolvimento de antagonistas de glutamato capazes de bloquear subtipos específicos de receptores glutamatérgicos mostra-se de suma importância para o surgimento de terapias para essas doenças.

Muitos neurônios e células da glia apresentam receptores glutamatérgicos em suas membranas plasmáticas (BERGLES et al., 2000). Estes receptores são caracterizados em duas classes principais, de acordo com as diferenças nos mecanismos intracelulares de transdução de sinal e homologias moleculares, são eles: receptores metabotrópicos (mGluRs) e receptores ionotrópicos (iGluRs).

Receptores metabotrópicos são associados às proteínas G intracelulares e são subdivididos em oito subtipos funcionalmente distintos: mGluR1 a mGluR8 (PIN e DUVOISIN, 1995; CONN e PIN, 1997).

Já os receptores ionotrópicos são canais iônicos permeáveis a cátions específicos e são subdivididos em NMDA (do inglês, *N-methyl-D-aspartate*) subdivididos em NR1, NR2A-2D e NR3A-B; AMPA (do inglês, *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid*) subdivididos em GluR1-4 e GluR5-7, e KA (cainato) subdivididos em KA1 e KA2 (STROMGAARD et al., 2001). Os receptores NMDA e AMPA regulam transmissões sinápticas excitatórias rápidas e coexistem em muitas sinapses cerebrais.

Os três subtipos de receptores ionotrópicos de glutamato (AMPA, NMDA e KA) são altamente expressos no hipocampo, sendo os subtipos AMPA e NMDA encontrados preferencialmente na região CA1, e o subtipo KA, especialmente na região CA3 do hipocampo (GREENAMYRE et al., 1985). Entretanto, não se sabe se receptores glutamatérgicos ionotrópicos são localizados apenas em elementos pós-sinápticos no hipocampo, ou se são transportadas por projeções hipocampoestriatal

para atuar como autorreceptores nas terminações inervadas do nucleus accumbens e do caudatum putamen (TARAZI e BALDESSARINI, 1999).

Receptores NMDA diferem dos AMPA em dois importantes aspectos. Os receptores NMDA, quando abertos, são permeáveis a íons Ca^{2+} e Na^+ , enquanto receptores AMPA são permeáveis tanto a íons Na^+ como a íons K^+ . Além disso, os receptores NMDA são voltagem-dependentes.

As subunidades do receptor NMDA, NR1, NR2A-D e NR3A-B são codificadas por sete diferentes genes. Cada uma tem distribuição única no SNC, relacionada às suas funções específicas e aos efeitos positivos e negativos que a droga pode ter em cada subunidade (NILSSON et al., 2007).

Receptores NMDA funcionais são heterômeros de quatro subunidades (LAUBE et al, 1998; ROSENMUND et al, 1998) e baseados nos estudos farmacológicos e eletrofisiológicos tem-se inferido que receptores NMDA são agrupamentos de 2 subunidades NR1 e 2 subunidades NR2 (BEHE et al., 1995), provavelmente arranjados como heterodímeros de dímeros ao redor de canais iônicos permeáveis a Ca^{2+} (SCHORGE e COLQUHOUN, 2003; FURUKAWA et al., 2005). O subtipo NR1 é expresso ubiquitariamente no cérebro e no cordão espinhal durante o desenvolvimento e a fase adulta (MORIYOSHI et al., 1991).

Apesar de apresentarem uma distribuição no SNC bastante significativa, pouco se sabe sobre as funções dos receptores cainato. A principal dificuldade nos estudos funcionais desse tipo de receptor está na inviabilidade de distinguir entre as suas subunidades e entre receptores AMPA e cainato, com o uso de drogas (BEAR et al., 1996).

As catecolaminas são estruturalmente semelhantes e são capazes de serem convertidas umas nas outras. Receptores de dopamina (DA) são subdivididos em dois grupos principais: D_1 -like (D_1 , D_5) e D_2 -like (D_2 , D_3 e D_4). Esses grupos compartilham propriedades moleculares e neurofarmacológicas, mas diferem quanto à abundância relativa e à distribuição anatômica no cérebro de mamíferos (TARAZI e BALDESSARINI, 1999).

Assim como receptores iGlu, receptores de DA são encontrados no complexo estriatal (caudatum putamen e nucleus accumbens) e no hipocampo de ratos (TARAZI e BALDESSARINI, 1999). D_1 -like e D_2 -like (incluindo o D_4) são encontrados no hipocampo de ratos, principalmente na região CA1 do hipocampo (CAMPS et al., 1990).

Os diferentes tipos de receptores dopaminérgicos funcionam por meio de segundo mensageiros, podendo o efeito pós-sináptico ser inibitório ou excitatório. A dopamina é rapidamente captada pela terminação pré-sináptica, a partir da fenda sináptica. Na terminação sináptica, a dopamina captada é degradada por monoaminooxidases (MAO). Por ter duração tão efêmera no neurônio, para detecção imunoistoquímica de neurônios dopaminérgicos, pode-se utilizar a tirosina hidroxilase, enzima essencial para a síntese de dopamina.

As acilpoliaminotoxinas, como as argiotoxinas de *Argiope sp* e as nephilatoxinas, de *Nephila sp* interagem com os receptores de glutamato dos canais de cálcio somente quando os mesmos encontram-se ativados. Estas toxinas dependem da ligação do glutamato aos seus receptores, pré-ativando-os, para então bloquearem os canais ativos. Esta é, portanto, uma classe de toxinas antagonistas não-competitivos ao glutamato (CÉSAR, 2001).

Estudos têm mostrado que poliaminas como JSTX-3, ArgTX-636, PhTX-433 e PhTX-343 são antagonistas de receptores do subtipo AMPA e KA permeáveis a íons Ca^{2+} (STROMGAARD et al., 2001), sendo que a caracterização de poliaminotoxinas tem sido feita através de diferentes ensaios em sistemas de vertebrados e invertebrados. A ação das poliaminas, em muitos casos, é voltagem-dependente, embora exceções tenham sido relatadas (STROMGAARD et al., 2001). Apesar de não ser consenso que o sítio de ligação de canais iônicos seja único, acredita-se que as poliaminas sejam antagonistas de tais canais por apresentarem alta afinidade por este sítio.

As primeiras acilpoliaminas foram caracterizadas na década de 80, onde argiotoxinas foram identificadas a partir do veneno da aranha *Argiope lobata* por Grishin et al. (1986). Também em 1986, Aramaki et al. elucidaram as estruturas de mais duas acilpoliaminas, NSTX-3 e JSTX-3, isoladas dos venenos de *Nephila clavata* e *Nephila maculata*, respectivamente. Palma et al. (1998) elucidaram uma acilpoliamina do veneno da aranha brasileira *Nephilengys cruentata*, denominando-a NPTX-801E, estrutura isômera à NPTX-2 de *Nephila clavata*.

Embora algumas poliaminas sejam tóxicas para vertebrados após administração intracerebral, elas são essenciais na atividade inseticida e são responsáveis pela rápida paralisia de insetos durante a predação. A paralisia é mediada por um bloqueio rápido e reversível de junções neuromusculares de insetos, onde o glutamato é o principal neurotransmissor (ESCOUBAS et al., 2000).

KAWAI e NAKAJIMA (1993) estudaram o comportamento de ratos após a injeção de Nephilatoxinas (NSTX) no ventrículo lateral cerebral e observaram que os animais, sob ação da droga, tiveram a memória inibida, sem, contudo, apresentarem comprometimento de novos aprendizados.

Em 1993, KAWAI e NAKAJIMA analisaram comparativamente três análogos da NSTX-3, nos quais promoveram a substituição de uma Arginina por um aminoácido ácido asparagina (Asp), um aminoácido neutro alanina (Ala) ou um aminoácido básico lisina (Lys). Os derivados contendo Ala e Lys apresentaram supressão irreversível dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (EPSPs, do inglês, *Excitatory Postsynaptic Potentials*); contrariamente, o derivado contendo Asp mostrou atividade intensamente reduzida. Tais resultados sugerem que a carga positiva na posição da Arginina na estrutura da NSTX-3 é de fundamental importância na atividade bloqueadora do receptor de glutamato.

Kawai et al. (1982, 1983, 1991) caracterizaram as toxinas de *Joro spider* (JSTX), que suprimem os EPSPs, em junções neuromusculares de lagosta e bloqueia especificamente receptores glutamatérgicos dos subtipos AMPA e NMDA (INO et al., 1990) em sinaptossomas corticais de camundongos.

Administrações intracerebroventriculares, em camundongos, de elevadas doses de JSTX-3 (doses superiores a 12 nmol/animal) promoveram aumento da atividade locomotora nesses animais. Entretanto, em doses menores (4,7 nmol/animal), a toxina não provocou nenhuma alteração comportamental atípica, (HIMI et al., 1990).

Mais recentemente, têm-se mostrado que as toxinas, como a JSTX-3, não afetam o potencial do hipocampo por longos períodos, contrariamente ao que ocorre com a maioria dos outros antagonistas de receptores NMDA (ALBENSI et al., 2000). Estas ações podem representar avanços terapêuticos, assim, têm-se sugerido o uso clínico de tais toxinas no tratamento de distúrbios neurológicos.

O modo de ação bloqueador das JSTXs foi investigado principalmente nas sinapses neuromusculares de crustáceos, uma vez que a transmissão em crustáceos assemelha-se àquela encontrada em insetos, muitos dos quais são presas de tal espécie de aranha. A JSTX suprime irreversivelmente os EPSPs e o potencial de glutamato de junções neuromusculares de lagosta com elevado grau de especificidade (KAWAI et al., 1984). As JSTXs bloqueiam os EPSPs, sem afetar os potenciais inibitórios pós-sinápticos (IPSPs) (KAWAI e NAKAJIMA, 1993). Quando

registros simultâneos são feitos em axônios pré e pós-sinápticos e a JSTX é aplicada, os potenciais pós-sinápticos são completamente bloqueados, enquanto os potenciais pré-sinápticos ficam inalterados (KAWAI et al., 1983).

Estudos sobre as interações entre JSTX e receptores de aminoácidos excitatórios do SNC, revelaram que a JSTX bloqueia receptores de glutamato dos tipos AMPA e NMDA (KAWAI e NAKAJIMA, 1993; INO et al., 1990). A despolarização induzida pela aplicação iontoforética do glutamato foi suprimida prontamente pela JSTX, mas a despolarização induzida por aspartato mostrou-se muito menos sensível à toxina (SAITO et al., 1989).

Estudos preliminares realizados por nosso grupo (Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica – CEIS/IBRC/UNESP), analisando-se o efeito de toxinas sintéticas em insetos, como a NSTX-3 e JSTX-3, concluíram que tais toxinas apresentam efeito paralisante em *Apis mellifera* em concentrações de $3,41 \pm 0,68$ ng/mg de abelha e $5,69 \pm 1,58$ ng/mg de abelha, respectivamente.

Algumas poliaminas também são endógenas, sendo encontradas no cérebro de mamíferos com diferentes perfis de distribuição e em concentrações relativamente elevadas. As poliaminas endógenas atuam na regulação da transcrição gênica e a tradução de proteínas, ao se ligarem covalentemente ao DNA, RNA, proteínas e fosfolipídeos conferindo estabilidade a esses processos metabólicos. Também são conhecidas por ativarem proteínas e vias de sinalização.

As poliaminas também têm sido relacionadas com patologias cerebrais, como isquemia cerebral. Por exemplo, a biossíntese de poliaminas é aumentada após isquemia cerebral, por indução da ornitina descarboxilase, uma enzima da via metabólica das poliaminas. As poliaminas são metabolizadas por poliaminas-oxidases, após a acetilação para produção de aldeídos de diferentes citotoxicidades e espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, favorecendo danos protéicos, lipídicos e nos ácidos nucleicos. As poliaminas têm sido extensivamente estudadas na isquemia cerebral, particularmente quando da resposta neuronal associada à excitotoxicidade mediada por receptores NMDA (TAKANO et al., 2005).

Ações neurotóxicas induzidas pela administração intracerebral de toxinas de artrópodes podem não provocar alterações comportamentais aparentes em ratos. Por esta razão, opta-se pela técnica imunoistoquímica, uma técnica mais específica de análise, para avaliação da proteína Fos, um marcador de atividade neuronal (DRAGUNOW e FAULL, 1989).

Desde a descoberta de sua aplicabilidade em estudos de neurobiologia, o gene *c-fos* vem sendo extensivamente utilizado como marcador de atividade neuronal no SNC por diversas razões, entre as quais: I) *c-fos* é expresso em baixos níveis no SNC em condições basais; II) a resposta induzida é estereotipada pela sinalização extracelular, podendo ser desencadeada por íons, fatores de crescimento, neurotransmissores, drogas (Figura 3); III) a resposta é transitória; IV) a detecção da expressão de *c-fos*, seja pelo mRNA *c-fos* como pela proteína Fos, é relativamente simples; V) pode ser associada a outros marcadores, como neuropeptídeos, mRNAs, proteínas, traçadores retrógrados; VI) *c-fos*, como parte do fator de transcrição que se liga ao promotor AP-1, está diretamente envolvido na regulação de genes expressos “tardiamente” e na indução transcricional em células-alvo (KOVÁCS, 2008).

Apesar de a proteína Fos ser encontrada em neurônios em condições basais, apenas variações nas transmissões sinápticas aferentes e/ou alterações decorrentes de estímulos externos induzem a expressão de *c-fos* (LUCKMAN et al., 1994) e resultam na reprogramação fenotípica da célula. Geralmente, a cinética da resposta de *c-fos* a estímulos agudos é efêmera, sendo o pico de expressão de mRNA observado cerca de 30 minutos após o estímulo e, o de proteína Fos, no intervalo entre 90 – 120 minutos (Figura 4). Em alguns casos, pode-se observar um atraso e/ou prolongamento da expressão de genes de expressão precoce (IEG, do inglês, *immediate-early gene*), como o *c-fos*, em algumas regiões do cérebro (CULLINAN et al., 1995). Entretanto, essa variação na expressão gênica é insignificante para os estudos de circuitos neuronais, após estimulação.

Em ratos, há aumento de células Fos-imunorreativas (Fos-IR ou FLI) em regiões cerebrais específicas durante estresse ameno, como estímulo tátil (MACK et al, 1992) e contenção física por curto espaço de tempo (CHASTRETTE e PFAFF, 1991) e também durante sessões de estresse severo, como choques inescapáveis nas patas (CAMPEAU e HAYWARD, 1991; PEZZONE e LEE, 1992). Dessa forma, este segundo mensageiro pode ser utilizado no monitoramento da comunicação celular decorrente da presença estressores.

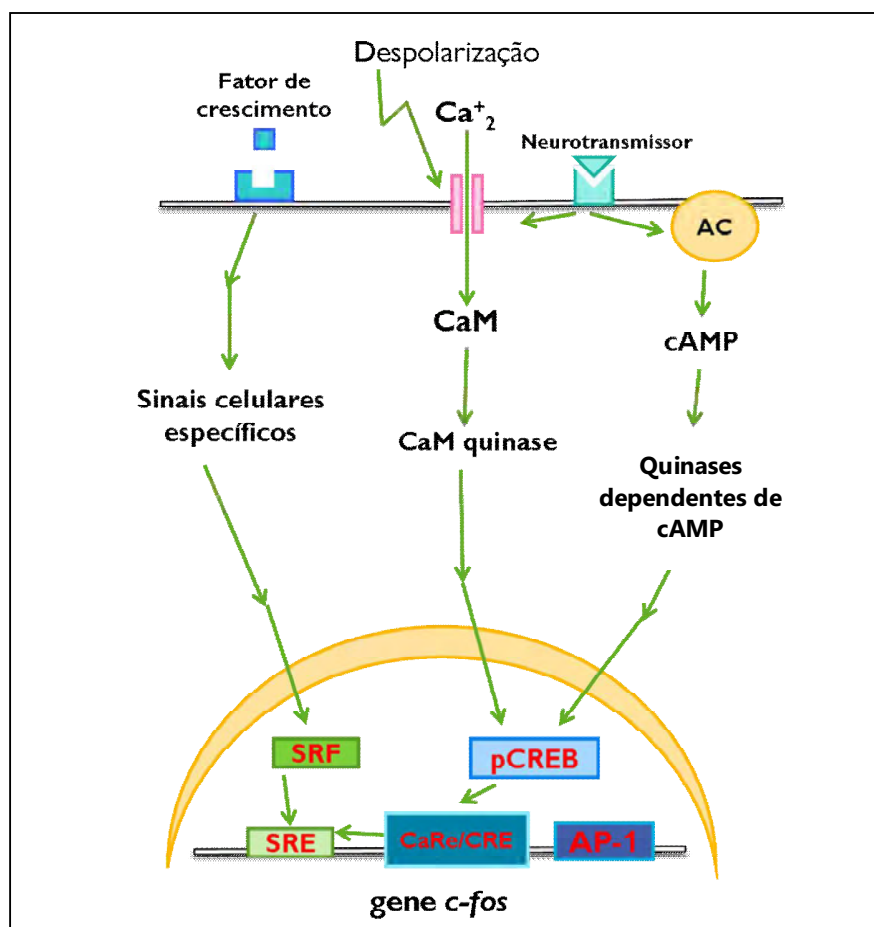


Figura 3: Principais vias de transdução de sinal que induzem Fos em neurônios. Adaptado de Hoffman e Lyo, 2002.

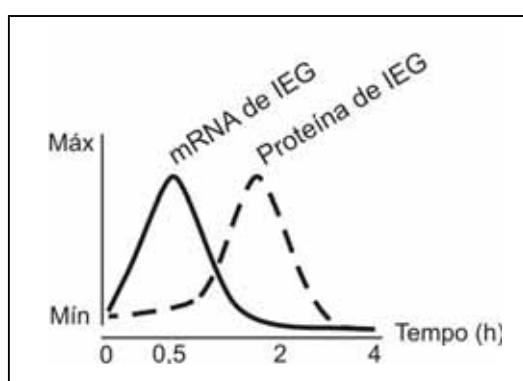


Figura 4: Perfil temporal da indução de genes de expressão precoce (IEG), com o pico de mRNA ocorrendo à 0,5 h e, o de proteína, 2 h após estimulação (KOVÁCS, 2008).

Com a implantação do programa BIOprospecTA, seguramente novos produtos naturais estão sendo identificados e caracterizados quimicamente a partir da fauna e flora da biodiversidade do Estado de São Paulo. Compostos provenientes de secreções típicas de artrópodes, assim como de outras origens biológicas, poderão apresentar neurotoxicidade, exigindo ensaios específicos adequados para utilização rotineira dentro do programa de Bioprospecção.

Considerando-se que diversas doenças e transtornos neurológicos são causados por disfunções de receptores e canais iônicos (HILE, 1984) e, em especial os receptores glutamatérgicos estão envolvidos na fisiopatologia de doenças da memória, controle motor (COLLINGRIDGE, 1987) e de diversos transtornos cerebrais, como epilepsia, o bloqueio desses receptores por acilpoliaminotoxinas podem ter, pelo menos na teoria, efeitos neuroprotetores. De fato, alguns estudos indicam que a toxina JSTX-3 tem ação anticonvulsivante (SALAMONI et al., 2005 a, 2005b), sendo alvos de pesquisas neurofarmacológicas.

Assim, receptores de aminoácidos excitatórios representam alvos promissores no desenvolvimento de drogas anti-epilépticas. E as acilpoliaminotoxinas de aranhas da família Nephilinae podem vir a ser utilizadas como modelos estruturais para o desenvolvimento racional de novas drogas anticonvulsivantes, analgésicos e agentes neuroprotetores (ROBINSON e COYLE, 1987), bem como nas pesquisas neuroquímicas da memória (PALMA et al., 1997).

Objetivos

2. OBJETIVOS

Tendo em vista a importância da estrutura molecular e a similaridade estrutural das poliaminas JSTX-3 e NSTX-3, as quais diferem exclusivamente pela presença de um resíduo de arginina na extremidade da cadeia da NSTX-3 (Figura 5), confere-se basicidade a esta molécula, propõe-se a caracterização da ação desses dois compostos de baixas massas moleculares no SNC de ratos.

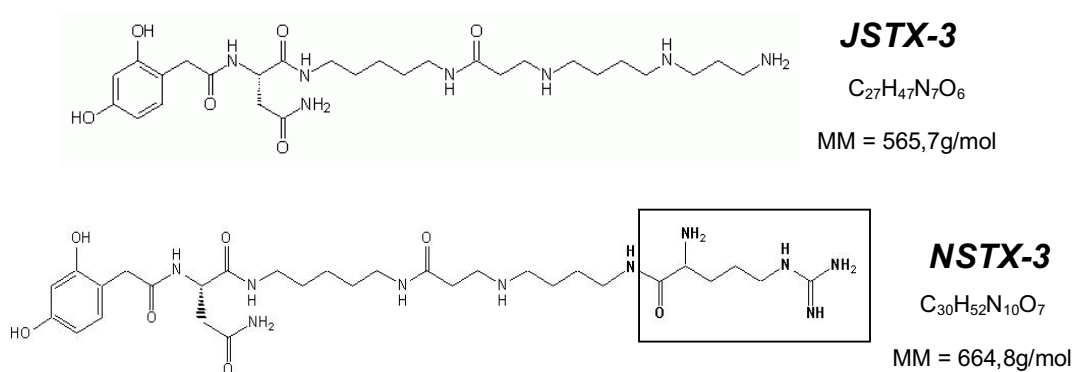


Figura 5: Estrutura e Massa Molecular das acilpoliaminas JSTX-3 e NSTX-3.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I) Caracterizar a ação de compostos de baixas massas moleculares no SNC de ratos, por meio de injeções intracerebroventricular, procurando elucidar as regiões Fos-imunorreativas após a administração de cada composto e suas correlações neuroquímicas e funcionais.

II) Identificar possíveis receptores neurais, alvos de interação dessas neurotoxinas, por meio de técnicas imunoistoquímicas de dupla-marcação de Fos com receptores glutamatérgicos ou dopaminérgicos.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

3.1.1. Toxinas Sintéticas

Foram utilizadas as acilpoliaminas NSTX-3 e JSTX-3 sintetizadas no Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (CEIS/IBRC/UNESP), segundo protocolo de síntese no qual foi utilizado 2-nitrobenzenosulfonamida como agente protetor (Nihei et al., 2001, 2002). As estruturas sintéticas foram confirmadas por espectrometria de massas, do tipo ESI-tríplo quadrupolo QUATTRO II, equipado com um probe padrão do tipo eletronspray (ESI) (MICROMASS, ALTRINCHAN).

3.1.2. Animais

Os animais utilizados nesses experimentos foram ratos Wistar machos jovens-adultos (n=62) com cerca de 60 dias de idade e peso aproximado de 250 a 300 g, trazidos para o Biotério Experimental do IBRC/UNESP pelo menos sete dias antes do procedimento cirúrgico para aclimação, sendo alojados três animais por caixa, com ração e água *ad libitum*. Foi mantido um ciclo de claro/escuro de 12:12 horas a partir das 7 horas, em temperatura ambiente de $\pm 21^{\circ}\text{C}$. Os experimentos foram conduzidos em conformidade com as normas do Guide of Care and Use of Laboratory Animals – Versão em Português (2003).

3.2. Cirurgia para a colocação da cânula guia e habituação

A cânula guia foi implantada no ventrículo lateral direito (AP = - 0,4; ML = - 1,4; DV = - 3,4) (PAXINOS e WATSON, 1998, Figura 6) sob ação anestésica de cetamina (Cetamin®), xilazina (Xylazin®) e acepromazina (Acepran®) (25:5:1 mg/Kg peso corpóreo) sete dias antes da injeção da toxina. Durante este período, os animais foram manipulados duas vezes ao dia durante 10 minutos para promover a habituação do animal com o experimentador e minimizar o estresse no momento da administração das toxinas, que poderia interferir nos resultados finais.

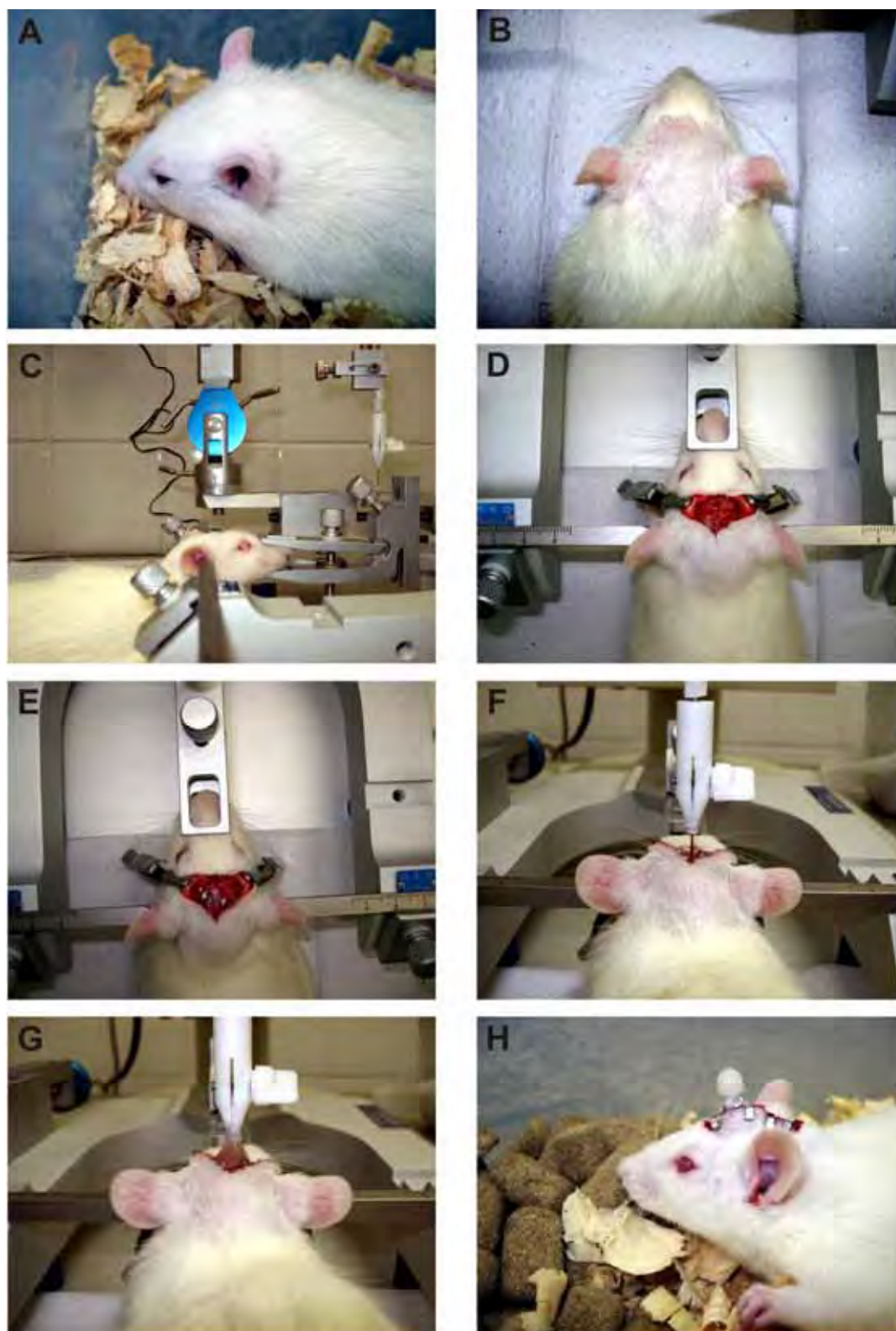


Figura 6: Cirurgia para implantação da cânula guia no ventrículo lateral direito do encéfalo de ratos. A: Animal antes da cirurgia *icv*; B: Preparação do animal para cirurgia *icv*; C: Posicionamento do animal no estereotático; D: Incisão da pele; E: Colocação de parafusos para fixação da cânula guia; F: Implantação da cânula guia; G: Fixação da cânula guia com resina acrílica auto-polimerizante; H: Animal pós-cirurgia *icv*.

3.3. Administração intracerebroventricular (icv) da neurotoxina

Para a administração icv, a cânula de injeção foi introduzida pela cânula guia, duas horas antes do experimento.

Foram trabalhados os seguintes grupos de animais:

3.4.a. NSTX-3:

15 nmol: n=2;

7,5 nmol: n=8;

3,8 nmol: n=2;

1,5 nmol: n=2;

3.4.b. JSTX-3:

1,8 nmol: n=2;

4,4 nmol: n=6;

8,8 nmol: n=4;

18 nmol: n=2.

Para cada grupo tratado, fez-se o mesmo número de animais controle, os quais receberam apenas o veículo, solução salina 0,9% (m/V). Em todos os animais o volume injetado (de toxina + veículo ou apenas veículo) foi igual a 10 µL, sendo a administração feita durante 1 minuto para minimizar danos teciduais causados pela força física da solução.

Transcorridas duas horas da administração da toxina, realizou-se a perfusão transcardíaca.

3.4. Perfusão transcardíaca

Após duas horas da administração da toxina, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (Cetamin®), xilazina (Xylazin®) e acepromazina (Acepran®) (25:5:1 mg/Kg peso corpóreo) e submetidos à perfusão transcardíaca, primeiramente com solução salina 0,9% (m/V) (cerca de 75 mL) para retirada do tecido sangüíneo, seguida pelo fixador formaldeído (paraformaldeído Synth® aquecido a 60° a 65° C) a 4% (m/V) a 4°C (cerca de 800 mL) durante 25 minutos, com velocidade de 30 mL de fixador/min.

3.5. Pós-fixação dos encéfalos e microtomia

Após a fixação, os encéfalos foram retirados e colocados em solução pós-fixadora de formaldeído a 4% (m/V), contendo 20% (m/V) de sacarose (Synth®) por 4 horas. Em seguida foram transferidos para um tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,4 (KPBS) contendo 20% de sacarose, por cerca de 18 horas, para crioproteção. Os encéfalos foram cortados em micrótomo de congelamento (Leica), com 30 µm de espessura no plano coronal em cinco séries (1 a 5) e foram armazenados a – 20°C em solução anticongelante de etileno glicol/glicerol até o momento de sua utilização.

3.6. Imunoistoquímica

Uma série de cortes do encéfalo de cada um dos animais foi utilizada para a reação imunoistoquímica, imunoperoxidase para anticorpo anti-Fos. Os cortes foram lavados com KPBS e em seguida, tratados com peróxido de hidrogênio 0,3% em KPBS + 0,3% de Triton X-100 (V/V), por 30 minutos, a fim de eliminar toda peroxidase endógena. Após este tratamento, os cortes foram lavados exaustivamente com KPBS até a eliminação da peroxidase e, então, incubados em 3% de soro normal de cabra (NGS, Vector®) em KPBS + 3% de Triton X-100 (V/V) por 40 minutos, para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, quando então, adicionou-se o anticorpo primário anti-Fos (Calbiochem®) produzido em coelho, na concentração 1:20.000, por 18 horas a temperatura ambiente, sob constante agitação. Os cortes foram então lavados em KPBS e incubados, por 1 hora, em anticorpo secundário biotinilado (1:1000, Vector Labs®), feito em cabra contra coelho, e por mais 1 hora em complexo de avidina-biotina – peroxidase (1:500, ELITE ABC KIT STANDARD VECTASTAIN Vector®).

Após esses procedimentos, os cortes foram incubados com tetrahydroclorato de diaminobenzidina (DAB, Sigma) e 0,01% de peróxido de hidrogênio em KPBS. Os cortes permaneceram reagindo por cerca de 3 minutos, e para cessar as reações foram realizadas lavagens sucessivas com KPBS. Uma vez ocorrida a reação para a marcação de Fos, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e contrastados em solução de tetróxido de ósmio 0,005% para realçar a reação imunoistoquímica.

Para investigar a neuroquímica dos neurônios Fos-IR após a administração das neurotoxinas NSTX-3 e JSTX-3 foi realizada a técnica de dupla imunoistoquímica.

Nas reações de dupla imunoistoquímica, cada série de cortes foi lavada com KPBS e em seguida, tratada com peróxido de hidrogênio 0,3% em (KPBS) + 0,3% de Triton X-100 (V/V), por 30 minutos, a fim de eliminar toda peroxidase endógena. Após este tratamento, os cortes foram lavados exaustivamente com KPBS até a eliminação da peroxidase e, então, incubados em 3% de soro normal de cabra (NGS - Vector®) em KPBS + 3% de Triton X-100 (V/V) por 40 minutos, para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, quando então, adicionou-se o anticorpo primário anti-Fos (Calbiochem®) produzido em coelho, na concentração 1:20.000, por 18 horas a temperatura ambiente, sob constante agitação. Os cortes foram então lavados em KPBS e incubados, por 1 hora, em anticorpo secundário biotilado (1:1000, Vector Labs®), feito em cabra contra coelho, e por mais 1 hora em complexo de avidina-biotina –peroxidase (1:500, ELITE ABC KIT STANDARD VECTASTAIN Vector®).

Após esses procedimentos, os cortes foram incubados com tetrahydroclorato de diaminobenzidina (DAB, Sigma), NaS e 0,01% de peróxido de hidrogênio diluídos 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 com KPBS e cada uma das séries foi tratada com peróxido de hidrogênio 0,3% + 0,3% de Triton X-100 em KPBS, durante 15 minutos. Após esse tratamento, os cortes foram incubados em 3% de soro normal de cabra em KPBS + 3% de Triton X-100 por 20 minutos. Passado este período, adicionou-se o segundo anticorpo primário: anti-GluR1 (1:500, Chemicom); anti-GluR2/3 (1:500, Chemicom); anti-GluR4 (1:500, Chemicom) e anti-tirosina hidroxilase (1:1000, Calbiochem) 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 biotilado de cabra contra coelho (1:1000, Vector Labs®) por 30 minutos, seguida por mais 30 minutos de incubação em complexo de avidina-biotina – peroxidase (1:500, ELITE ABC KIT STANDARD VECTASTAIN Vector®). 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.

3.7. Quantificação das Células Fos-IR

Os cortes foram analisados em microscópio de luz e o número de células Fos-positivas do campo óptico foram contadas manualmente. As células imunorreativas à Fos foram identificadas pelo padrão de marcação nuclear marrom-dourado resultante da imunoistoquímica. As células foram contadas com aumento 10x, exceto no giro denteado (DG), 20x, em uma área de 0,4 mm². As regiões encefálicas, de cada animal, foram identificadas de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson, 1998.

Os dados foram analisados pelo teste ANOVA (two-way ANOVA), comparando-se os diferentes tratamentos com a NSTX-3 e JSTX-3 aos controles. O "Bonferroni post-tests" foi utilizado para avaliar as diferenças significativas entre os tratamentos. A quantificação Fos-IR está apresentada pelo número médio de células Fos-positivas $\pm$ SD, em campo claro. Foram considerados significativos os testes com $p < 0,05$.

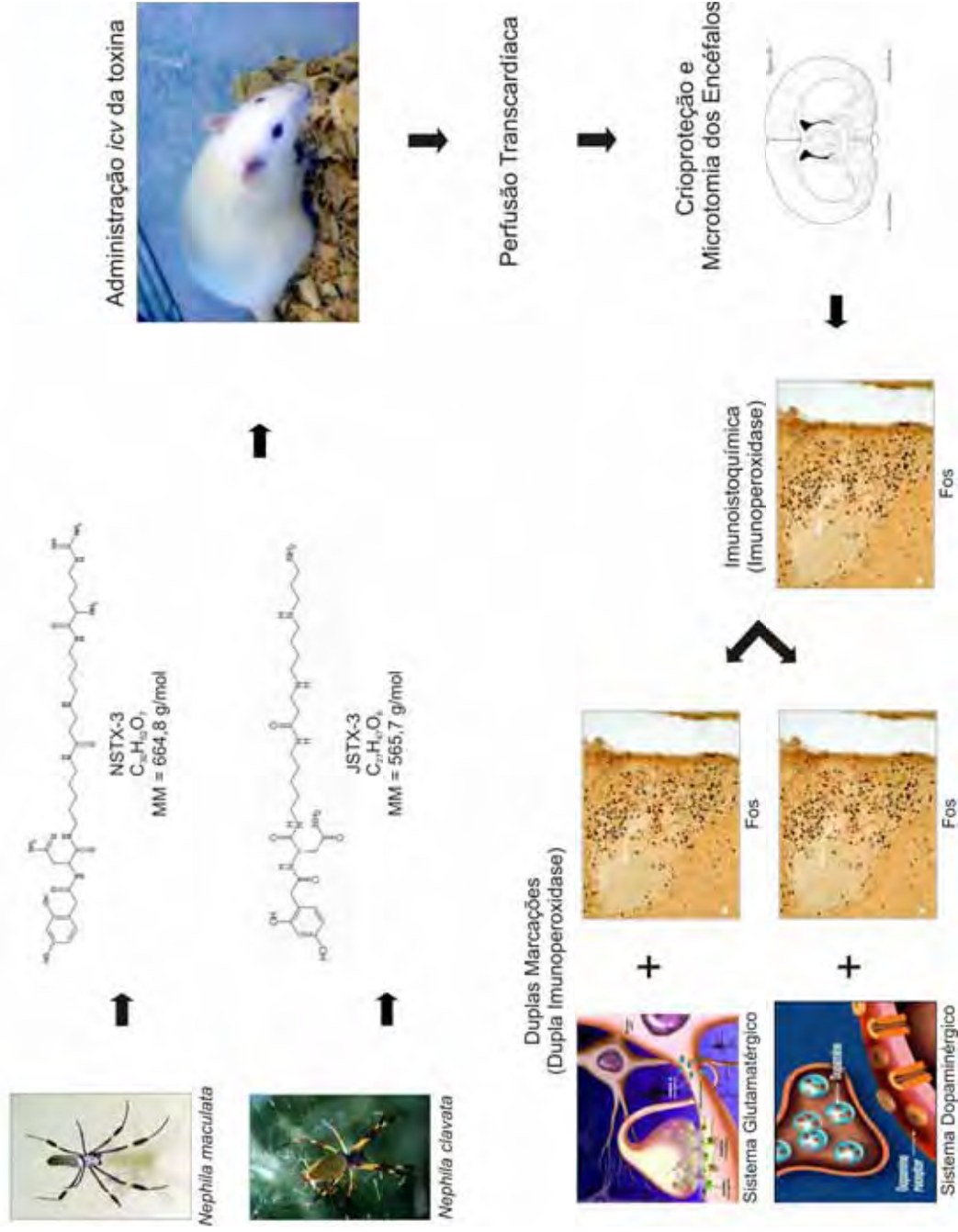
Para a análise de co-localização de Fos/iGluR e Fos/TH foi calculado o percentual de células duplamente marcadas em relação ao total de células Fos-IR, de cada região analisada.

3.8. Aquisição das Imagens

As fotomicrografias foram adquiridas por câmera digital Nikon DS-Ri1 acoplada a um microscópio Leica DMR e a um computador PC Apple Macintosh Power, no Laboratório de Neuroanatomia Química do ICB-III/USP, sob supervisão do Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt. Para a aquisição das imagens foi utilizado o software NIS Elements e o software CorelDRAW X3 foi utilizado para montagem das pranchas.

As etapas descritas nesse item 3 e a sequência de trabalho estão resumidas no esquema do item 3.9, desenho experimental.

3.9. DESENHO EXPERIMENTAL



Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Iniciou-se o trabalho testando diferentes concentrações da acilpoliamina NSTX-3, em aplicações *icv* em ratos, visando à obtenção da concentração ótima da toxina para análise da potencial neurotóxico/neuroprotetor em SNC de ratos dessa toxina. Foram analisadas as seguintes áreas do diencéfalo de ratos: hipotálamo, tálamo, amígdala, hipocampo, córtex piriforme, sistema límbico. Abaixo estão citadas as doses ensaiadas.

1. NSTX-3 15 nmol ($n=2$): dose elevada de NSTX-3, intensa marcação de diversas regiões encefálicas, como hipotálamo, hipocampo, tálamo, septo e córtex cerebral, possivelmente devido a ocorrência de eventos de convulsão cerca de 15 minutos após a administração da droga, com duração de cerca de 3 minutos. Na crise convulsiva, pôde-se observar convulsão tetânica dos membros superiores e cabeça enquanto os membros inferiores permaneceram relaxados. Também, deve-se considerar a diminuição e/ou perda da especificidade da toxina pelos receptores. Por estes motivos, estudou-se uma concentração dez vezes menor de NSTX-3.

2. NSTX-3 1,5 nmol ($n=2$): dose extremamente baixa. Os animais tratados apresentaram níveis basais de Fos, semelhantes aos dos animais controle. Então, experimentou-se as concentrações 3,761 nmol e 7,521 nmol.

3. NSTX-3 3,8 nmol ($n=2$): dose baixa. Os animais tratados nessas condições apresentaram níveis basais de Fos, semelhantes aos dos animais controle, na maioria das regiões analisadas, diferindo apenas, em núcleos do sistema límbico.

4. NSTX-3 7,5 nmol ($n=8$): dose mais adequada aos estudos imunoistoquímicos.

A quantidade 7,5 nmol/animal foi escolhida para a realização dos ensaios imunoistoquímicos com dupla marcação, pois apresentou um padrão de áreas Fos-IR estatisticamente diferente aos animais controle, conforme pode ser observado na tabela 2 e ilustrado nas figuras 7 e 8.

A tabela 2 expressa o número médio de neurônios imunorreativos à Fos dos animais tratados com as 4 diferentes concentrações da acilpoliamina NSTX-3 e dos animais controle, e os respectivos desvios padrão. O grau de significância foi obtido a partir do teste estatístico ANOVA. As figuras 7 e 8 exemplificam algumas das regiões pelas quais a NSTX-3 mostrou afinidade, como: hipotálamo, incluindo área pré-óptica hipotalâmica, amígdala, núcleo talâmico e córtex piriforme.

As demais concentrações da toxina NSTX-3 testadas estão mostradas apenas na tabela 2, dados numéricos; optou-se por não ilustrar com fotos esses tratamentos por serem bastante semelhantes aos animais controle, mostrados nas figuras 7 e 8.

Tabela 2: Média do número de neurônios Fos-IR ($\pm$ SD), do encéfalo de ratos Wistar, após a administração de diferentes doses de NSTX-3, em relação aos animais controle.

Áreas Encefálicas	Controle	NSTX-3 1,5 nmol	NSTX-3 3,8 nmol	NSTX-3 7,5 nmol	NSTX-3 15 nmol
<i>Hipotálamo</i>					
LHA	16,4 $\pm$ 1,7	3 $\pm$ 0,7	14,5 $\pm$ 1,4	26,2 $\pm$ 1,6***	17,5 $\pm$ 0,5
AHC	4,2 $\pm$ 0,6	4 $\pm$ 0,5	20,5 $\pm$ 0,8	21,6 $\pm$ 1,5**	26 $\pm$ 0,9***
PaMP	29,6 $\pm$ 4,1	34 $\pm$ 1,9	0	66 $\pm$ 6,3***	140,5 $\pm$ 1,7***
VLH	8,2 $\pm$ 0,9	9,5 $\pm$ 0,5	0	18,4 $\pm$ 0,9**	66,5 $\pm$ 0,9***
ZI	0,6 $\pm$ 0,4	7 $\pm$ 0,9	16 $\pm$ 0,5	7,4 $\pm$ 0,9	0
VMPO	13,8 $\pm$ 1,6	12 $\pm$ 6	19 $\pm$ 0,7	28,6 $\pm$ 2,9**	20,5 $\pm$ 0,8
opt/SO	10,8 $\pm$ 1,1	3 $\pm$ 0,9	10,5 $\pm$ 0,7	19,4 $\pm$ 1,4**	8 $\pm$ 0,6
Ox	0	0	0	0	0
<i>Amígdala</i>					
CeC/CeM/CeL	11,4 $\pm$ 1,7	3 $\pm$ 0,9	0	23,4 $\pm$ 4,7***	55 $\pm$ 1,3***
<i>Hipocampo</i>					
CA1	0	0	0	0	119,5 $\pm$ 1,2***
CA2	0	0	0	0	119,5 $\pm$ 1,5***
CA3	0	0	0	0	111 $\pm$ 1,6***
DG	0	0	0	0	30 $\pm$ 0,92***
PoDG	0	0	0	0	14 $\pm$ 0,8***
<i>Tálamo</i>					
PVA	7,2 $\pm$ 1,0	9,5 $\pm$ 0,7	13,5 $\pm$ 0,5	18,6 $\pm$ 1,1	120,5 $\pm$ 1,5***
<i>Córtex Piriforme</i>					
Pir	3,4 $\pm$ 0,9	0	6,5 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 2,6**	182 $\pm$ 0,9***
<i>Sistema Límbico</i>					
VDB	0,6 $\pm$ 0,4	1 $\pm$ 0,5	56,5 $\pm$ 0,5*	15,4 $\pm$ 1,7**	7 $\pm$ 0,7**
HDB	0,8 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,7	9,5 $\pm$ 0,5**	13,6 $\pm$ 1,6**	12 $\pm$ 0,5***
Mfbb	1,8 $\pm$ 0,8	1,5 $\pm$ 0,5	11,5 $\pm$ 0,8***	15,2 $\pm$ 2,4***	10 $\pm$ 0,7**

* p < 0,05

** p < 0,01

*** p < 0,001

LHA: área hipotalâmica lateral; AHC: área hipotalâmica anterior, porção central; PaMP: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular medial; VLH: núcleo hipotalâmico ventrolateral; ZI: zona incerta; VMPO: núcleo pré-óptico ventromedial; opt: trato óptico; SO: núcleo supra-óptico; ox: quiasma óptico; CeC: núcleo central da amígdala, porção capsular; CeM: núcleo central da amígdala, porção medial; CeL: núcleo central da amígdala, porção lateral; CA1: região CA1 do hipocampo; CA2: região CA2 do hipocampo; CA3: região CA3 do hipocampo; DG: Giro dentado; PoDG: camada polimorfa do giro dentado; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; Pir: córtex piriforme; VDB: banda diagonal do núcleo límbico vertical; HDB: banda diagonal do núcleo límbico horizontal; mfbb: componente "b" do feixe prosencefálico medial.

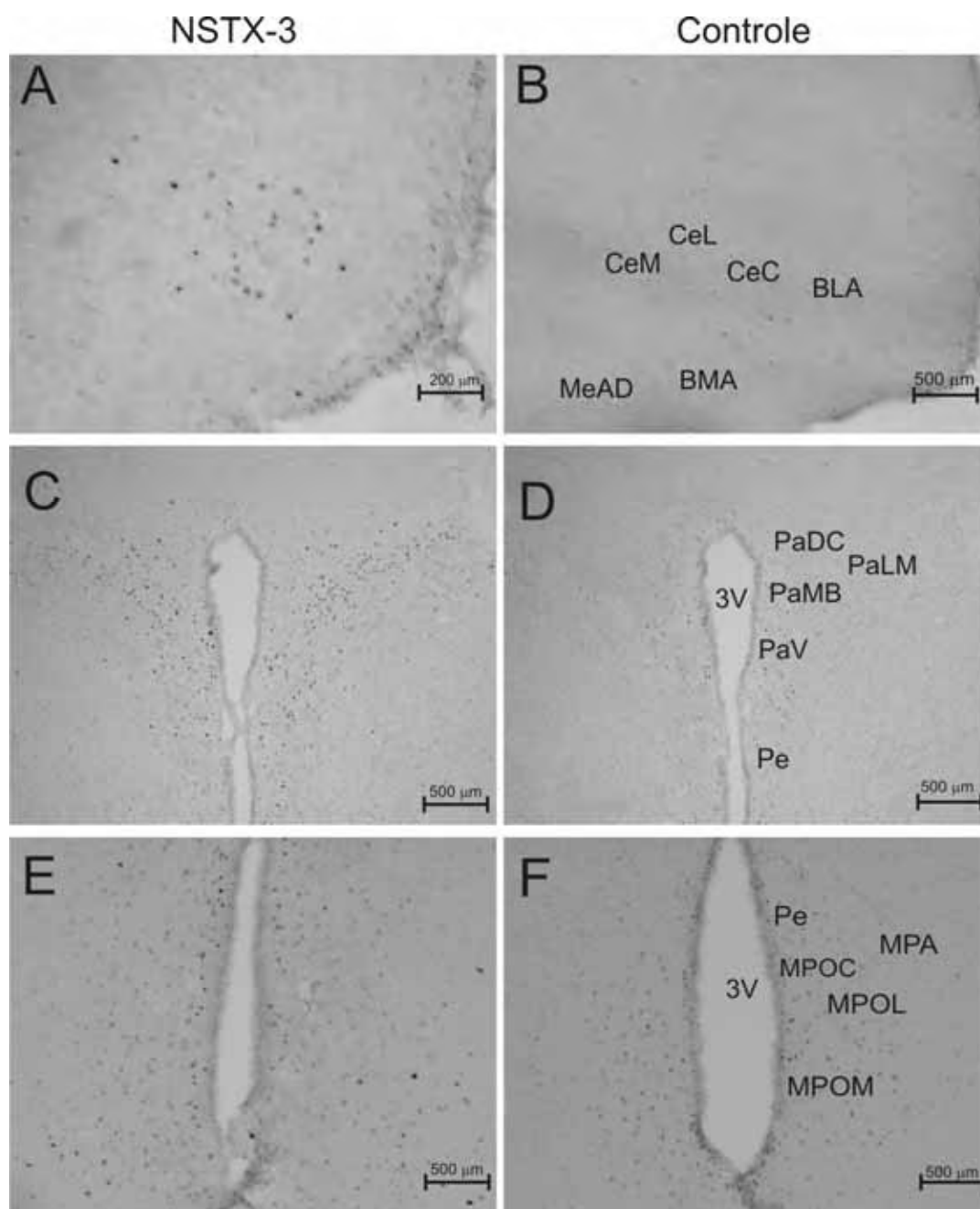


Figura 7: Regiões Fos-IR após tratamento com NSTX-3 (7,5 nmol).

Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) após administração *icv* da acilpoliaminotoxina NSTX-3 (7,5 nmol). Em A-B: amígdala; C-D: área hipotalâmica; E-F: área pré-óptica.

CeM: núcleo central da amígdala, porção medial; CeL: núcleo central da amígdala, porção lateral; CeC: núcleo central da amígdala, porção capsular; BLA: núcleo basolateral da amígdala, parte anterior; BMA: núcleo basomedial da amígdala, parte anterior; MeAD: núcleo medial da amígdala, parte anterodorsal; PaDC: núcleo paraventricular do hipotálamo, cap dorsal; PaLM: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular lateral; PaV: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção ventral; Pe: núcleo periventricular do hipotálamo; 3V: terceiro ventrículo; MPOC: núcleo pré-óptico medial, parte central; MPA: área pré-óptica medial; MPOL: núcleo pré-óptico medial, parte lateral; MPOM: núcleo pré-óptico medial, parte medial.

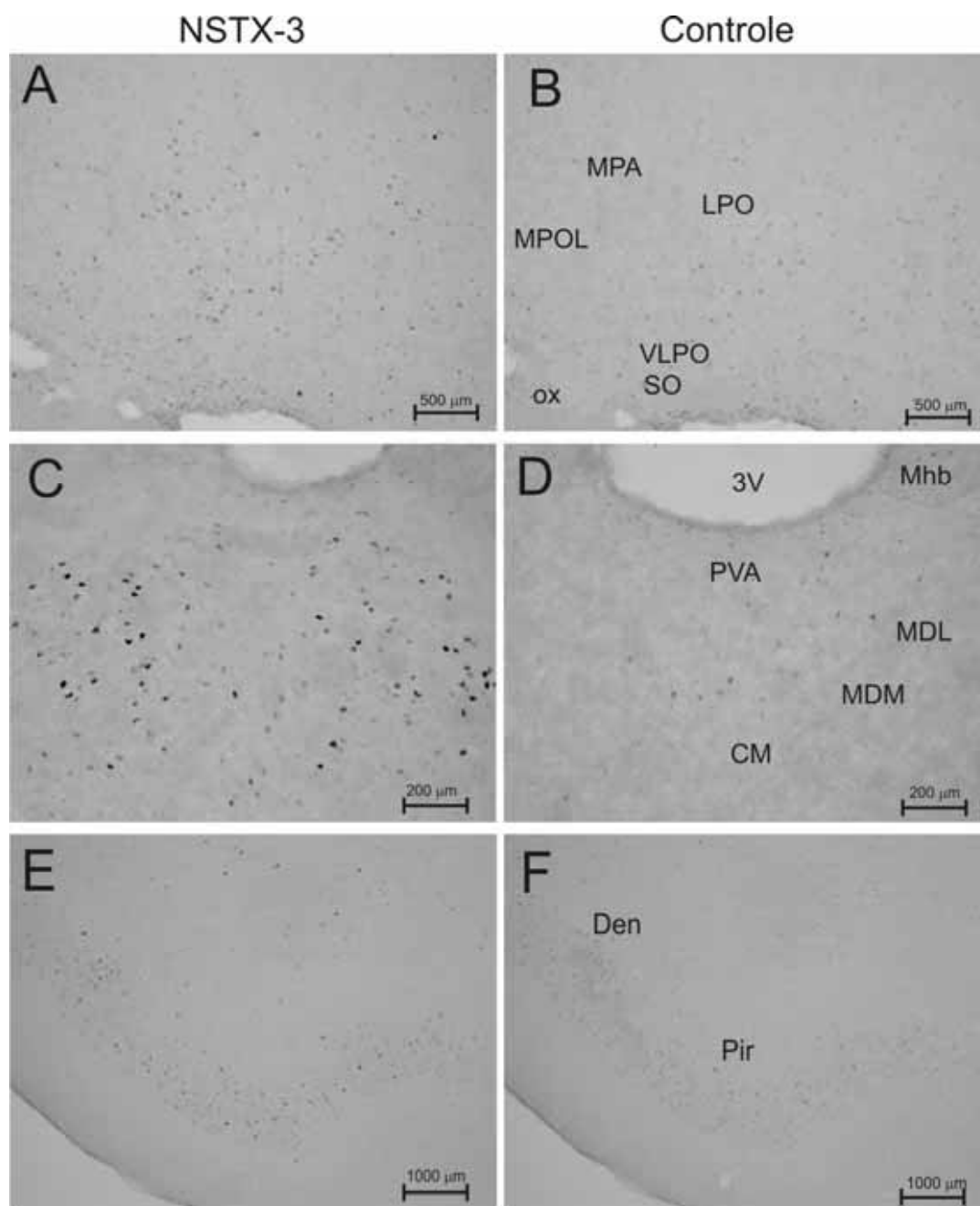


Figura 8: Regiões Fos-IR após tratamento com NSTX-3 (7,5 nmol).

Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) após administração icv da acilpoliaminotoxina NSTX-3 (7,5 nmol). Em A-B: área pré-óptica, C-D: núcleo talâmico; E-F: córtex piriforme.

MPA: área pré-óptica medial; MPOL: núcleo pré-óptico medial, parte lateral; LPO: área pré-óptica lateral; VLPO: núcleo pré-óptico ventrolateral; SO: núcleo supra-óptico; ox: quiasma óptico. 3V: terceiro ventrículo; Mhb: núcleo habenular medial; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; MDL: núcleo talâmico mediodorsal, parte lateral; MDM: núcleo talâmico mediodorsal, parte medial; CM: núcleo talâmico central medial; Den: núcleo endopiriforme dorsal; Pir: córtex piriforme.

Mantendo-se a mesma estratégia de trabalho, visando à obtenção da concentração ótima da toxina para análise da ação no SNC de ratos da JSTX-3 e a obtenção de uma curva dose-resposta para a ação da JSTX-3 no encéfalo de ratos, administrou-se as concentrações descritas abaixo da toxina JSTX-3, no SNC de ratos e analisou-se as seguintes áreas do diencéfalo de ratos: hipotálamo, tálamo, amígdala, hipocampo, córtex piriforme, sistema límbico..

1. JSTX-3 1,8 nmol (n=2);

2. JSTX-3 4,4 nmol (n=6);

3. JSTX-3 8,8 nmol (n=4);

4. JSTX-3 18 nmol (n=2): Os animais tratados com essa dose de JSTX-3 apresentaram aumento da atividade locomotora cerca de 30 minutos após a administração..

A análise dos resultados permitem observar que as concentrações 1,8 nmol, 4,4 nmol e 8,8 nmol de JSTX-3 promovem um padrão de marcação de Fos estatisticamente semelhante ao dos animais controle, em 14 das 19 áreas encefálicas analisadas, conforme exposto na tabela 3.

A dose 18 nmol/animal foi a escolhida para os ensaios imunoistoquímicos com dupla marcação, pois apresentou um padrão de áreas Fos-IR estatisticamente diferente aos animais controle, na maioria das áreas encefálicas analisadas, conforme pode ser observado na tabela 3 e ilustrado nas figuras 9 e 10.

Assim como descrito para a NSTX-3, a tabela 3 apresenta o número médio de neurônios imunorreativos à Fos dos animais tratados com as 4 diferentes concentrações da acilpoliamina JSTX-3 e dos animais controle, e os respectivos desvios padrão. O grau de significância foi obtido a partir do teste estatístico ANOVA. As figuras 9 e 10 exemplificam algumas das regiões pelas quais a JSTX-3 mostrou afinidade, como: hipotálamo, hipocampo, amígdala, tálamo e córtex piriforme.

As demais concentrações de JSTX-3 testadas estão mostradas apenas na tabela 3, dados numéricos; optou-se por não ilustrar com fotos esses tratamentos por serem bastante semelhantes aos animais controle, mostrados nas figuras 9 e 10.

Tabela 3: Média do número de neurônios Fos-IR ($\pm$ SD), do encéfalo de ratos Wistar, após a administração de diferentes doses de JSTX-3, em relação aos animais controle.

Áreas Encefálicas	Controle	JSTX-3 1,8 nmol	JSTX-3 4,4 nmol	JSTX-3 8,8 nmol	JSTX-3 18 nmol
<i>Hipotálamo</i>					
LHA	0	2 $\pm$ 0,5	12 $\pm$ 0,8	12 $\pm$ 0,8	16 $\pm$ 0,8***
AHC	5,5 $\pm$ 1,6	14 $\pm$ 1,2	16 $\pm$ 1,1	16,5 $\pm$ 1,2	22,5 $\pm$ 1,2***
PaMP	0	30 $\pm$ 2,3***	9,5 $\pm$ 1,2	32 $\pm$ 1,9***	41,5 $\pm$ 1,2***
VLH	0	8,5 $\pm$ 0,8	0	7 $\pm$ 1,9	16 $\pm$ 0,8***
ZI	8 $\pm$ 2,3	11,5 $\pm$ 1,0	16 $\pm$ 0,5	0	44,5 $\pm$ 2,3***
VMPO	2,5 $\pm$ 0,7	14 $\pm$ 0,3	15 $\pm$ 0,7	21 $\pm$ 1,7**	23,5 $\pm$ 1,5***
opt/SO	0	5,5 $\pm$ 1,1	1 $\pm$ 0,7	5 $\pm$ 1,4	10 $\pm$ 1,4**
ox	0	0	0	10 $\pm$ 2,7	0
<i>Amígdala</i>					
CeC/CeM/CeL	3 $\pm$ 1,4	7,5 $\pm$ 1,1	10,5 $\pm$ 1,6	15,5 $\pm$ 1,4**	84,5 $\pm$ 1,9***
<i>Hipocampo</i>					
CA1	0	0	0	0	13,5 $\pm$ 0,5***
CA2	0	0	0	0	7,5 $\pm$ 0,4
CA3	0	0	0	3 $\pm$ 0,9	11 $\pm$ 0,5**
DG	0	0	0	0	108 $\pm$ 2,4***
PoDG	0	0	2,5 $\pm$ 0,7	0	22,5 $\pm$ 0,7***
<i>Tálamo</i>					
PVA	5,5 $\pm$ 1,8	9 $\pm$ 0,5	10 $\pm$ 1,2	10,5 $\pm$ 0,5	27,5 $\pm$ 1,4***
<i>Córtex Piriforme</i>					
Pir	0	0	0	0,5 $\pm$ 0,4	52 $\pm$ 1,5***
<i>Sistema Límbico</i>					
VDB	0	0	5 $\pm$ 0,7	1 $\pm$ 0,5	3,5 $\pm$ 0,4
HDB	0	0,5 $\pm$ 0,4	5 $\pm$ 1,4	10 $\pm$ 0,8**	10 $\pm$ 0,8**
mfb	0	0	10,5 $\pm$ 1,0**	7 $\pm$ 1,0*	7 $\pm$ 0,5

* p < 0,05

** p < 0,01

*** p < 0,001

LHA: área hipotalâmica lateral; AHC: área hipotalâmica anterior, porção central; PaMP: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular medial; VLH: núcleo hipotalâmico ventrolateral; ZI: zona incerta; VMPO: núcleo pré-óptico ventromedial; opt: trato óptico; SO: núcleo supra-óptico; ox: quiasma óptico; CeC: núcleo central da amígdala, porção capsular; CeM: núcleo central da amígdala, porção medial; CeL: núcleo central da amígdala, porção lateral; CA1: região CA1 do hipocampo; CA2: região CA2 do hipocampo; CA3: região CA3 do hipocampo; DG: Giro denteado; PoDG: camada polimorfa do giro denteado; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; Pir: córtex piriforme; VDB: banda diagonal do núcleo límbico vertical; HDB: banda diagonal do núcleo límbico horizontal; mfb: componente "b" do feixe prosencefálico medial.

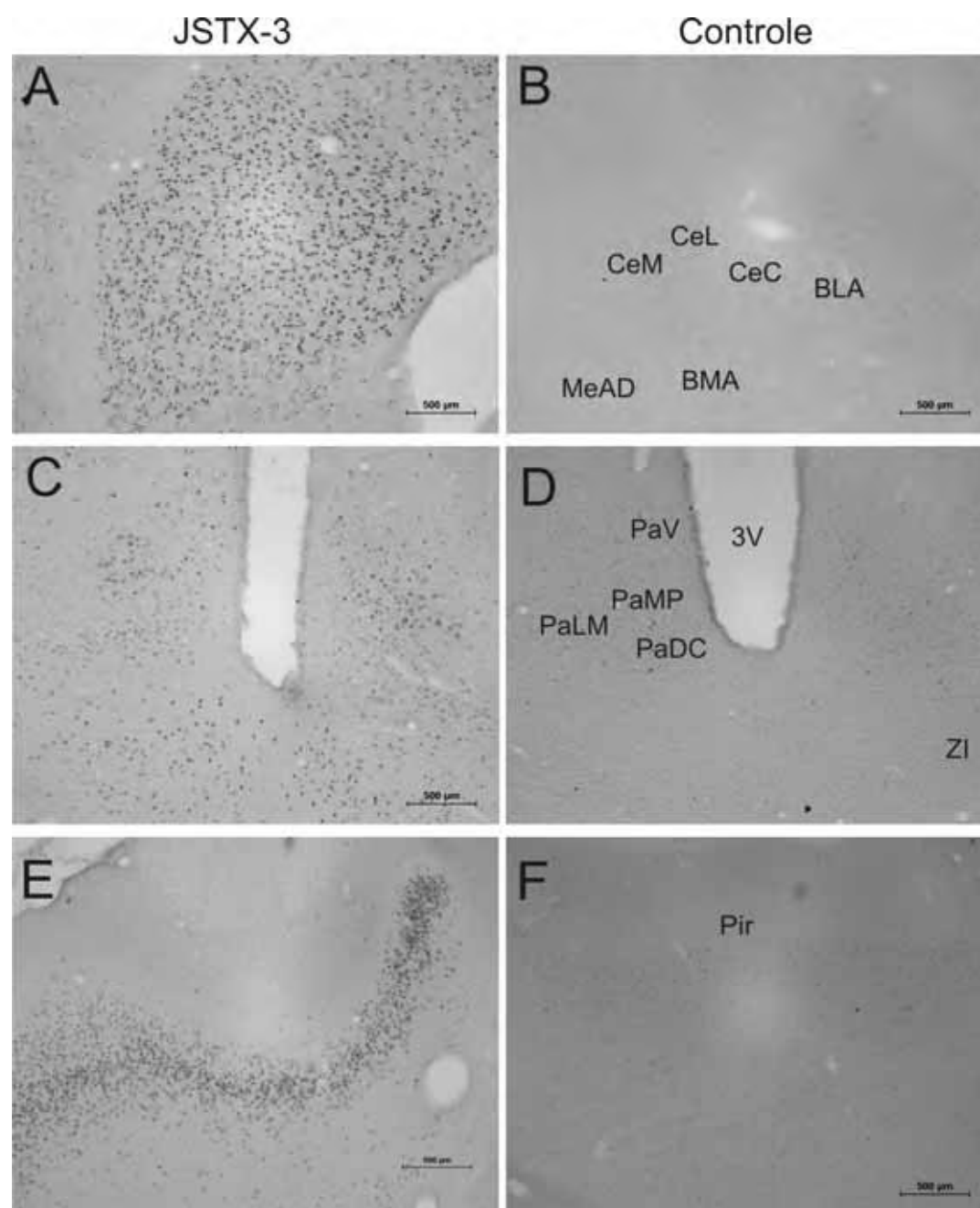


Figura 9: Regiões Fos-IR após tratamento com JSTX-3 (18 nmol).

Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) após administração *icv* da acilpoliaminotoxina JSTX-3 (18 nmol). Em A-B: amígdala; C-D: área hipotalâmica; E-F: córtex piriforme.

CeM: núcleo central da amígdala, porção medial; CeL: núcleo central da amígdala, porção lateral; CeC: núcleo central da amígdala, porção capsular; BLA: núcleo basolateral da amígdala, parte anterior; BMA: núcleo basomedial da amígdala, parte anterior; MeAD: núcleo medial da amígdala, parte anterodorsal; PaDC: núcleo paraventricular do hipotálamo, cap dorsal; PaLM: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular lateral; PaV: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção ventral; 3V: terceiro ventrículo; ZI: zona incerta; Pir: córtex piriforme.

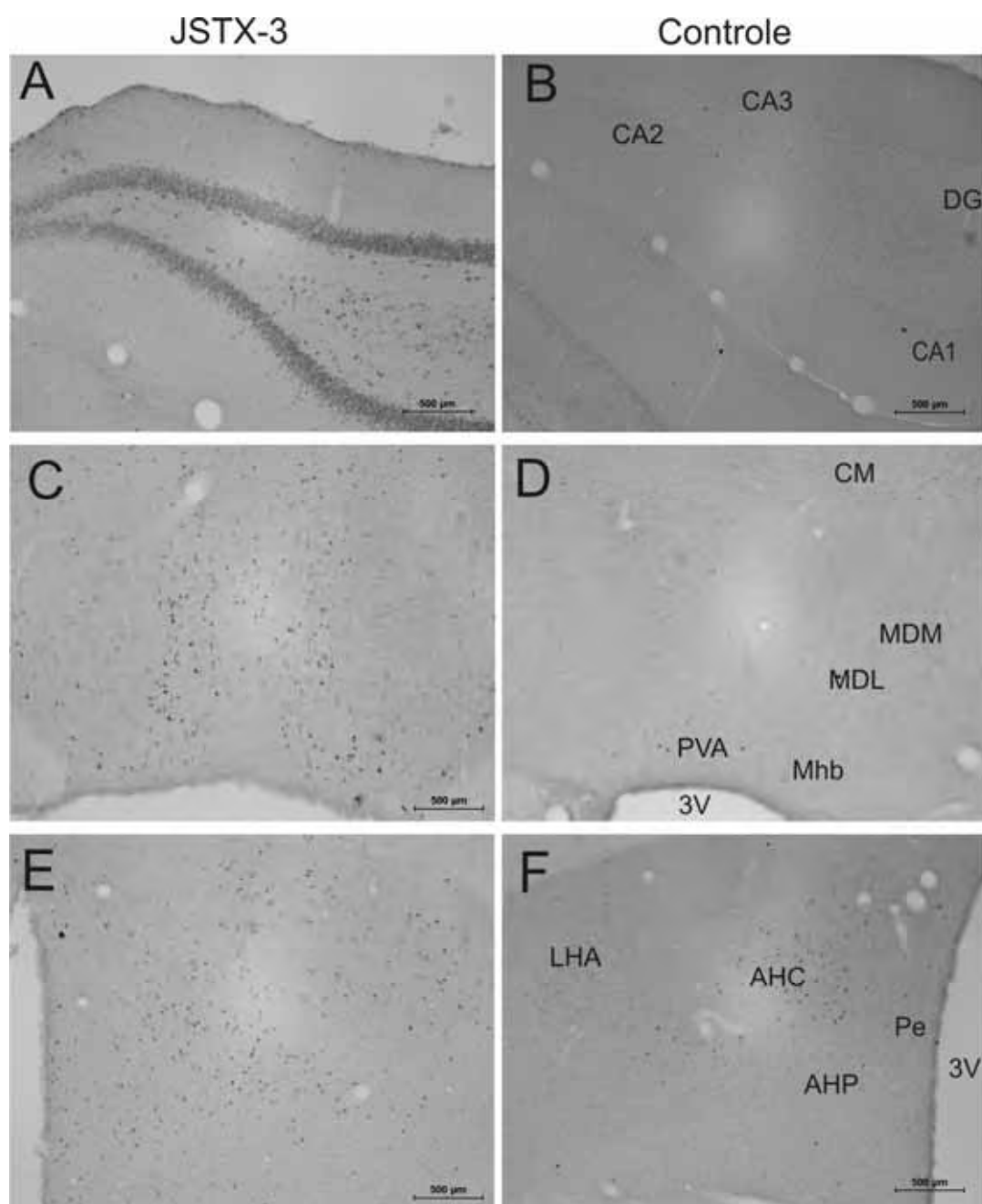


Figura 10: Regiões Fos-IR após tratamento com JSTX-3 (18 nmol).

Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) após administração *icv* da acilpoliaminotoxina JSTX-3 (18 nmol). Em A-B: hipocampo; C-D: área talâmica; E-F: área hipotalâmica.

CA1: região CA1 do hipocampo; CA2: região CA2 do hipocampo; CA3: região CA3 do hipocampo; DG: giro denteado; CM: núcleo talâmico central medial; MDM: núcleo talâmico mediodorsal, parte medial; MDL: núcleo talâmico mediodorsal, parte lateral; Mhb: núcleo habenular medial; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; 3V: terceiro ventrículo; LHA: área hipotalâmica lateral; AHC: área hipotalâmica anterior, porção central; Pe: núcleo hipotalâmico periventricular; AHP: área hipotalâmica anterior, porção posterior.

A figura 11 mostra o número médio de neurônios Fos-IR, no SNC de ratos Wistar, após administração intracerebroventricular de NSTX-3 7,5 nmol e JSTX-3 8,8 nM, em relação aos animais controle (salina 0,9% [m/V]), em ratos Wistar.

A acilpoliaminotoxina NSTX-3, quando administrada na dose 7,5 nmol ativa áreas específicas do SNC, tais como hipotálamo (LHA, AHC, PaMP, VLH, VMPO, opt/SO), amígdala (CeC/CeL/CeM), córtex piriforme (Pir) e sistema límbico (VDB, HDB, mfb), conforme mostrado nas figuras 7, 8, 11 e 12.

A toxina JSTX-3, quando testada na dose 8,8 nmol, interage com neurônios hipotalâmicos (PaMP e VMPO), conforme apresentado na figura 11.

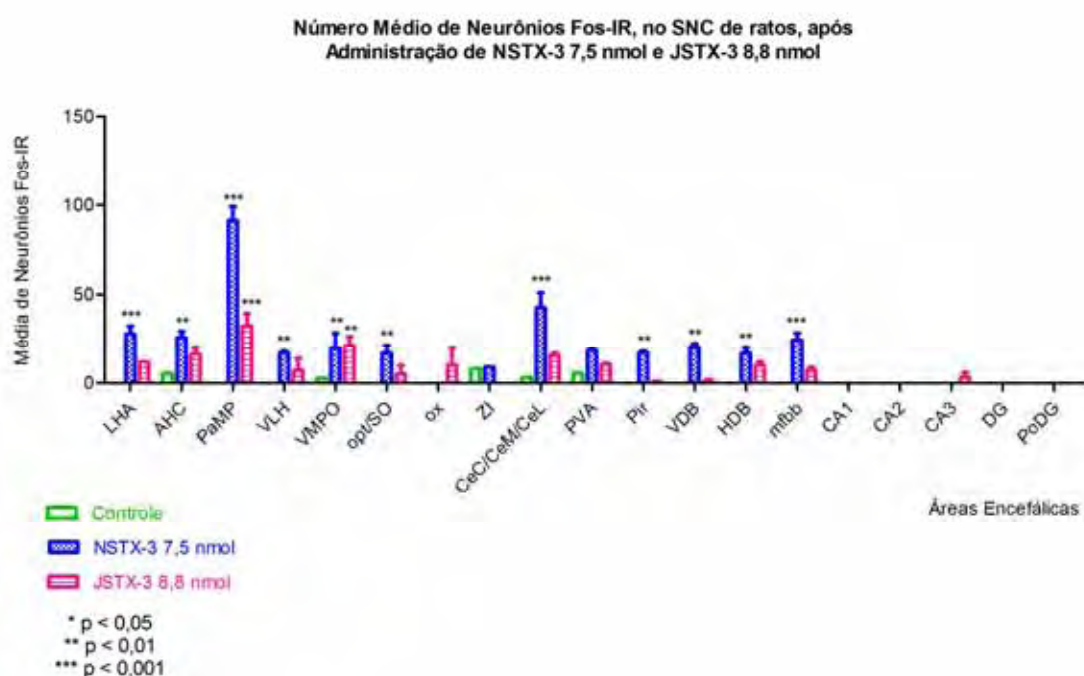


Figura 11: Gráfico do número médio de neurônios Fos-IR, do SNC de ratos Wistar, após administração intracerebroventricular de NSTX-3 7,5 nmol e JSTX-3 8,8 nmol, em relação aos animais controle (salina 0,9% [m/V]).

Ao comparar, em termos estatísticos, as marcações de Fos decorrentes dos tratamentos com NSTX-3 7,5 nmol e com JSTX-3 8,8 nmol, nota-se uma maior interação da NSTX-3 7,5 nmol com neurônios do hipotálamo (LHA, PaMP), amígdala (CeC/CeL/CeM), córtex piriforme (Pir) e sistema límbico (VDB, HDB, mfb), segundo mostra a figura 12.

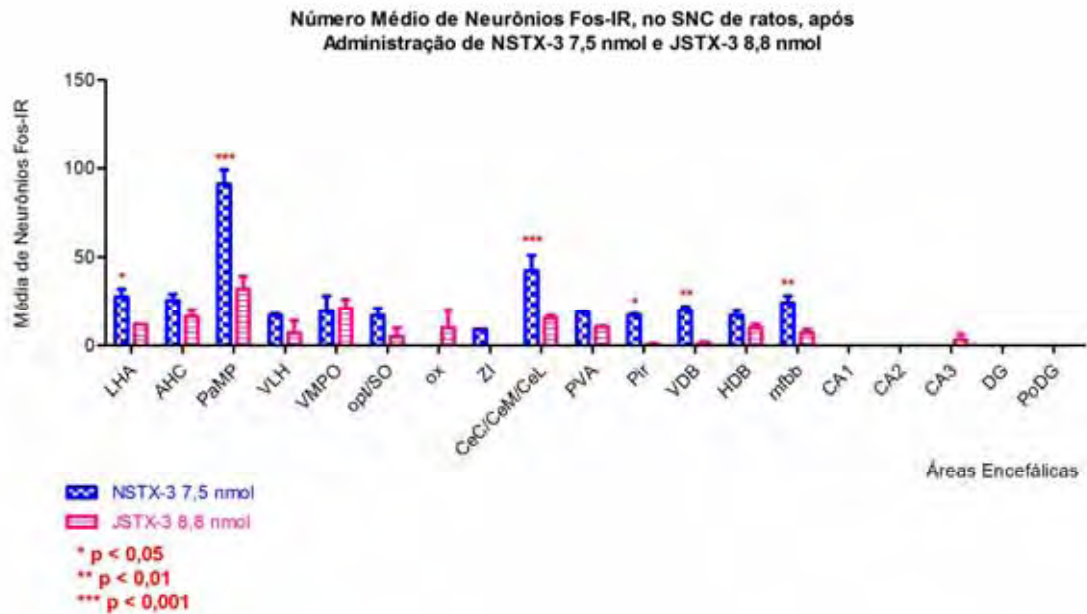


Figura 12: Gráfico do número médio de neurônios Fos-IR, do SNC de ratos Wistar, após administração intracerebroventricular de NSTX-3 7,5 nmol e JSTX-3 8,8 nmol, relacionadas entre si, estatisticamente.

A figura 13 mostra o número médio de neurônios Fos-IR, no SNC de ratos Wistar, após administração intracerebroventricular de NSTX-3 15 nmol e JSTX-3 18 nmol, em relação aos animais controle (salina 0,9% [m/V]), em ratos Wistar.

Quando administrada na dose 18 nmol, a JSTX-3 promoveu aumento na expressão de *c-fos* em neurônios hipocampus (CA1, CA3, DG, PoDG), hipotalâmicos (LHA, AHC, PaMP, VLH, VMPO, opt/SO, ZI), talâmicos (PVA), do córtex piriforme (Pir), da amígdala (CeC/CeL/CeM) e sistema límbico (HDB) (Figura 13).

Já o tratamento com NSTX-3, na dose 15 nmol, resultou na ativação de neurônios do hipocampus (CA1, CA2, CA3, DG, PoDG), hipotalâmicos (LHA, AHC, PaMP, VLH, VMPO, opt/SO, ZI), talâmicos (PVA), do córtex piriforme (Pir), da amígdala (CeC/CeL/CeM) e sistema límbico (HDB, mfb), de acordo com a tabela 2 e com a Figura 13.

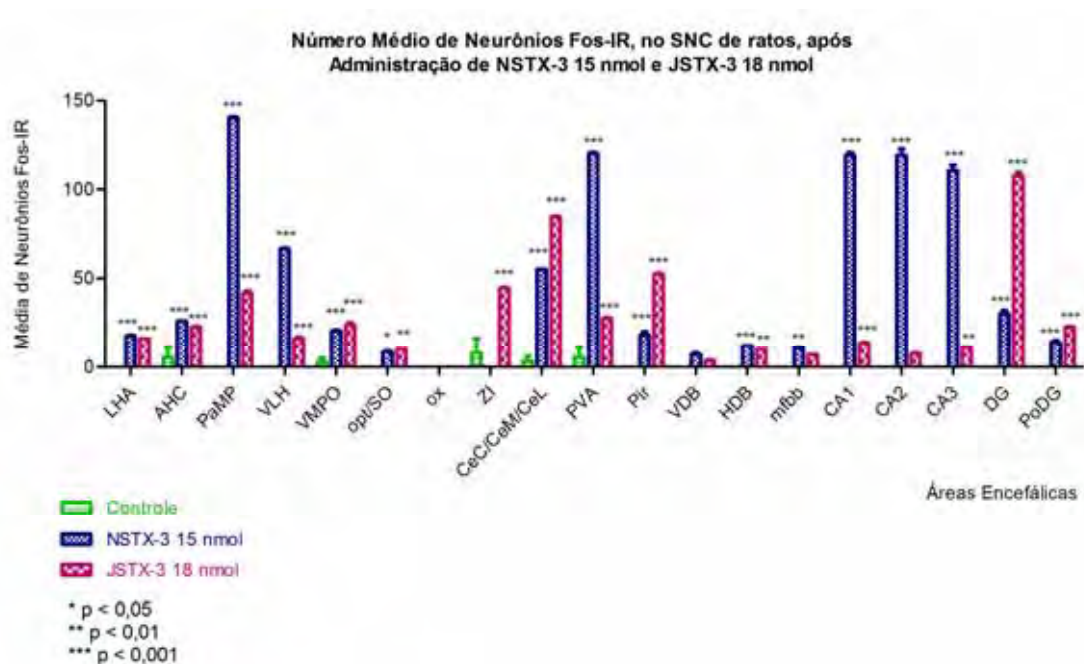


Figura 13: Gráfico do número médio de neurônios Fos-IR, do SNC de ratos Wistar, após administração intracerebroventricular de NSTX-3 15 nmol e JSTX-3 18 nmol, em relação aos animais controle (salina 0,9% [m/V]).

A figura 14 ilustra a comparação, em termos estatísticos, da afinidade das acilpoliaminas NSTX-3 15 nmol e JSTX-3 18 nmol. Nota-se uma maior interação da NSTX-3 com as áreas encefálicas: hipotálamo (PaMP, VLH), tálamo (PVA) e hipocampo (CA1, CA2, CA3). Já a JSTX-3 mostra-se mais afim pelas regiões: zona incerta, amígdala (CeC/CeL/CeM), córtex piriforme (Pir) e hipocampo (DG, PoDG).

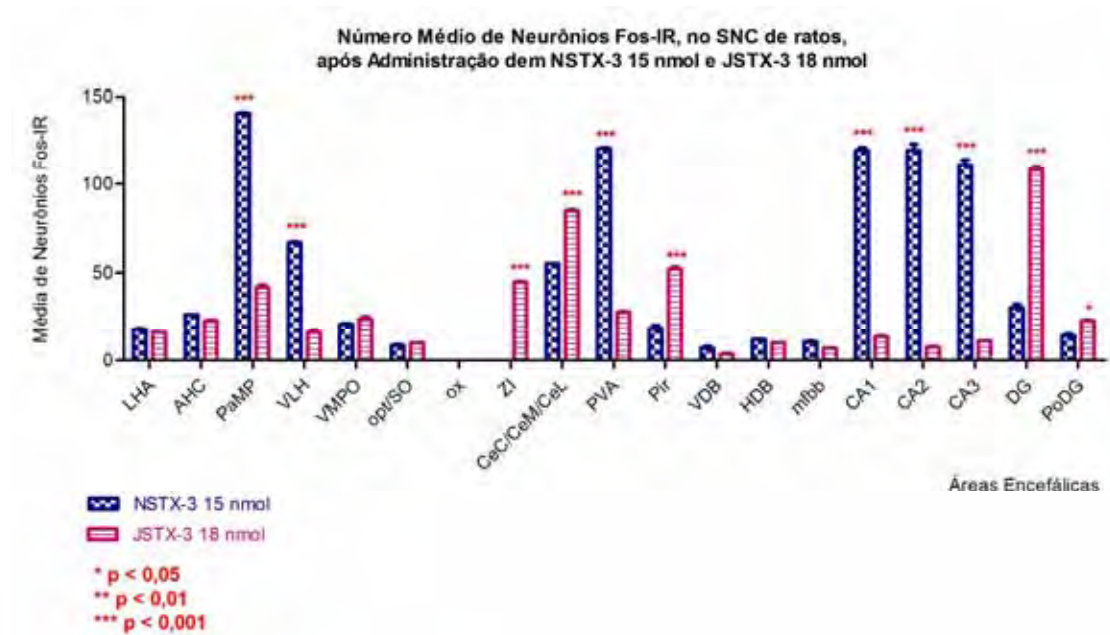


Figura 14: Gráfico do número médio de neurônios Fos-IR, do SNC de ratos Wistar, após administração intracerebroventricular de NSTX-3 15 nmol e JSTX-3 18 nmol, relacionadas entre si, estatisticamente.

Toxinas de aranhas e escorpiões são ferramentas moleculares valiosas para a compreensão dos mecanismos excitatórios neuronais e/ou respostas inibitórias (CRUZ-HÖFLING et al., 2007). Algumas neurotoxinas ativam circuitos neuronais específicos, alterando a liberação de neurotransmissores, induzindo respostas para retorno à homeostase, através da ativação de IEG, como o *c-fos*.

O desenvolvimento da metodologia descrita no item 3 permite observar as diversas áreas do SNC, que compreendem diferentes populações neuronais, que responderam à ação das toxinas NSTX-3 e JSTX-3, aumentando a expressão do *c-fos*.

O hipotálamo compõe o eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal – Figura 15) responsável pela reação de alarme, segundo a Síndrome Geral de Adaptação de Hans Selye (1936). Nesta resposta imediata a um estressor há produção o CRF (do inglês, *corticotrophin-releasing factor*) ou CRH (do inglês, *corticotrophin-releasing hormone*) por neurônios hipotalâmicos. Este composto estimula a hipófise anterior a produzir adrenocorticotrofina, que acarretará no aumento dos níveis de

glicocorticóides (GCs), pela adrenal. Esta cascata provocará efeitos metabólicos e comportamentais (JOCA et al., 2007).

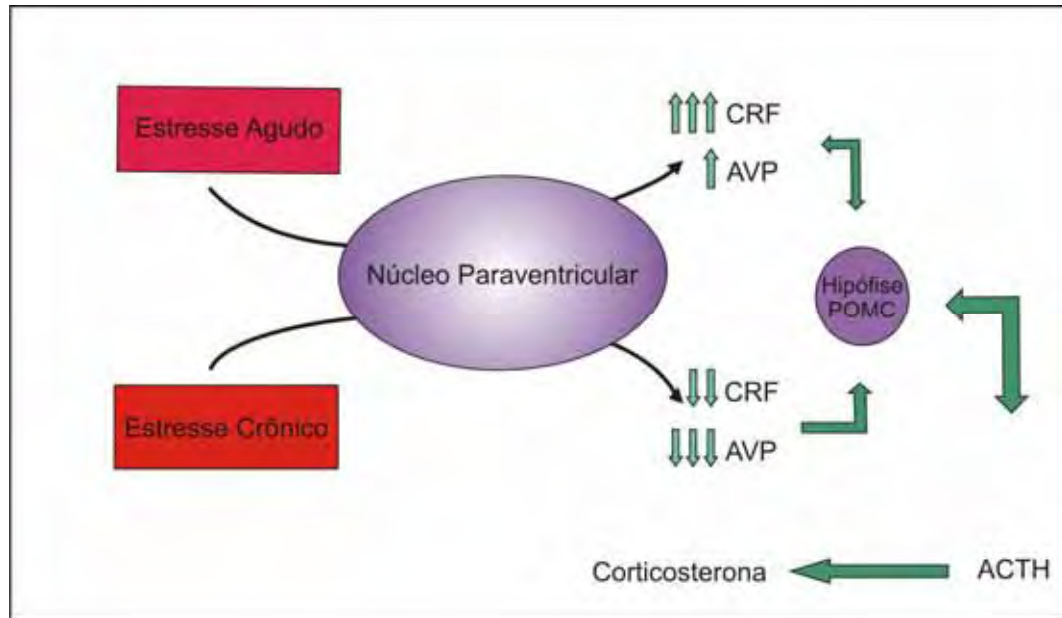


Figura 15: O eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) responde a estressores agudo e crônico. ACTH: adrenocorticotrofina; AVP: vasopressina-arginina, CRF: fator liberador de corticotrofina; POMC: pro-opiomelanocortina. Adaptado de LIGHTMAN, 2008.

Os GCs irão atuar em dois receptores específicos: receptores mineralocorticóides (MRs) e glicocorticóides (GRs), em diferentes regiões do cérebro (FUXE et al., 1996; CARRASCO e VAN de KAR, 2003). Os MRs são densamente expressos no sistema límbico, enquanto os GRs apresentam distribuição ubiquitária sendo encontrados tanto em neurônios como em células da glia (ROOZENDAAL, 2002).

A exposição crônica a estresse incontrolado e conseqüentemente, a elevados níveis de GCs tem sido relacionada com diversas doenças, incluindo depressão e PTSD (do inglês, post-traumatic stress disorders) (BAUNGARTNER et al., 1985; PEETERS e BROEKKAMP, 1994; HEIM et al., 2000; SHELINE, 2000; BONNE et al., 2004; CHARNEY, 2004; McEWEN, 2005). Por exemplo, o aumento da prevalência de episódios de estresse na vida antes da ocorrência e diagnóstico da depressão, sugere que aqueles possam ser as principais causas para o seu desenvolvimento (POST, 1992).

Em animais de laboratório, a exposição excessiva e incontrolada a eventos de estresse podem induzir alterações comportamentais e fisiológicas semelhantes à depressão de humanos, apresentando déficit motor, alterações no sono e no peso, anedonia, prejuízo da memória e secreção excessiva de GCs (WILLNER, 1986, 1990; WILLNER e MITCHELL, 2002; ANISMAN e MATHESON, 2005).

A área hipotalâmica lateral (LHA) está envolvida em uma diversidade de comportamentos complexos, participando do processamento de informações sensoriais e da modulação da resposta motora associada à fome, sede, agressividade e comportamentos reprodutivos, os quais podem ser desencadeados pela estimulação elétrica da LHA (SWANSON, 1987; BERNARDIS e BELLINGER, 1993, 1996). A iniciação de comportamentos específicos de resposta à sede e fome é relacionada à conexão entre o núcleo cerebral e a LHA. Por exemplo, acredita-se que projeções diretas do órgão subfornicial para a LHA estejam envolvidas na regulação da sede (SWANSON e LIND, 1986) e projeções diretas do núcleo arcado tem papel fundamental no comportamento alimentar (BROBERGER et al., 1998; ELIAS et al., 1998, 1999, ELIAS et al., 2008).

O hipocampo é uma estrutura médio-temporal do cérebro e tem função crucial no armazenamento e obtenção de determinados tipos de informações e frequentemente é identificada como estrutura chave nos estudos de patofisiologia dos transtornos da memória (PANEGYRES, 2004).

O hipocampo é caracterizado por áreas diferentes morfológica e fisiologicamente: giro dentado, responsável pela percepção espacial; região CA3, faz a associação entre o padrão espacial e a detecção de novidades, bem como participa da formação da memória a curto prazo, e a região CA1, que media processos que envolvem a associação do padrão temporal e auxilia na memória a médio prazo (KESNER et al., 2004; MIYASHITA, 2004).

A área CA1 do hipocampo é uma das primeiras áreas encefálicas a ser afetada pela patologia e perda neuronal na doença de Alzheimer, caracterizada pela diminuição da memória (WEST et al., 2004). Além da influência do ambiente no estudo da memória, o hipocampo também é alvo nas pesquisas para o entendimento da fisiologia e consequências do estresse.

O hipocampo, assim como a síntese e liberação de glicocorticóides pela glândula adrenal, está intimamente envolvido na resposta a alterações na homeostase (Figura 16). Quando do aumento dos receptores de GCs, o hipocampo

é um elemento pivô no *feedback* negativo do circuito clássico no qual a liberação de GCs espécie-específicos são responsáveis por finalizar a sinalização inicial da cascata HPA (MILLER e O'CALLAGHAN, 2005). Prejuízos nesta operação de retroalimentação podem resultar na manutenção dos elevados níveis séricos de glicocorticóides. Como o hipocampo é alvo dos glicocorticóides, a exposição prolongada a excessos de GCs pode prejudicar essa estrutura cerebral. Soma-se a esses aspectos, a idade que pode causar deterioração no hipocampo.

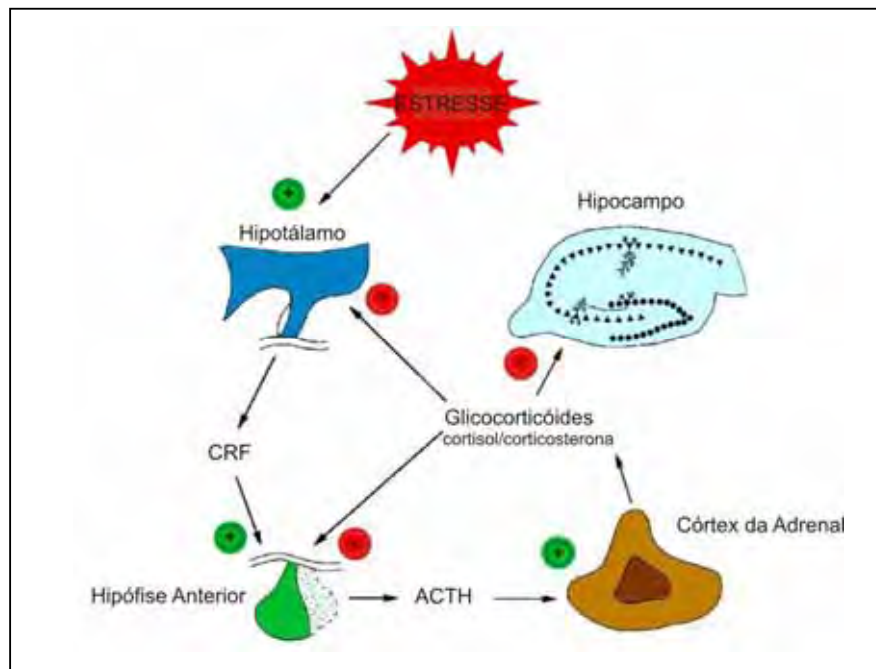


Figura 16: Principais componentes da cascata de resposta ao estresse.
Adaptado de MILLER e O'CALLAGHAN, 2002).

Sabe-se que os GCs afetam a cognição e que déficits cognitivos podem ocorrer com a idade. Essas prerrogativas podem levar a indagações sobre o fato de a exposição a níveis excessivos de GCs durante a vida também estar relacionada com o déficit cognitivo (BELANOFF et al., 2001; McEWEN, 1999). Durante a resposta ao estresse, os GCs têm como função coordenar o processamento das novas informações decorrentes do evento estressor. Os níveis excessivos desses esteróides, quer seja pela hipersecreção pela adrenal em resposta ao estressor, pela administração exógena ou pela ocorrência concomitante de doenças, como a Síndrome de Cushing, são conhecidos por acarretar danos cognitivos (BELANOFF et al., 2001; BROWN et al., 2004; DE KLOET et al., 1999).

A plasticidade característica do hipocampo é comprometida pela exposição excessiva a GCs, que podem causar atrofia de dendritos de células piramidais e diminuição de sinapses. Os GCs também podem inibir respostas de reparo, como a formação de novas sinapses, respostas típicas compensatórias de uma lesão neuronal.

Brown et al. (2004) demonstraram que pacientes com Síndrome de Cushing tratados a base de GCs apresentaram atrofia de neurônios hipocampais. Entretanto, após a suspensão deste tratamento houve reversão da atrofia, sugerindo que o dano causado no hipocampo pela exposição aos altos níveis de GCs não provoca morte neuronal.

Têm-se demonstrado que a indução de *c-fos* no hipocampo é uma consequência de formas específicas de aprendizado e memória (HUGHES e DRAGUNOW, 1995 *apud* SHETH et al., 2008).

Inúmeras evidências sugerem que o processamento da memória pelo hipocampo é modulado pela amígdala. O complexo basolateral da amígdala envia numerosas projeções para o hipocampo tanto direta quanto indiretamente, via córtex entorinal (AMARAL e COWAN, 1980; PIKKARAINEN et al., 1999). Diversos sistemas hormonais, como epinefrina, norepinefrina e GCs afetam sistemas de neurotransmissores no núcleo basolateral da amígdala, que por sua vez, modula funções hipocampais com inibição de aprendizados, medo condicionado, memória contextual e treinamento em labirinto espacial na água (SHETH et al., 2008).

No processamento da memória declarativa ou episódica, o hipocampo parece ser indispensável para a formação da memória e para o resgate de aprendizados já consolidados. A amígdala, por sua vez, tem função no processamento dos aspectos emocionais da memória. Pacientes com lesões bilaterais da amígdala armazenam recordações sem conteúdo emocional.

Conforme mostra as figuras 7, 8, 9 e 10 as acilpoliaminas NSTX-3 e JSTX-3 interagem especialmente com núcleo paraventricular do hipotálamo. Assim, o entendimento do modo de ação desta toxina pode vir a colaborar no futuro com desenvolvimento de novos fármacos para depressão, PTSD, e outros transtornos decorrentes do estresse.

Outras importantes regiões cerebrais com áreas Fos-IR ao tratamento com NSTX-3 e JSTX-3 são amígdala, região de grande importância na regulação de respostas defensivas e comportamentos de medo (GRAEFF et al., 1993) e na

modulação da consolidação da memória por outras estruturas cerebrais (McGRAUGH et al, 1996) e núcleo talâmico, que juntamente com a amígdala e hipotálamo constitui o sistema límbico, tendo, portanto, importante papel no controle das emoções. NSTX-3 e JSTX-3 também interagem com o córtex piriforme, estrutura relacionada com resposta a estímulos aversivos (SANDNER et al., 1993).

Com a finalidade de caracterizar os sítios de ação das toxinas NSTX-3 e JSTX-3, buscou-se identificar a natureza bioquímico-farmacológica dos receptores de membrana (iGluRs) e de precursores de neurotransmissores (TH) nos neurônios Fos-IR.

Para a realização dos ensaios de dupla marcação foram utilizadas séries de cortes seriados de encéfalo dos animais tratados com NSTX-3 7,5 nmol e dos animais tratados com JSTX-3 18 nmol. A escolha dessas concentrações foi baseada nos resultados da imunistoquímica para detecção de Fos, conforme citado anteriormente. Os dados obtidos a partir de tais experimentos estão ilustrados nas figuras 17 a 24.

A figura 17 contém dados da co-localização de Fos e receptor de glutamato do tipo 1, após administração da acilpoliamina NSTX-3 7,5 nmol, indicadas por setas brancas. As fotos A a D ilustram as duplas marcações no hipotálamo (12,5%) e área pré-óptica hipotalâmica (25,6%). Nas fotos E, F, G e H, têm-se a amígdala com 27,3%, o núcleo paraventricular do tálamo com 19,4%, córtex piriforme, 24,3%, e, sistema límbico, 20,0% de células duplamente marcadas, respectivamente.

A co-localização Fos/GluR2,3 decorrente da administração da toxina NSTX-3 7,5 nmol está expressa na figura 18, na qual as fotos A a D ilustram o hipotálamo (16,1%) e área pré-óptica hipotalâmica (30,4%); as fotos E, F, G e H, têm-se a amígdala com 80,0%, o núcleo paraventricular do tálamo com 22,2%, córtex piriforme, 45,8%, e, sistema límbico, 20,0% de células duplamente marcadas, respectivamente.

As figuras 19 e 20 exprimem as duplas marcações Fos/GluR4 e Fos/TH, respectivamente, após administração da acilpoliamina NSTX-3 7,5 nmol (setas brancas). Nelas pode-se observar células duplamente marcadas em todas as regiões mostradas: o hipotálamo (20,1% - Fos/GluR4 e 55,9% - Fos/TH) e área pré-óptica hipotalâmica (33,8% - Fos/GluR4 e 71,4% - Fos/TH), amígdala (21,7% - Fos/GluR4 e 5,6% - Fos/TH), núcleo paraventricular do tálamo (18,9% - Fos/GluR4 e

25% - Fos/TH), córtex piriforme (18,2% - Fos/GluR4 e 17% - Fos/TH) e, sistema límbico (39,3% - Fos/GluR4 e 0 - Fos/TH).

Co-localização Fos/GluR1, após administração de NSTX-3 7,5 nmol

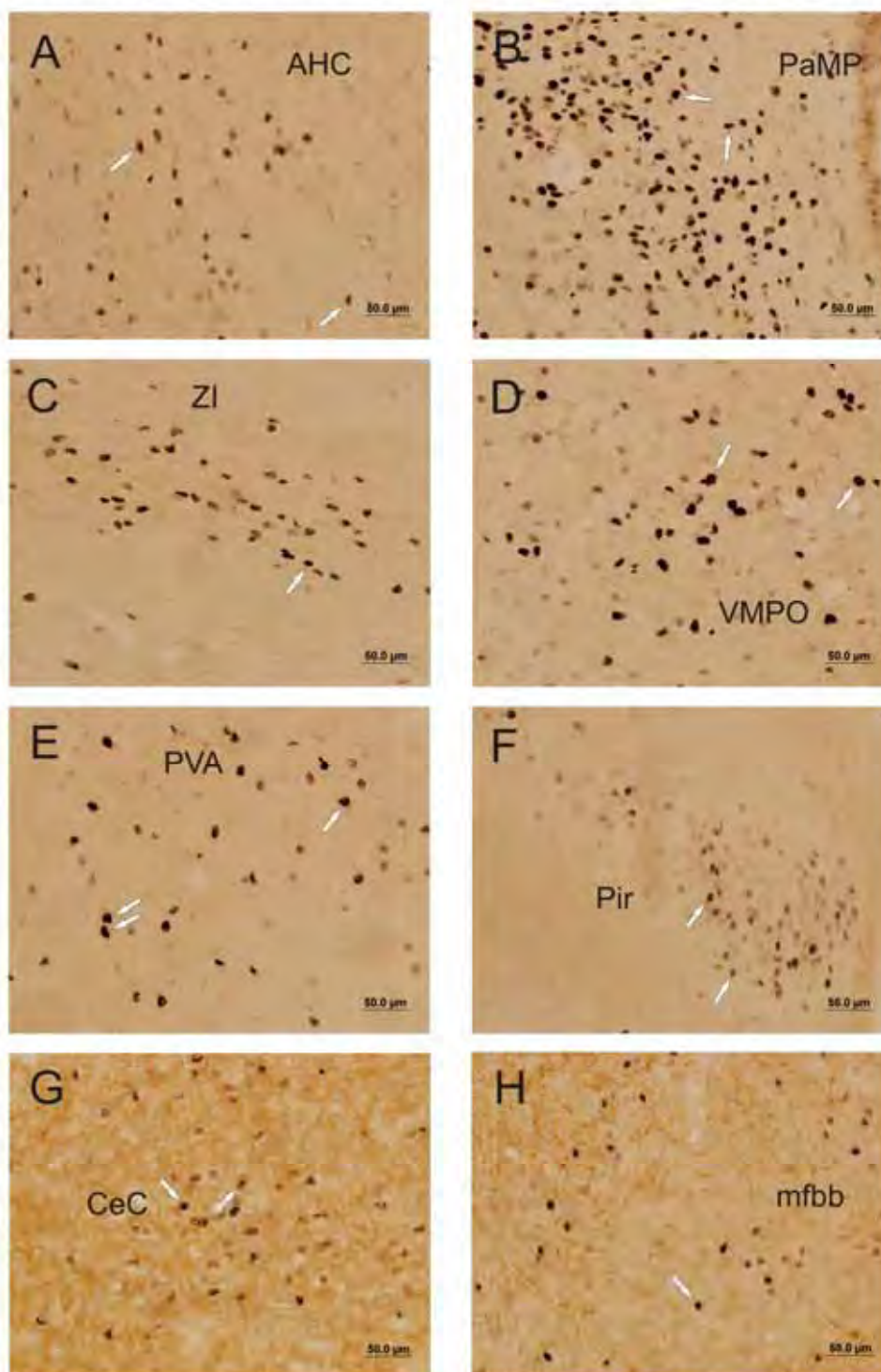


Figura 17: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de receptor GluR1 (em marrom) após administração *icv* da acilpoliaminotoxina NSTX-3 (7,5 nmol). Em A e B: Hipotálamo; C: Zona Incerta; D: Área Pré-óptica; E: Núcleo Talâmico; F: Córtex Piriforme; G: Amígdala; H: Sistema Límbico. As setas em branco indicam dupla marcação.

AHC: área hipotalâmica anterior, porção central; PaMP: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular medial; ZI: zona incerta; VMPO: núcleo pré-óptico ventromedial; CeC: núcleo central da amígdala, porção capsular; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; Pir: córtex piriforme; mfb: componente "b" do feixe prosencefálico medial.

Co-localização Fos/GluR2,3, após administração de NSTX-3 7,5 nmol

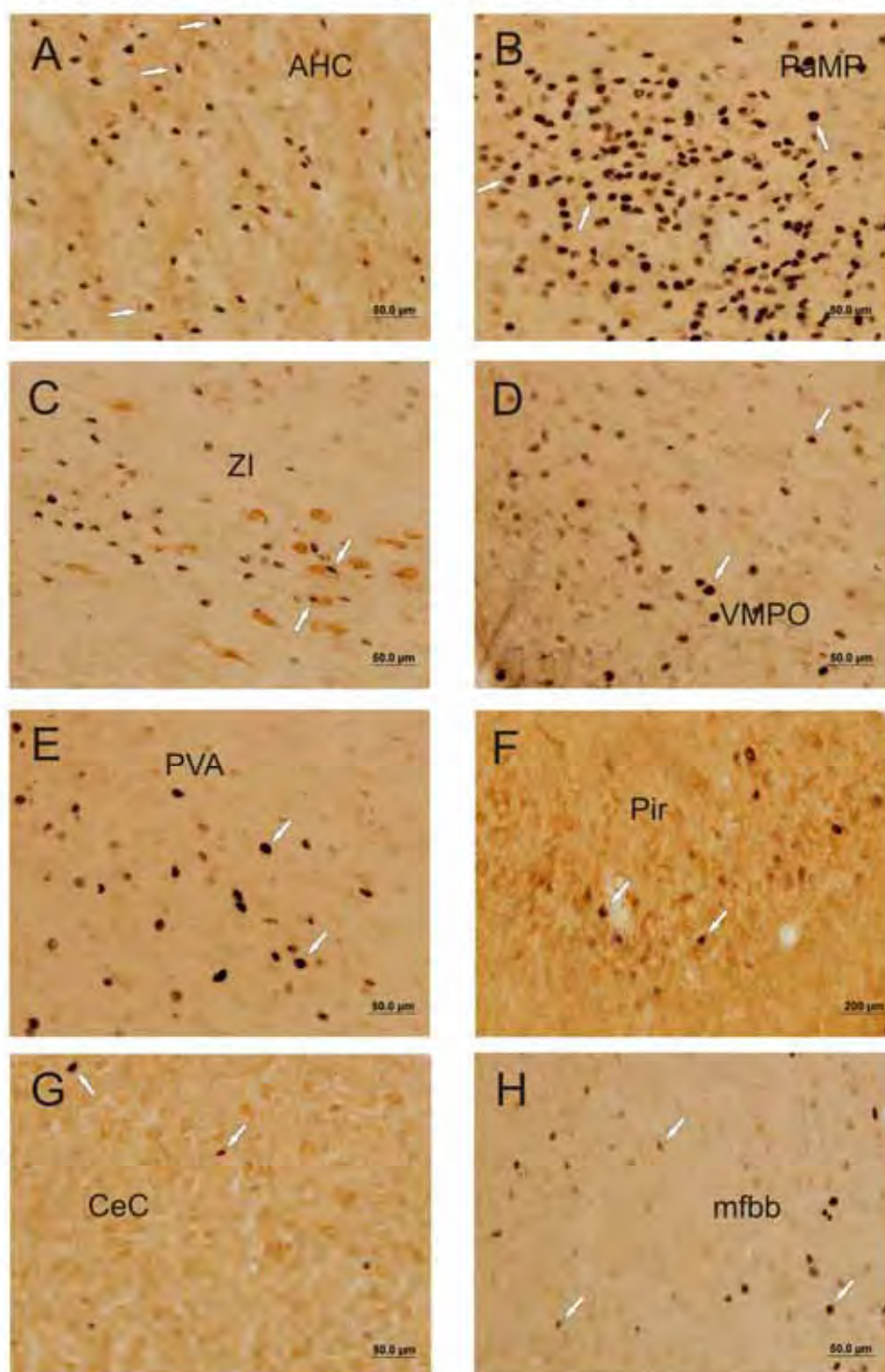


Figura 18: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de receptor GluR2,3 (em marrom) após administração *icv* da acilpoliaminotoxina NSTX-3 (7,5 nmol). Em A e B: Hipotálamo; C: Zona Incerta; D: Área Pré-óptica; E: Núcleo Paraventricular do Tálamo; F: Córtex Piriforme; G: Amígdala; H: Sistema Límbico. As setas em branco indicam dupla marcação. AHC: área hipotalâmica anterior, porção central; PaMP: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular medial; ZI: zona incerta; VMPO: núcleo pré-óptico ventromedial; CeC: núcleo central da amígdala, porção capsular; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; Pir: córtex piriforme; mfbfb: componente "b" do feixe prosencefálico medial.

Co-localização Fos/GluR4, após administração de NSTX-3 7,5 nmol

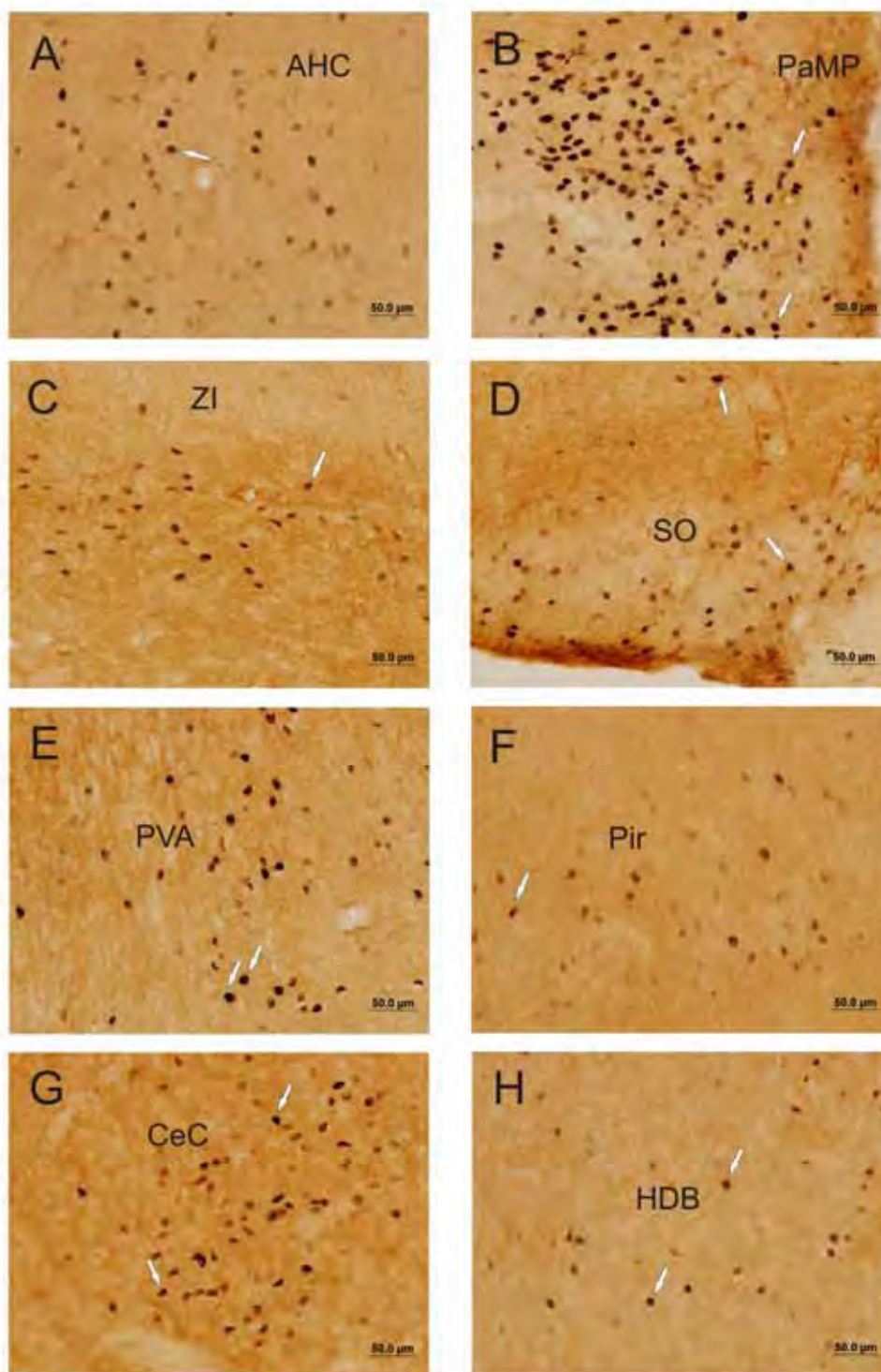


Figura 19: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de receptor GluR4 (em marrom) após administração *icv* da acilpoliaminotoxina NSTX-3 (7,5 nmol). Em A e B: Hipotálamo; C: Zona Incerta; D: Área Pré-óptica; E: Núcleo Paraventricular do Tálamo; F: Córtex Piriforme; G: Amígdala; H: Sistema Límbico. As setas em branco indicam dupla marcação.

AHC: área hipotalâmica anterior, porção central; PaMP: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular medial; ZI: zona incerta; SO: núcleo supra-óptico; CeC: núcleo central da amígdala, porção capsular; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; Pir: córtex piriforme; HDB: banda diagonal do núcleo límbico horizontal.

Co-localização Fos/TH, após administração de NSTX-3 7,5 nmol

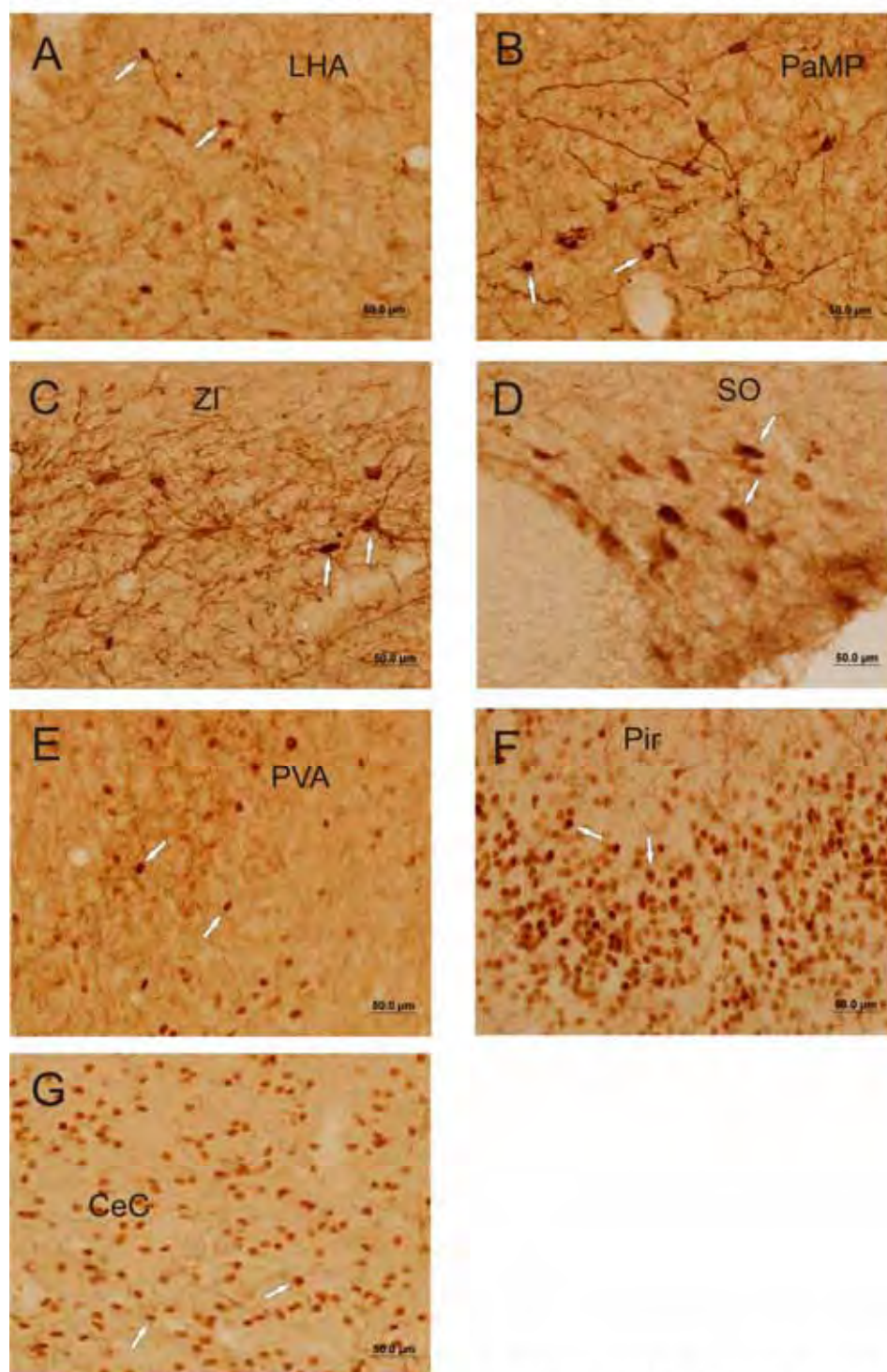


Figura 20: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de tirosina hidroxilase (TH) (em marrom) após administração *icv* da acilpoliaminotoxina NSTX-3 (7,5 nmol). Em A e B: Hipotálamo; C: Zona Incerta; D: Área Pré-óptica; E: Núcleo Paraventricular do Tálamo; F: Córtex Piriforme; G: Amígdala. As setas em branco indicam dupla marcação. LHA: área hipotalâmica lateral; PaMP: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular medial; ZI: zona incerta; SO: núcleo supra-óptico; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; Pir: córtex piriforme; CeC: núcleo central da amígdala, porção capsular.

Em relação à NSTX-3 7,5 nmol, pode-se observar um maior número de células duplamente marcadas e, portanto maior afinidade da toxina por neurônios principalmente, da amígdala (Fos/GluR2,3 – 80,0%), do hipotálamo (Fos/TH – 55,9%), da área pré-óptica (Fos/TH – 71,4%) e do sistema límbico (Fos/GluR2,3 – 54,2%), conforme expresso na tabela 4.

Tabela 4: Número de Células (em %) imunorreativas a Fos e a receptores de glutamatérgicos (GluR1, GluR2,3 e GluR4) e Fos e à tirosina hidroxilase (TH), após administração de NSTX-3, dose 7,5 nmol/animal.

	Fos/GluR1	Fos/GluR2,3	Fos/GluR4	Fos/TH
Hipotálamo	12,5%	16,1%	20,1%	55,9%
Área Pré-óptica Hipotalâmica	25,6%	30,4%	33,8%	71,4%
Amígdala	27,3%	80,0%	21,7%	5,6%
Hipocampo	-	-	-	-
Tálamo	19,3%	22,2%	18,9%	25,0%
Córtex Piriforme	24,3%	45,8%	18,2%	17,0%
Sistema Límbico	20,0%	54,2%	39,3%	-

Os campos assinalados com sinal (-) não apresentaram dupla marcação. O percentual de células apresentando dupla marcação foi calculado em relação ao número total de células Fos-IR.

As figuras 21, 22 e 23 mostram a co-localização de Fos e receptores AMPA, após administração da toxina NSTX-3 18 nmol, indicadas por setas brancas. Pode-se notar a presença de células duplamente marcadas nas regiões mostradas: hipotálamo (19,4% - Fos/GluR1, 24,6% - Fos/GluR2,3 e 17,7% - Fos/GluR4) e área pré-óptica hipotalâmica (0 - Fos/GluR1, 33,3% - Fos/GluR2,3 e 0 - Fos/GluR4), amígdala (5,5% - Fos/GluR1, 0 - Fos/GluR2,3 e 0 - Fos/GluR4), hipocampo (88,9% - Fos/GluR1, 0 - Fos/GluR2,3 e 52,9% - Fos/GluR4), tálamo (11,1% - Fos/GluR1,

22,7% - Fos/GluR2,3 e 15,8% - Fos/GluR4), córtex piriforme (21,7% - Fos/GluR4, 0 - Fos/GluR2,3 e 10,1% - Fos/GluR4) e, sistema límbico (0 - Fos/GluR4, 15,8% - Fos/GluR2,3 e 0 - Fos/GluR4).

A figura 24 ilustra as duplas marcações Fos/TH, após administração da acilpoliamina JSTX-3 18 nmol (setas brancas). Nela pode-se observar células duplamente marcadas em todas as regiões mostradas: o hipotálamo (53,5%) e área pré-óptica hipotalâmica (98,0%), amígdala (20,7%), hipocampo (17,7%), tálamo (17,1%), e, córtex piriforme (10,0%).

Co-localização Fos/GluR1, após administração de JSTX-3 18 nmol

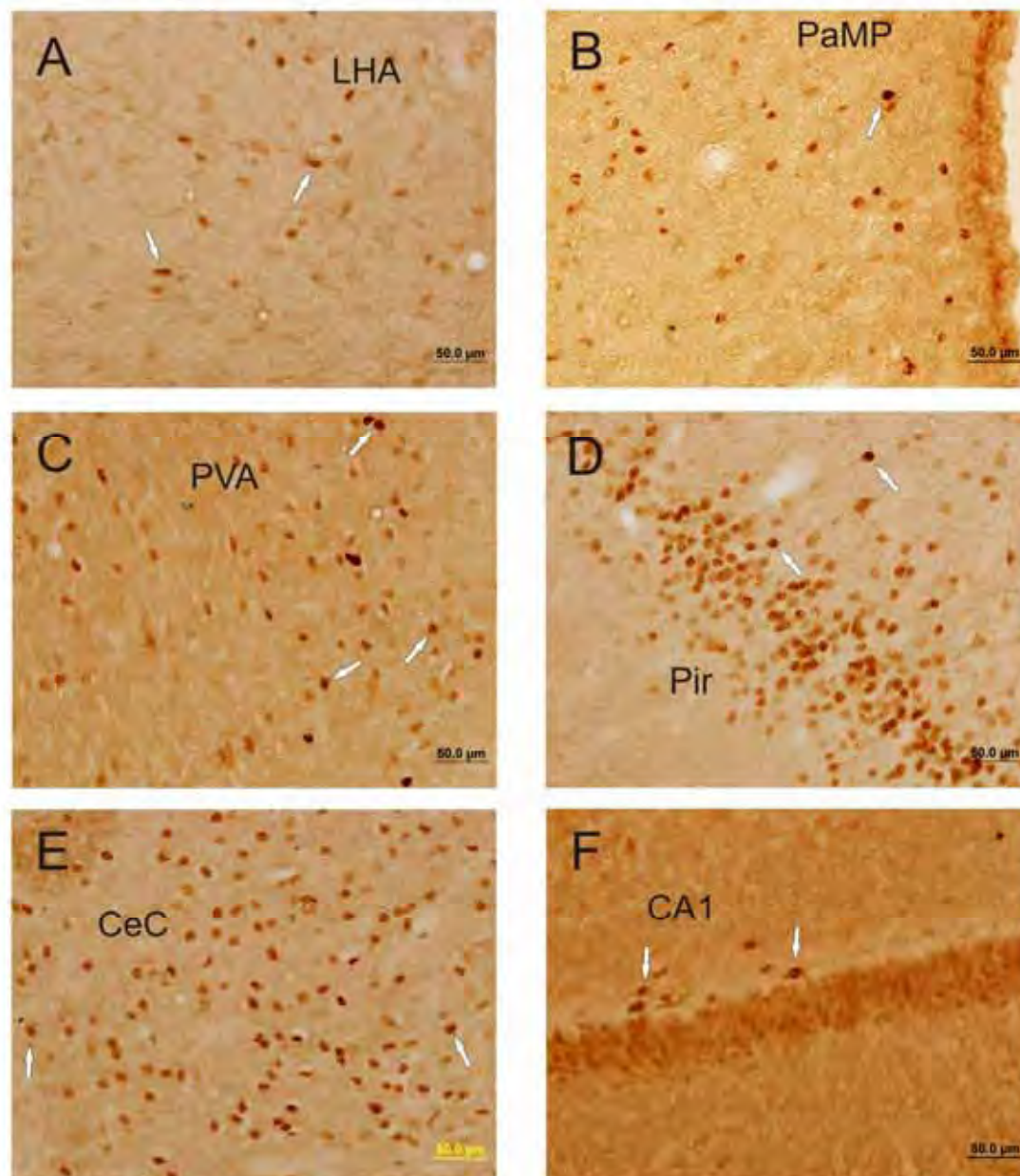


Figura 21: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de receptor GluR1 (em marrom) após administração *icv* da acilpoliaminotoxina JSTX-3 (18 nmol). Em A e B: Hipotálamo; C: Núcleo Paraventricular do Tálamo; D: Córtex Piriforme; E: Amígdala; F: Hipocampo. As setas em branco indicam dupla marcação
.LHA: área hipotalâmica lateral; PaMP: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular medial; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; Pir: córtex piriforme; CeC: núcleo central da amígdala, porção capsular; CA1: região CA1 do hipocampo.

Co-localização Fos/GluR2,3, após administração de JSTX-3 18 nmol

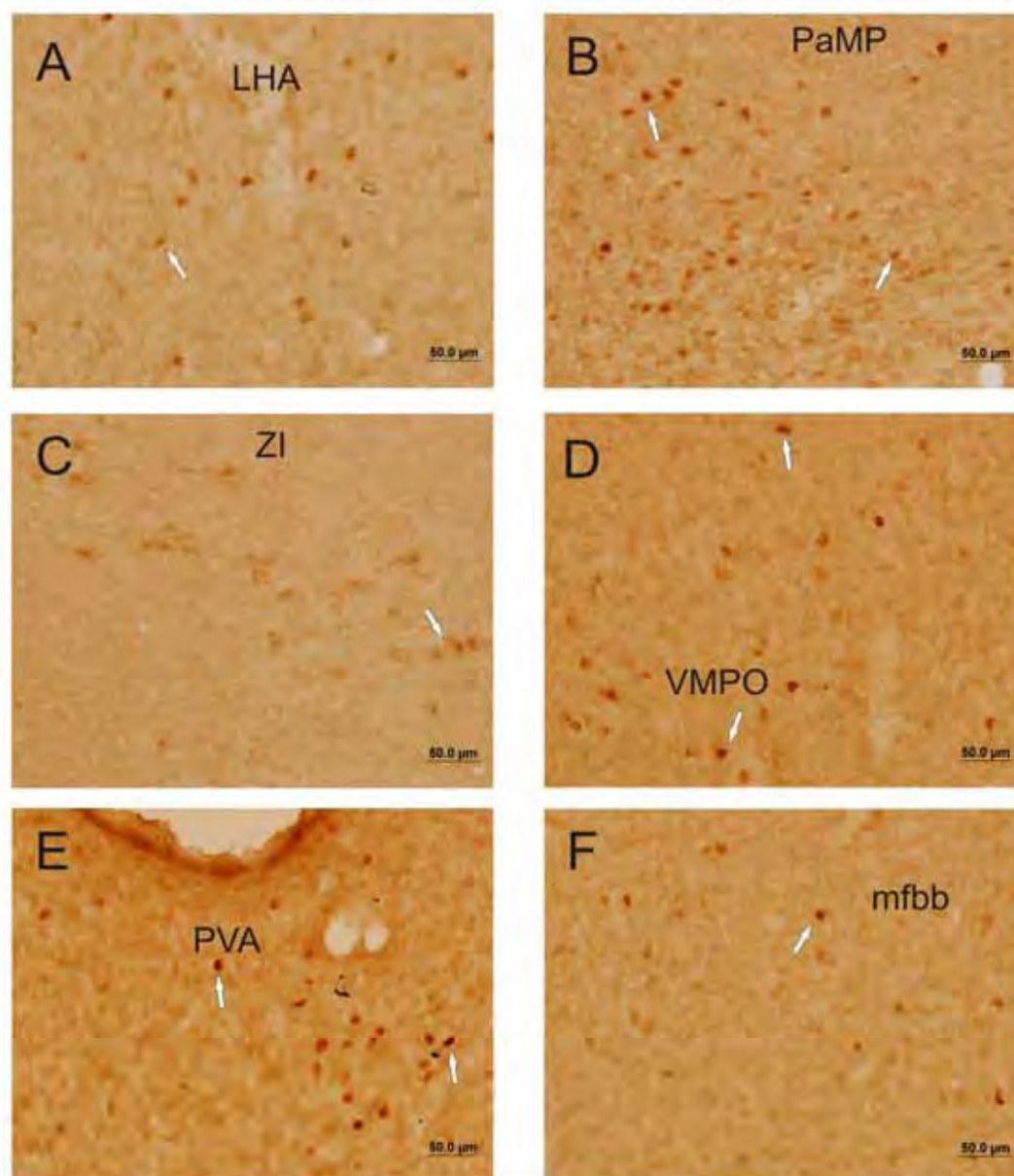


Figura 22: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de receptor GluR2,3 (em marrom) após administração *icv* da acilpoliaminotoxina JSTX-3 (18 nmol). Em A e B: Hipotálamo; C: Zona Incerta; D: Área Pré-óptica; E: Núcleo Paraventricular do Tálamo; F: Sistema Límbico. As setas em branco indicam dupla marcação.
.LHA: área hipotalâmica lateral; PaMP: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular medial; ZI: zona incerta; VMPO: núcleo pré-óptico ventromedial; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; mfbb: componente "b" do feixe prosencefálico medial.

Co-localização Fos/GluR4, após administração de JSTX-3 18 nmol

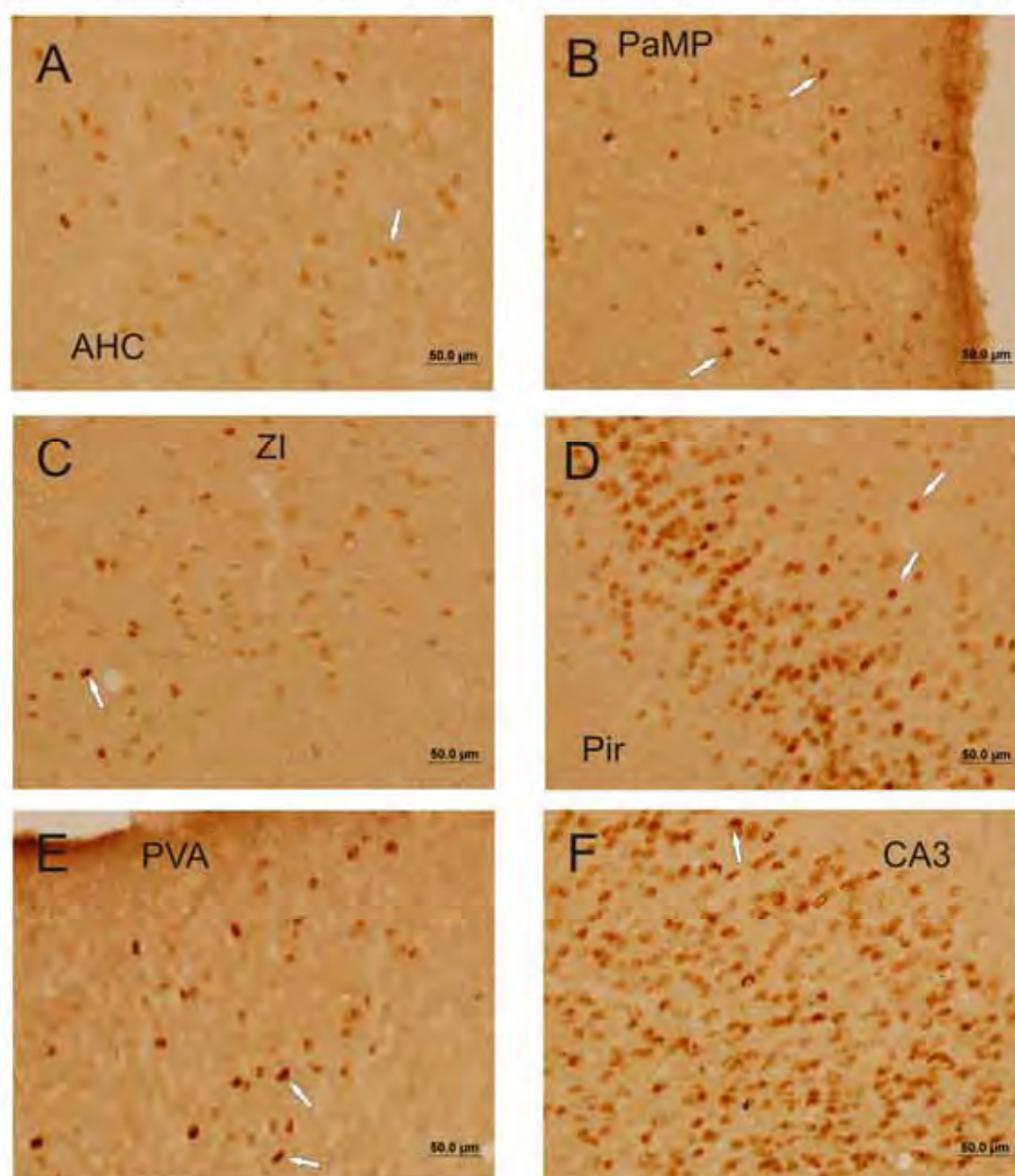


Figura 23: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de receptor GluR4 (em marrom) após administração *icv* da acilpoliaminotoxina JSTX-3 (18 nmol). Em A e B: Hipotálamo; C: Zona Incerta; D: Córtex Piriforme; E: Núcleo Paraventricular do Tálamo; F: Hipocampo. As setas em branco indicam dupla marcação. AHC: área hipotalâmica anterior, porção central; PaMP: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular medial; ZI: Zona Incerta; Pir: córtex piriforme; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; CA3: região CA3 do hipocampo.

Co-localização Fos/TH, após administração de JSTX-3 18 nmol

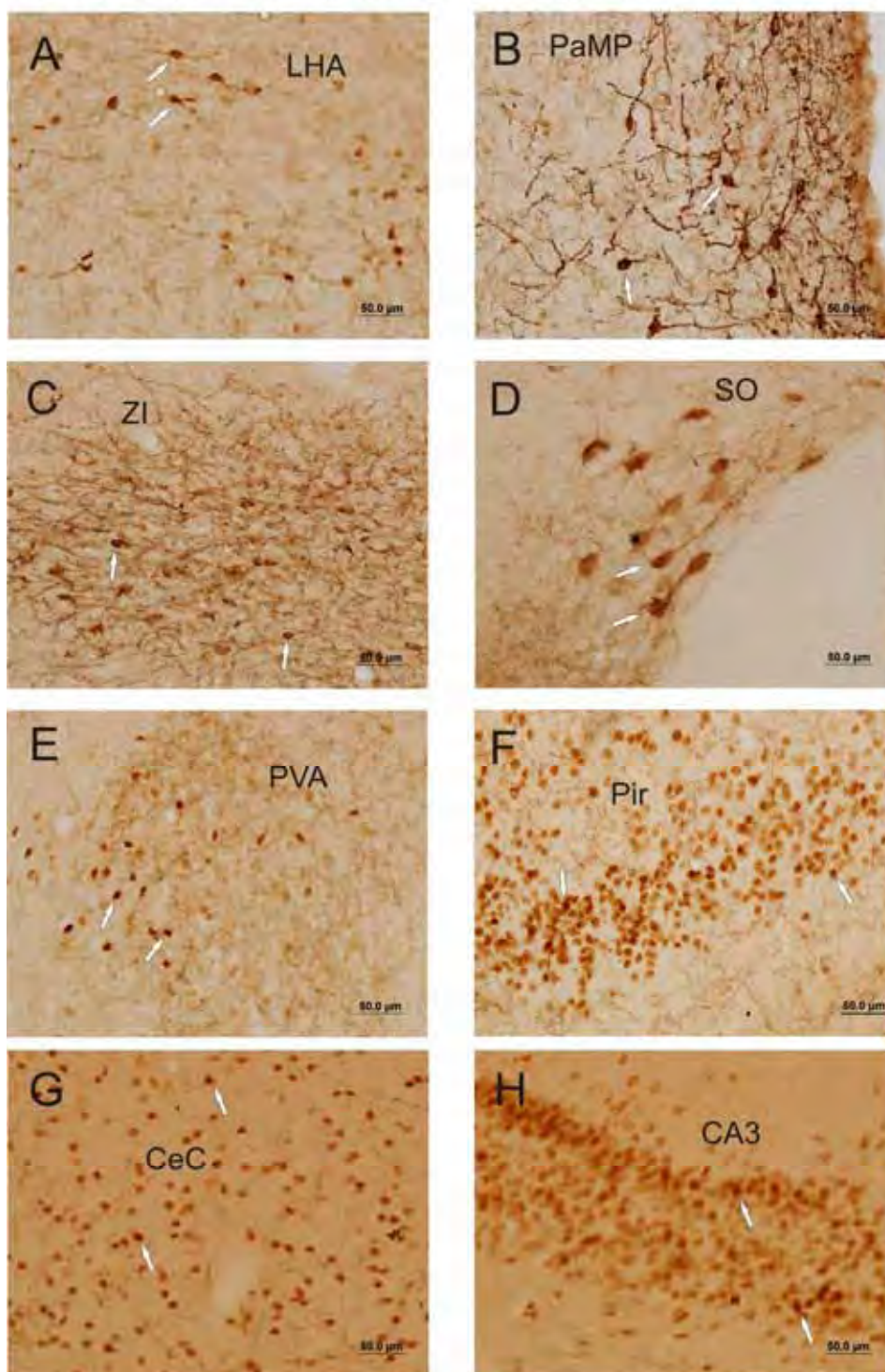


Figura 24: Fotomicrografia de campo claro evidenciando a marcação de Fos (núcleos em preto) e de tirosina hidroxilase (TH) (em marrom) após administração *icv* da acilpoliaminotoxina JSTX-3 (18 nmol). Em A e B; Hipotálamo; C: Zona Incerta; D: Área Pré-óptica; E: Núcleo Paraventricular do Tálamo; F: Córtex Piriforme; G: Amígdala; H: Hipocampo. As setas em branco indicam dupla marcação. LHA: área hipotalâmica lateral; PaMP: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular medial; ZI: zona incerta; SO: núcleo supra-óptico; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; Pir: córtex piriforme; CeC: núcleo central da amígdala, porção capsular; CA3: região CA3 do hipocampo.

A análise dos dados resultantes da administração da JSTX-3 18 nmol permite concluir que essa toxina apresenta maior interação por receptores GluR1 e GluR4 (hipocampo – 88,9% e 52,9%, respectivamente), e por neurônios dopaminérgicos (área pré-óptica – 98,0% e hipotálamo – 53,5%). A tabela 5 sumariza o percentual de neurônios duplamente marcados nas regiões analisadas do SNC de ratos.

Tabela 5: Número de Células (em %) imunorreativas à Fos e a receptores de glutamato (GluR1, GluR2,3 e GluR4) e à Fos e à tirosina hidroxilase, após administração de JSTX-3, dose 18 nmol/animal.

	Fos/GluR1	Fos/GluR2,3	Fos/GluR4	Fos/TH
Hipotálamo	19,4%	24,6%	17,6%	53,5%
Área Pré-óptica Hipotalâmica	-	33,3%	-	98,0%
Amígdala	5,5%	-	-	20,7%
Hipocampo	88,9%	-	52,9%,	17,7%
Tálamo	11,1%	22,7%	15,8%	17,1%
Córtex Piriforme	21,7%	-	10,1%	10,0%
Sistema Límbico	-	15,8%	-	-

Os campos assinalados com sinal (–) não apresentaram dupla marcação. O percentual de células apresentando dupla marcação foi calculado em relação ao número total de células Fos-IR.

Os receptores glutamatérgicos do subtipo AMPA (AMPA) são estruturas tetraméricas que constituem uma família de subunidades homólogas GluR1 a GluR4, encontradas em inúmeras sinapses dos SNC (STROMGAARD e MELLOR, 2004).

A composição da subunidade e a permeabilidade a íons Ca^{2+} dos receptores do tipo AMPA não são estáticas, mas sim dinamicamente remodeladas nas células e nas sinapses durante o desenvolvimento e em resposta à atividade neuronal, além

de serem modificadas em alterações neuronais, por exemplo, convulsão, excitotoxicidade, antipsicóticos, drogas de abuso, corticosteróides e doenças neurológicas (LIU e ZUKIN, 2007).

Outra característica relevante dos receptores glutamatérgicos do subtipo AMPA é o constante trânsito entre membrana plasmática e compartimentos intracelulares, o qual tem papel fundamental na regulação dos níveis sinápticos deste tipo de receptor (GOMES et al., 2003) e promove uma reciclagem constitutiva dos AMPAR (LÜSCHER e FRERKING, 2001).

Nos últimos anos, têm-se dedicado maior atenção aos AMPAR devido à hipótese de que estes teriam importante função na formação da memória, mensurada pela LTP (do inglês, *long-term potentiation*) (BLISS e COLLINGRIDGE, 1993) e pela LTD (do inglês, *long-term depression*) (KEMP e BASHIR, 2001).

Receptores AMPA e KA permeáveis ao íon cálcio influenciam significativamente a atividade sináptica do SNC. A ativação desses receptores provoca um aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular durante os estágios de reforço sináptico (GU et al., 1996), isquemia (GORTER et al., 1997) e excitatórios (LU et al., 1996; CARRIEDO et al., 1998).

Receptores NMDA estão envolvidos no controle central de um grande número de funções e, acredita-se que sejam importantes em certas patofisiologias e transtornos do SNC. Assim, essa classe de receptores constitui um importante alvo para o desenvolvimento de drogas em inúmeras pesquisas da área.

Para serem bloqueados, os receptores NMDA devem estar ativados pelo glutamato e à glicina, simultaneamente, mas canais iônicos também requerem a despolarização da membrana sináptica (DINGLELINE et al., 1999).

Têm-se sugerido que alterações na neurotransmissão de DA (DAVIS et al., 1991) e Glu (Tamminga, 1998) contribuem na patofisiologia de psicoses ou transtorno maior, incluindo esquizofrenia e mania.

Com exceção das estruturas hipocampais, a NSTX-3 7,5 nmol aumentou a expressão de *c-fos* de forma semelhante à da JSTX-3 18 nmol. Em alguns casos, a NSTX-3 7,5 nmol foi capaz de interagir com um percentual de neurônios superior ao da JSTX-3 18 nmol, em especial com receptores GluR2,3 (amígdala, córtex piriforme e sistema límbico) e com neurônios dopaminérgicos (hipotálamo).

Saito et al. (1985) mostraram que a JSTX-3 é capaz de bloquear completamente a resposta de receptores AMPA e KA em células piramidais CA1,

enquanto apenas altera parcialmente a resposta daquelas mediadas por receptores NMDA.

Por outro lado, Salamoni et al. (2005a) encontraram que a JSTX-3 bloqueia a atividade epileptiforme, induzida por aplicação iontoforética de NMDA, em células piramidais CA1 e, sugerem que o efeito anti-epiléptico da JSTX-3 seja, pelo menos em parte, devido à ação inibitória dessa toxina em correntes catiônicas provocadas pela ativação de receptores NMDA. Há indícios que a JSTX-3 não seja seletiva para AMPAR e, realmente, essa toxina pode ser um agente bloqueador efetivo de NMDAR (PALMA et al., 1997). Possivelmente, a combinação de bloqueio de receptores NMDA e AMPA pode acarretar um efeito anticonvulsivante sinérgico.

Os resultados desse trabalho corroboram a hipótese de que a cadeia terminal (parte IV – figura 2) da estrutura de acilpoliaminas é fundamental para sua interação com receptores neuronais (KAWAI e NAKAJIMA, 1993; PALMA et al., 1998), ilustrado na figura 25.

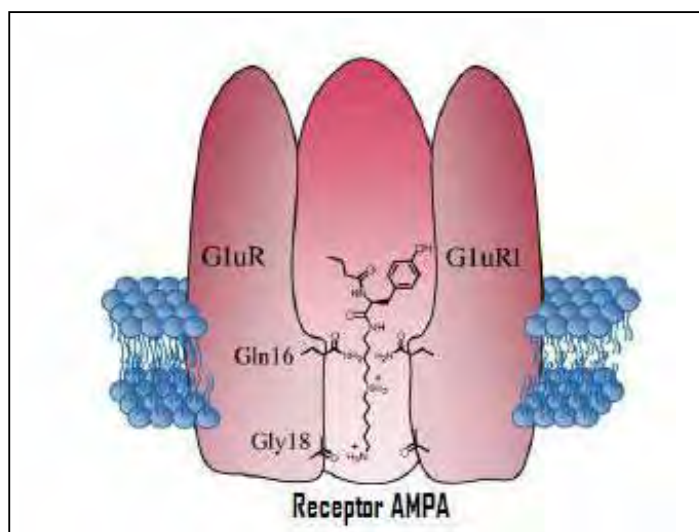


Figura 25: Interação de acilpoliaminas com receptores do subtipo AMPA, proposta por Stromgaard et al., 2005.

A tabela 6 resume as principais áreas encefálicas de ratos responsivas às acilpoliaminotoxinas NSTX-3 e JSTX-3 em diferentes concentrações. E a figura 26 mostra as áreas encefálicas com neurônios Fos-IR após administração *icv* de NSTX-3 7,5 nmol (A) e JSTX-3 18 nmol (B) e os principais subtipos de receptores neuronais ativados por tais toxinas, no SNC de ratos.

Tabela 6: Principais sítios de ação das toxinas NSTX-3 e JSTX-3 no SNC de ratos.

	NSTX-3 7,5 nmol	JSTX-3 8,8 nmol	NSTX-3 15 nmol	JSTX-3 18 nmol
Hipotálamo	LHA AHC PaMP VLH	PaMP	LHA AHC PaMP VLH	LHA AHC PaMP VLH ZI
Área Pré- óptica Hipotalâmica	VMPO opt/SO	VMPO	VMPO opt/SO	VMPO opt/SO
Amígdala	CeC/CeL/CeM		CeC/CeL/CeM	CeC/CeL/CeM
Córtex Piriforme	Pir		Pir	Pir
Sistema Límbico	VDB HDB mfbb		HDB mfbb	HDB
Tálamo			PVA	PVA
Hipocampo			CA1 CA2 CA3 DG PoDG	CA1 CA3 DG PoDG

LHA: área hipotalâmica lateral; AHC: área hipotalâmica anterior, porção central; PaMP: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular medial; VLH: núcleo hipotalâmico ventrolateral; ZI: zona incerta; VMPO: núcleo pré-óptico ventromedial; opt: trato óptico; SO: núcleo supra-óptico; ox: quiasma óptico; CeC: núcleo central da amígdala, porção capsular; CeM: núcleo central da amígdala, porção medial; CeL: núcleo central da amígdala, porção lateral; CA1: região CA1 do hipocampo; CA2: região CA2 do hipocampo; . CA3: região CA3 do hipocampo; DG: Giro denteado; PoDG: camada polimorfa do giro denteado; PVA: núcleo paraventricular do tálamo, parte anterior; Pir: córtex piriforme; VDB: banda diagonal do núcleo límbico vertical; HDB: banda diagonal do núcleo límbico horizontal; mfbb: componente “b” do feixe prosencefálico medial.

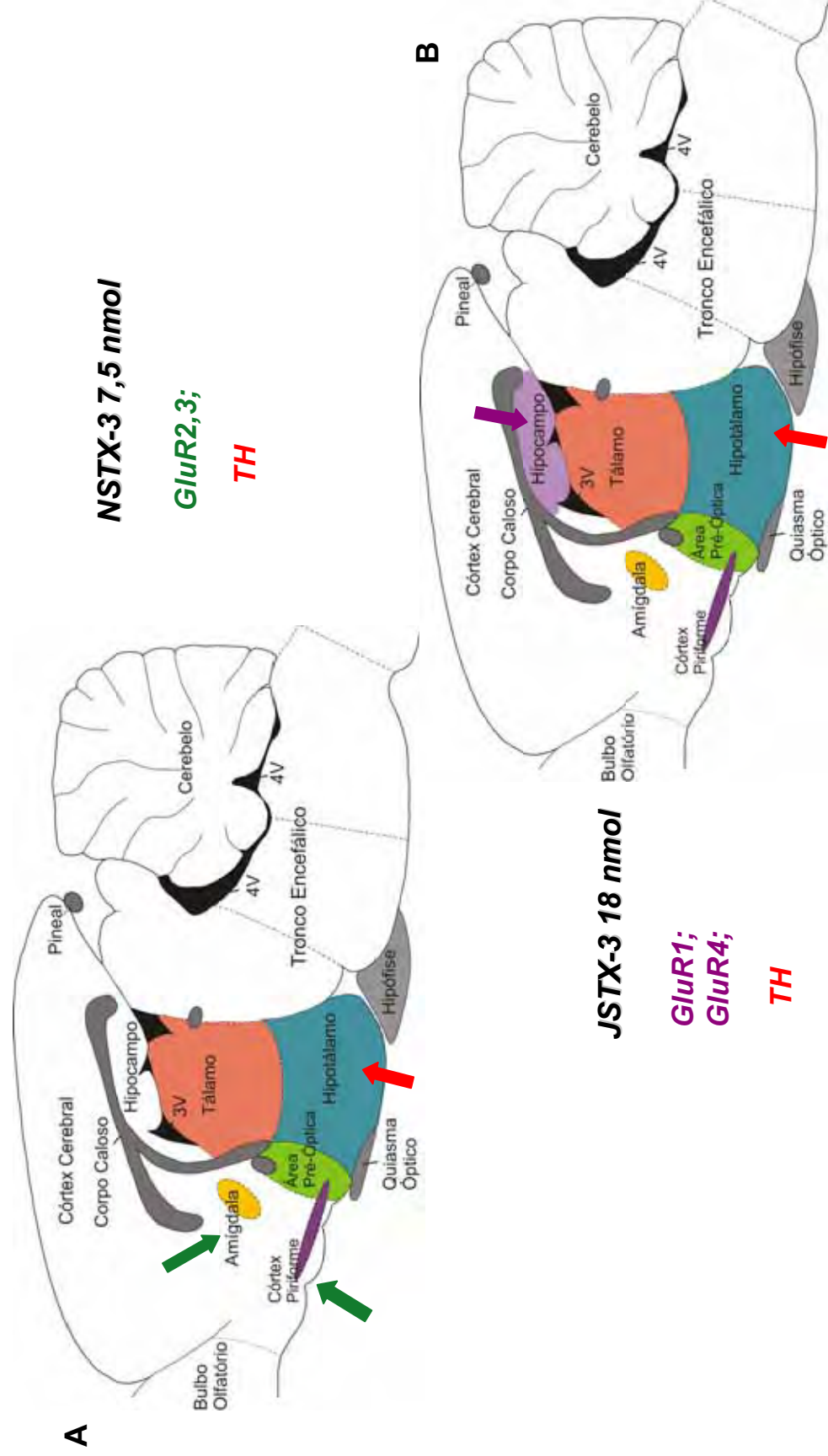


Figura 26: Esquema do corte sagital do encéfalo de ratos indicando as áreas com neurônios Fos-IR após administração de NSTX-3 7,5 nmol (A) e JSTX-3 18 nmol (B) e os principais tipos de receptores neuronais ativados por essas toxinas.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho permite concluir que a NSTX-3, carregando carga positiva na porção terminal da cadeia de poliaminas devido à presença do resíduo de arginina, na dose 7,5 nmol induz Fos em neurônios do hipotálamo, amígdala, córtex piriforme, em relação à JSTX-3, que apresenta carga neutra no final da cadeia de poliaminas, na dose 8,8 nmol.

Quando administrada na dose 15 nmol, a NSTX-3 aumenta a expressão de *c-fos* em neurônios do hipocampo e do sistema límbico, quando comparada à JSTX-3 18 nmol. Nessa dose, a JSTX-3 interage mais intensamente com neurônios da amígdala, da zona incerta hipotalâmica, do córtex piriforme e de regiões do hipocampo (DG e PoDG). Acredita-se que a maior afinidade da NSTX-3 por estruturas do SNC, verificada nesse trabalho, seja devido à presença de um grupo arginil nessa molécula.

Conclui-se, a partir dos resultados mostrados, que a caracterização neuroquímica das acilpoliaminas NSTX-3 e JSTX-3 tem elevada relevância nos estudos farmacológicos devido às áreas encefálicas responsivas às toxinas: núcleo paraventricular do hipotálamo, área pré-óptica, amígdala, tálamo e córtex piriforme que são ativados por ambas as toxinas.

Nossos resultados corroboram os estudos sobre a ação da JSTX-3 em receptores AMPA, com ação de destaque em receptores GluR1 e GluR4, no hipocampo. Além disso, verifica-se uma intensa interação dessa toxina com neurônios do sistema dopaminérgico, sobretudo no hipotálamo. Essas duas estruturas cerebrais com maior afinidade pela JSTX-3 estão intimamente relacionadas à memória e aprendizado e à resposta ao estresse. Sabendo-se que eventos de estresse crônico desencadeiam respostas hipotalâmicas e, estas inibirão a plasticidade hipocampal, a JSTX-3 pode ser utilizada como ferramenta para o melhor entendimento da ação de GCs na função hipocampal. Para estudos que envolvam eventos de estresse agudo, a JSTX-3 pode auxiliar na fisiologia de resposta ao estressor, para avaliar possíveis alterações na liberação de CRF pelo hipotálamo e suas consequências no indivíduo, nos âmbitos local e sistêmico.

A intensa interação da NSTX-3 com receptores GluR2,3 na amígdala (80,0%) possibilita a utilização dessa molécula nas pesquisas da memória, uma vez que,

apesar de a NSTX-3 7,5 nmol não apresentar indução de Fos no hipocampo, a amígdala envia inúmeras projeções para o hipocampo.

A partir dos resultados mostrados, entende-se que a NSTX-3, assim como outras acilpoliaminas já descritas, é um antagonista não seletivo de receptores de glutamato, dada à ligação da toxina com o marcador molecular, TH (tabela 4). Considerando-se que a toxina JSTX-3 já foi descrito como um poderoso agente anti-epiléptico (SALAMONI et al., 2005 a, 2005b) e os resultados do presente trabalho mostrando a ação mais potente de NSTX-3, deve-se esperar que esta toxina seja um agente neuroprotetor ainda mais potente que JSTX-3, contudo, deve-se avaliar a reversibilidade da NSTX-3.

Referências

6. REFERÊNCIAS

AMARAL D. G., COWAN W. M. Subcortical afferents to the hippocampal formation in the monkey. The *Journal of Comparative Neurology*, Philadelphia, V. 189, p. 573-591, 1980.

ALBENSI, B. C., ALASTI, N., MUELLER, A. L. Long-term potentiation in the presence of NMDA receptor antagonist arylalkylamine spider toxins. *Journal of Neuroscience Research*, New York, V. 62 (2), p. 177-185, 2000.

ANISMAN, H., MATHESON, K. Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Oxford, V. 29(4-5), p. 525-546, 2005.

ARAMAKI, K., YASHUARA, T., HIGASHIJIMA, T., YOSHIOKA, M., MIWA, A., KAWAI, N., NAKAJIMA, T. Chemical characterization of spider toxin, JSTX and NSTX. *Proc. Japan Academic*, V. 62B, p. 359-362, 1986.

ATINKSON, R. K., WRIGHT, L. G. The modes of action of spider toxins on insects and mammals. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Vancouver, V. 102 (3), p. 339-342, 1992.

BAUNGARTNER, A., GRAF, K. J., KURTEN, I. The dexamethasone suppression test in depression in schizophrenia, and during emotional stress. *Biological Psychiatry*, New York, V. 20, p. 675-679, 1985.

BEAR, M. F., CONNORS, B. W., PARADISO, M. A. *Neuroscience: Exploring the Brain*, first ed. Williams and Wilkins, 1996.

BEHE, P., STERN, P., WYLLIE, D. J., NASSAR, M., SCHOEPFER, R., COLQUHOUN, D. Determination of NMDA NR1 subunit copy number in recombinant NMDA receptors. *Proceedings. Biological sciences*, London, V. 262, p. 205-213, 1995.

BELANOFF, J. K., GROSS, K., YAGER, A., SCHATZBERG, A. F. Corticosteroids and cognition. *Journal of Psychiatric Research*, Oxford, V. 35, p. 127-145, 2001.

BELEBONI, R. O., PIZZO, A. B., FONTANA, A. C. K., CAROLINO, R. O. G., COUTINHO-NETTO, J., SANTOS, W. F. Spider and wasps neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *European Journal Pharmacological*, Amsterdam, V.493, p. 1-17, 2004.

BERGLES, D. E., ROBERTS, J. D., SOMOGVI, P. JAHR, C. E. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature*, London, V. 405, p. 187-191, 2000.

BERNARDIS, L. L., BELLINGER, L. L. The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Oxford, V. 17(2), p. 141-193, 1993.

BERNARDIS, L.L., BELLINGER, L.L. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Oxford, V. 20, p. 189-287, 1996.

BETTINI, S., BRIGNOLI, P. M. Review of the Spider Families. In: Bettini, S. (Ed). *Handbook of Experimental Pharmacology*, V. 48, *Arthropod Venoms*, p. 101-120. Springer-Verlag, New York, 1978.

BLISS, T. V., COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, London, V.361 (6407), p.31-39, 1993.

BLOOMQUIST, J. R., KINNE, L. P., DEUTSCH, V., SIMPSON, S. F. Mode of action of an insecticidal peptide toxin from the venom of a weaving spider (*Diguetia canities*). *Toxicon*, New York, V. 34, P. 1072-1075, 1996.

BONNE O., GRILLON C., VYTHILINGAM M., NEUMEISTER A., CHARNEY D. S. Adaptive and maladaptive psychobiological responses to severe psychological

stress: Implications for the discovery of novel pharmacotherapy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Oxford, V. 28, p. 65-94, 2004.

BROBERGER, C., DE-LECEA, L., SUTCLIFFE, J. G., HOKFELT, T. Hypocretin/Orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *The Journal of comparative neurology*, Philadelphia, V. 402, p. 460-474, 1998.

BROWN, E. S., WOOLSTON, J. D., FROL, A., BOBADILLA, L., KHAN, D. A., HANCZYC, M., RUSH, A. J., FLECKENSTEIN, J., BABCOCK, E., CULLUM, C. M. Hippocampal volume, spectroscopy, cognition, and mood in patients receiving corticosteroid therapy. *Biological psychiatry*, New York, V. 55, p. 538-545, 2004.

BUCHERL, W. Spiders. In: Bucherl, W., Buckley, E. E. Eds. *Venomous Animals and their Venoms*, V. III, *Venomous Invertebrates*, p. 197-277. Academic Press. London, 1971.

CAIRRÃO, M. A. R., RIBEIRO, A. M., PIZZO, A. B., FONTANA, A. C. K., BELEBONI, R. O., COUTINHO-NETO, J., MIRANDA, A., SANTOS, W. F. Anticonvulsant and GABA Uptake Inhibition Properties of Venom Fractions from the Spiders *Parawixia bistriata* and *Scaptocosa raptoria*. *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)*, Lisse, V. 40 (6), p. 472-477, 2002.

CAMPEAU, S., HAYWARD, M. D. Induction of the *c-fos* proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. *Brain Research*, Amsterdam, V. 565 (2), p.349-352, 1991.

CAMPS, M., KELLY, P. H., PALACIOS, J.M. Autoradiographic localization of dopamine D1 and D2 receptors in the brain of several mammalian species. *Journal of Neural Transmission*, Wien, V. 80, p. 105-127, 1990.

CARNEIRO, A. M. D., KUSHMERICK, C., KOENEN, J., ARNDT, M. H. L., CORDEIRO, M. N., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., DINIZ, C. R., GÓMEZ, M. V.,

- KALAPOTHAKIS, E., PRADO, V. F. Expression of a functional recombinant *Phoneutria nigriventer* toxin active on K⁺ channels. *Toxicon*, New York, V. 41 (3), p. 305-313, 2003.
- CARRASCO, G., VAN de KAR, L. D. Neuroendocrine Pharmacology of stress. *European Journal Pharmacology*, Amsterdam, V. 463, p. 235-272, 2003.
- CARRIEDO, A. G., YIN, H. Z., SENSI, S. L., WEISS, J. H. Rapid Ca²⁺ entry through Ca²⁺-permeable AMPA/Kainate channels triggers marked intracellular Ca²⁺ rises and consequent oxygen radical production. *The Journal of Neuroscience*, Baltimore, V. 18(19), p. 7727-7738, 1998.
- CÉSAR, L. M. M. Caracterização da Estrutura Molecular e da Toxicidade das B-Carbolinotoxinas da Peçonha da Aranha *Parawixia bistriata* (Aranea: Areneidae). Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biologia Celular e Molecular. Instituto de Biociências de Rio Claro (SP), Universidade Estadual Paulista, p. 67, 2001.
- CHARNEY, D. S. Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: Implications for successful adaptation to extreme stress. *The American Journal of Psychiatry*, Washington, V. 161, p. 195-216, 2004.
- CHASTRETTE, N., PFAFF, D. W. Effects of daytime and nighttime stress on Fos-like immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, the habenula, and the posterior paraventricular nucleus of the thalamus. *Brain Research*, Amsterdam, V.563 (1-2), p.339-44, 1991
- COLLINGRIDGE, G. L. Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature*, London, V. 330(6149), p. 604-605, 1987.
- COLLINGRIDGE, G. L., LESTER, R. A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacological Reviews*, Baltimore, V. 41 (2), p. 143-210, 1989.

- CONN, P. J., PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Palo Alto, V. 37, p.205-37, 1997.
- COUTINHO-NETTO, J., ABDUL-GHANI, A. S., COLLINS, J. F., BRADFORD, H. F. Is glutamate a trigger factor in epileptic hyperactivity? *Epilepsia*, Amsterdam, V. 22, p. 289-296, 1981.
- CRUZ-HÖFLING, M. A., ZAGO, G. M., MELO, L. L., RAPÔSO, C. c-FOS and n-NOS reactive neurons in response to circulating *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Brain Research Bulletin*, New York, V. 73, p. 14-126, 2007.
- CULLINAN W. E., HERMAN J. P., BATTAGLIA D. F., AKIL H., WATSON S. J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*, Oxford, V. 64, p. 477-505, 1995.
- DAVIS, K.L., KAHN, R.S., KO, G., DAVIDSON, M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *The American Journal of Psychiatry*, Washington, V. 148, p. 1474-1486, 1991.
- DE KLOET, E. R., OITZL, M. S., JOELS, M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends in Neuroscience*, Amsterdam, V. 22, p. 422-426, 1999.
- DINGLELINE, R., BORGES, K., BOWIE, D., TRAYNELIS, S. F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, Beltimore, V. 51, p. 7-61, 1999.
- DRAGUNOW, M., FAULL, R. The use of *c-fos* as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *Journal of Neuroscience Methods*, Amsterdam, V. 29, p. 261-265, 1989
- ELIAS, C. F., SAPER, C. B., MARATOS-FLIER, E., TRITOS, N. A., LEE, C., KELLY, J., TATRO, J. B., HOFFMAN, G. E., OLLMANN, M. M., BARSH, G. S., SAKURAI, T., YANAGISAWA, M., ELMQUIST, J. K. Chemically defined projections linking the

mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *The Journal of Comparative Neurology*, Philadelphia, V. 402, p. 442-459, 1998

ELIAS, C. F., ASCHKENASI, C., LEE, C., KELLY, J., AHIMA, R. S., BJORBAEK, C., FLIER, J. S., SAPER, C. B., ELMQUIST, J. K. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*, Cambridge, V. 23, p. 775-786, 1999.

ELIAS, C. F., SITA, L. V., ZAMBON, E. R., VASCONCELOS, L. A. P., BITTENCOURT, J. C. Melanin-concentrating hormone projections to areas involved in somatomotor responses. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, Chichester, V. 35, p.188-201, 2008.

ESCOUBAS, P., DIOCHOT, S., CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie*, Paris, V. 82 (9-10), p. 893-907, 2000.

FONNUN, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*, Oxford, V. 42, p. 1-11, 1984.

FONTANA, A. C. K., GUIZZO, R., BELEBONI, R. O., MEIRELLES E SILVA, A. R., COIMBRA, N. C., AMARA, S. G., SANTOS, W. F. COUTINHO-NETO, J. Purification of a neuroprotective component of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate uptake. *British Journal of Pharmacology*, London, V. 139(7), p. 1297-1309, 2003.

FURUKAWA, H., SINGH, S. K., MANCUSO, R., GOUAUX, E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, London, V. 438, p. 185-192, 2005.

FUXE, K., DIAZ, R., CINTRA, A., BHATNAGAR, M., TINNER, B., GUSTAFSSON, J. A., OGREN, S. O., AGNATI, L. F. On the role of glucocorticoid receptors in brain plasticity. *Cellular and molecular neurobiology*, New York, V. 16(2), p. 239-258, 1996.

GRAEFF, F. G., SILVEIRA, M. C., NOGUEIRA, R. L., AUDI, E. A., OLIVEIRA, R. M. W. Role of amygdala and periaqueductal grey in anxiety and panic. *Behavioural Brain Research*, Amsterdam, V. 58, p.123-127, 1993.

GREENAMYRE, J. T., OLSEN, J. M. M., PENNEY, J. B., YOUNG, A. B. Autoradiographic characterization of *N*-methyl-D-aspartate-, quisqualate- and kainite-sensitive glutamate binding sites. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, Baltimore, V. 233, p. 254-263, 1985.

GRISHIN, E. V. Spider neurotoxins and their neuronal receptors. *Pure and Applied Chemistry*. Oxford, V. 66 (1), p. 783-790, 1994.

GRISHIN, E. V., VOLKOVA, T. M., ARSENIYEV, A. S., RESHETOVA, O. S., ONOPRIENKO, V. V., MAGAZANIC, L. G. Structure-functional characterization of argiopine-an ion channel blocker from the venom of spider *Argiope lobata*. *Bioorganicheskaya khimiya*, Russia (Federation), V. 12, p. 1121-1124, 1986.

GOMES, A. R., CORREIA, S. S., CARVALHO, A. L., DUARTE, C. B. Regulation of AMPA receptor activity, synaptic targeting and recycling: role in synaptic plasticity. *Neurochemical Research*, New York, V.28 (10), p.1459-1473, 2003.

GORTER, J. A., PETROZZINO, J. J., ARONICA, E. M., ROSENBAUM, D. M. OPITZ, T. BENNETT, M. V. L., CONNOR, J. A., ZUKIN, R. S. Global Ischemia Induces Downregulation of Glur2 mRNA and Increases AMPA Receptor-Mediated Ca²⁺ Influx in Hippocampal CA1 Neurons of Gerbil. *The Journal of Neuroscience*, Baltimore, V. 17(16), p. 6179-6188, 1997.

GU, J. G., ALBUQUERQUE, C., LEE, C. J., MACDERMOTT, A. B. Synaptic strengthening through activation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors. *Nature*, London, V. 381, p. 793-796, 1996.

Guide of Care and Use of Laboratory Animals – Versão em Português (<http://www.nap.edu>), 2003.

HARVEY, A. L., BRADLEY, K. N., COCHRAN, S. A., ROWAN, E. G., PRATT, J. A., QUILLFELDT, J. A., JERUSALINSKY, D. A. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon*, New York, V. 36, p. 1635– 1640, 1998.

HEADING, C. E. Conus peptides and neuroprotection. *Current Opinion in Investigational Drugs*, London, V. 3(6), p. 915-920, 2002.

HEIM, C., NEWPORT, D. J., HEIT, S., GRAHAM, Y. P., WICOX, M., BONSALE, R., MILLER, A. H., NEMEROFF, C. B. Pituitary–adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse childhood. *JAMA*, Chicago, V. 284(5), p. 592-597, 2000.

HILE, B. Ionic Channels of Excitable Membranes. 2nd ed. Sinauer Associates: Inc., Sunderland, Massachusetts, 1984.

HIMI, T., SAITO, H., KAWAI, N., NAKAJIMA, T. Spider toxin (JSTX-3) inhibits the convulsions induced by glutamate agonists. *Journal of Neural Transmission. General section*, Wien, V. 80, p. 95-104, 1990.

HISADA, M., FUJITA, T., NAOKI, H., ITAGAKI, Y., IRIE, H., MIYASHITA, M., NAKAJIMA, T. Structures of spider toxins: Hydroxyindole-3-Acetyl polyamines and a new generalized structure of type-e compounds obtained from the venom of the Joro Spider, *Nephila clavata*. *Toxicon*, New York, V. 36 (8), p. 1115-1125, 1998.

HOFFMAN, G. E., LYO, D. Anatomical Markers of Activity in Neuroendocrine Systems: Are we all 'Fos-ed out'? *Journal of Neuroendocrinology*, Oxford, V. 14, p. 259-268, 2002.

HUGHES, P., DRAGUNOW, M. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacological Reviews*, Baltimore, V. 47, p. 133-178, 1995.

INO, H., NAKADE, S., NIINOBE, M., IKENAKA, K., TESHIMA, T., WAKAMIYA, T., MATSUMOTO, T., SHIBA, T., KAWAI, N., MIKOSHIBA, K. Characterization of

binding sites for spider toxin, [^3H]NSTX-3, in the rat brain. *Neuroscience Research*. Shannon, V. 8, p. 29-39, 1990.

JACKSON, H., PARKS, T. N. Spider toxins: Recent applications in neurobiology. *Annual. Review of Neuroscience*, Palo Alto, V. 12, p. 405-414, 1989.

JACKSON, H. C., SCHEIDELER, M. A. Behavioral and anticonvulsant effects of Ca^{2+} channel toxins in DBA/2 mice. *Psychopharmacology*, Berlin, V. 126 (1), p. 85-90, 1996.

JOCA, S. R. L., FERREIRA, F. R., GUIMARÃES, F. S. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrgergic neurotransmitter systems. *Stress*, Amsterdam, V. 10 (3), p. 227-249, 2007.

KAWAI, N., MIWA, A., ABE, T. Spider venom contains specific receptor blocker of glutamatergic synapses. *Brain Research*. Amsterdam, V. 247, p. 169-171, 1982.

KAWAI, N. YAMAGISHI, S., SAITO, M. FURUYA, K. Blockade of synaptic transmission in the squid giant by a spider toxin (JSTX). *Brain Research*. Amsterdam, V. 278 (1-2), p. 346-349, 1983.

KAWAI, N., MIWA, A., SAITO, M., PAN-HOU, H. S., YOSHIOKA, M. Spider toxin (JSTX) on the glutamate synapse. *Journal de Physilogie*. Paris, V. 79 (4), p. 228-231, 1984.

KAWAI, N., MIWA, A., SHIMAZAKI, K., SAHARA, Y., ROBINSON, H. P., NAKAJIMA, T. Spider toxin and the glutamate. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, Oxford, V. 98, p. 87-95, 1991.

KAWAI, N.; NAKAJIMA, T. Neurotoxins from spider venoms. In Harvey, A. L. (ED), *"Natural and Synthetic Neurotoxins"*. Academic Press, London. p. 319-345, 1993.

- KEMP, N., BASHIR, Z. I. Long-term depression: a cascade of induction and expression mechanisms. *Progress in Neurobiology*, New York, V.65 (4), p.339-365, 2001.
- KESNER, R. P., LEE, I., GILBERT, P. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Reviews in the Neurosciences*, London, V. 15, p. 333-351, 2004.
- KING, G. F. The wonderful world of spiders: preface to the special Toxicon issue on spider venoms. *Toxicon*. New York, V. 43, p. 471-475, 2004.
- KONNO, K., HISADA, M., NAOKI, H., ITAGAKI, Y., YASUHARA, T., NAKATA, Y., MIWA, A., KAWAI, N. Molecular determinants of binding of a wasp toxins (PMTXs) and its analogs in the Na⁺ channels proteins. *Neuroscience Letters*, Limerick, V. 285, p. 29-32, 2000.
- KOVÁCS, K. J. Measurement of Immediate-Early Gene Activation- *c-fos* and Beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, Oxford, V. 20, p. 665–672, 2008.
- LAUBE, B., KUHSE, J., BETZ, H. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience*, Baltimore, V. 18, p. 2954-2961, 1998.
- LIGHTMAN, S. L. The Neuroendocrinology of Stress: A Never Ending Story. *Journal of Neuroendocrinology*, Oxford, V. 20, p. 880-884, 2008
- LIU, S. J., ZUKIN, R. S. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends in Neurosciences*, Amsterdam, V. 30 (3), p. 126-134, 2007.
- LU, Y. M. YIN, H. Z., CHIANG, J. WEISS, J. H.. Ca²⁺-Permeable AMPA/Kainate and NMDA Channels: High Rate of Ca²⁺ Influx Underlies Potent Induction of Injury. *The Journal of Neuroscience*, Baltimore, V. 16(17), p. 5457-5465, 1996.

LUCKMAN, S. M., DYBALL, R. E., LENG, G. Induction of *c-fos* expression in hypothalamic magnocellular neurons requires synaptic activation and not simply increased spike activity. *The Journal of Neuroscience*, Baltimore, V.14, p. 4825–4830, 1994.

LUSCHER, C., FRERKING, M. Restless AMPA receptors: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neuroscience*, Amsterdam, V. 24 (11), p.665–670, 2001.

MACK, K. J., MACK, P. A. Induction of transcription factors in somatosensory cortex after tactile stimulation. *Brain research. Molecular brain research*, Amsterdam, V.12 (1-3), p.141-147, 1992.

MARQUES, M. R., MENDES, M. A., TORMENA, C. F., SOUZA, B. M., RITTNER, R., PALMA, M. S. Structure determination of an organometallic 1-(diazenaryl) ethanol: a novel toxin subclass from the web of the spider *Nephila clavipes*. *Chemistry & Biodiversity*, Zürich, V.1 (6), p. 830-838, 2004.

McCORMICK, K. D., MEINWALD, J. Neurotoxic acylpolyamines from spider venom. *Journal of Chemical Ecology*, New York, V. 19 (10), p. 2411-2451, 1993.

McEWEN, B. S. Stress and the aging hippocampus. *Frontiers in neuroendocrinology*, New York, V. 20, p. 49-70, 1999.

McEWEN, B. S. Glucocorticoids, depression and mood disorders: Structural remodelling in the brain. *Metabolism: clinical and experimental*, New York, V. 54(Suppl 1), p. 20-23, 2005.

McGAUGH, J. L., CAHILL, L., ROOZENDAAL, B. Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, V. 93, p. 13508-13514, 1996.

MILLER, D. B., O'CALLAGHAN, J. P. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism: clinical and experimental*, New York, V. 51 (1), p. 5-10, 2002.

MILLER, D. B., O'CALLAGHAN, J. P. Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Research Reviews*, Oxford, V. 4, p. 123-140, 2005.

MUELLER, A. L., ROELOFFS, R. JACKSON, H. In *The Alkaloids*. Chemistry and Pharmacological; Cordell, G. A., Ed. Academic Press: San Diego, V. 46, p. 63-94, 1995.

MIYASHITA, Y. Cognitive memory: cellular and network machineries and their top-down control. *Science*, Washington, V. 306, p. 435-440, 2004.

MORIYOSHI, K., MASU, M., ISHII, T., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N., NAKANISHI, S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, London, V. 354, p. 31-37, 1991.

NIHEI, K.; KATO, M. J., YAMANE, T., PALMA, M. S., KONNO, K. –“2-Nitro-and 2,4-dinitrobenzenesulfonamides as protective groups for primary amines”. *Synlett*, New York, V. 7, p. 1167-1169, 2001.

NIHEI, K., KATO, M. J., YAMANE, T., PALMA, M. S., KONNO, K. An efficient and versatile synthesis of acylpolyamine spider toxins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, New York, V. 12, p. 299-302, 2002.

NILSSON, A., ERIKSSON, M., MULY, E. C., ÅKESSON, E., SAMUELSSON, E. B., BOGDANOVIC, N., BENEDIKZ, E., SUNDSTRÖM, E. Analysis of NR3A receptor subunits in human native NMDA receptors. *Brain Research*, Amsterdam, V. 1186, p. 102-112, p. 2007.

OLIVEIRA, B. M., MILJANICH, G. P., RAMACHANDRAN, J., ADAMS, M. E. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the α -conotoxins and α -agatoxins. *Annual Review of Biochemistry*, Palo Alto, V. 63, p. 823-867, 1994.

OLIVERA, B.M., CRUZ, L.J. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon*, New York, V. 39, p. 7-14, 2001.

OLNEY, J.W. Excitotoxicity: an overview. *Canada Diseases Weekly Report*, Ottawa, V. 16 (Suppl. 1E), p. 47-57, 1990.

PANEGYRES, P. K.. The contribution of the study of neurodegenerative disorders to the understanding of human memory. *The Quarterly journal of medicine*, Oxford, V. 97, p. 555-567, 2004.

PALMA, M. S., FUJITA, T., ITAGAKI, Y., NAOKI, H., NAKAJIMA, T. Mass spectromic structure determination of spider toxins arginine containing from the venoms of Brazilian Garden spider *Nephilengys cruentata*. *Natural Toxins*, New York, V. 5 (2), p. 47-57, 1997.

PALMA, M. S., ITAGAKI, Y., FUJITA, T., NAOKI, H., NAKAJIMA, T. Structural characterization of a new acylpolyaminotoxin from the brazilian spider *Nephilengys cruentata*. *Toxicon*. New York, V. 36 (3), p. 485-493, 1998.

PALMA, M. S., NAKAJIMA, T. A natural combinatorial chemistry strategy in acylpolyamine toxins from Nephilinae orb-web spiders. *Toxins Reviews*, New York, V. 24, p. 209-234, 2005.

PAXINOS, G., WATSON, C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. Third Edition. Academic Press, Sidney- Australia, 1998.

PEETERS, B. W. M. M., BROEKKAMP C. L. E. Involvement of corticosteroids in the processing of stressful life-events. A possible implication for the development of depression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford, V. 49(4-6), p. 417-427, 1994.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E., GORTER, J. A., BENNETT, M. V.L., ZUKIN, R. S. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends in Neurosciences*, Amsterdam, V. 20, p. 464-470, 1997.

PEZZONE, M. A., LEE, W. S. Induction of *c-Fos* immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. *Brain Research*, Amsterdam, V.597 (1), p. 41-50, 1992.

PIKKARAINEN M., RONKKO S., SAVANDER V., INSAUSTI R., PITKANEN A. Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *The Journal of Comparative Neurology*, Philadelphia, V. 403, p. 229-260, 1999.

PIN, J.P., DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, New York, V. 34, p. 1-26, 1995.

PIZZO, A. B., FONTANA, A. C. K., COUTINHO-NETTO, J., SANTOS, W. F. Effects of the crude venom of the social wasp *Agelaia vicina* on gamma-aminobutyric acid and glutamate uptake in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, Raleigh, V. 14, p. 88-94, 2000.

PIZZO, A. B., BELEBONI, R. O., FONTANA, A. C. K., RIBEIRO, A. M., MIRANDA, A., COUTINHO-NETO, J., SANTOS, W. F. Characterization of the actions of AvTx7 isolated from *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, Raleigh, V. 18 (2), p. 61-68, 2004.

PLATNICK, N. I. *Advances in Spider Taxonomy*. The New York Entomological Society, New York, 1988-1991, 1993.

PLATNICK, N. I. *The World Spider Catalog*. Version 9.5. American Museum of Natural History, New York, March 04, 2009. online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>

POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *The American Journal of Psychiatry*, Washington, V. 149(8), p. 999-1010, 1992.

QUISTAD, G.B., REUTER, C.C., SKINNER, W.S., DENNIS, P.A., SUWANRUMPHA, S., FU, E.W. Paralytic and insecticidal toxins from the funnel web spider, *Hololena curta*. *Toxicon*, New York, V. 29, p. 329–336, 1991.

RASH, L. D., HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms, *Toxicon*, New York, V. 40, p. 225-254, 2002.

ROBINSON, M. B., COYLE, J. T. Glutamate and release acidic excitatory neurotransmitters: from basic science to clinical application. *The FASEB Journal*, Bethesda, V. 1, p. 440-445, 1987.

ROOZENDAAL, B. Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of learning and memory*, San Diego, V. 78 (3), p.578-595, 2002.

ROSENMUND, C., STERN-BACH, Y., STEVENS, C. F. The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science*, Washington, V. 280, p. 1596-1599, 1998.

SAITO, M., KAWAI, N., MIWA, A., PAN-HOU, H., YOSHIOKA, M. Spider toxin (JSTX) blocks glutamate synapse in hippocampal pyramidal neurons. *Brain Research*, Amsterdam, V. 346, p. 397-399, 1985.

SAITO, M., SAHARA, Y., MIWA, A., SHIMAZAKI, K., NAKAJIMA, T., KAWAI, N. Effects of a spider toxin (JSTX) on hippocampal CA1 neurons in vitro. *Brain Research*. Amsterdam, V. 481 (1), p. 16-24. 1989.

SALAMONI, S. D., COSTA DA COSTA, J., PALMA, M. S., KONNO, K., NIHEI, K., TAVARES, A. A., DE ABREU, D. S., VENTURIN, G. T., DE BORBA-CUNHA, F., DE OLIVEIRA, R. M., BREDA, R. V. Antiepileptic effect of acylpolyaminetoxin JSTX-3 on rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *Brain Research*, Amsterdam, V. 1048 (1-2), p. 170-176, 2005a.

SALAMONI, S. D., COSTA DA COSTA, J., PALMA, M. S., AZAMBUJA, N. A. V., PAGLIOLI NETO, E., SILVA, V. D., TAVARES, A. A., ABREU, D. S., VENTURIN, G.

T., BREDÁ, R. V., KONNO, K., KENICHI, N. The antiepileptic activity of JSTX-3 is mediated by NMDA receptors in human hippocampal neurons. *Neuroreport*, Oxford, V. 16 (16), p. 1869-1873, 2005b.

SANDNER, G., OBERLING, P., SILVEIRA, M. C. L., DI SCALA, G., ROCHA, B., BAGRI, A., DEPOORTERE, R. What brain structures are active during the emotions? Effects of brain stimulation elicited aversion on *c-fos* immunoreactivity and behavior. *Behavioural Brain Research*, Amsterdam, V. 58, p. 9-18, 1993.

SANDOVAL, M. R. L., LEBRUN, I. Tstx toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom spontaneous recurrent seizures and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*, Amsterdam, V. 44 (7), p. 904-911, 2003.

SCHORGE, S., COLQUHOUN, D. Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *Journal of Neuroscience*, Baltimore, V. 23, p. 1151-1158, 2003.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*. London, V. 138, p. 32, 1936.

SHELIN, Y. 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: The role of stress and medical comorbidity. *Biological Psychiatry*, Amsterdam, V. 48, p. 791-800, 2000.

SHETH, A., BERRETA, S., LANGE, N., EICHENBAUM, H. The Amygdala Modulates Neuronal Activation in the Hippocampus in Response to Spatial Novelty. *Hippocampus*, New York, V. 18, p. 169-181, 2008.

STROMGAARD, K., ANDERSEN, K., KROGSGAARD-LARSEN, P., JAROSZEWSKI, W. Recent Advances in the medicinal chemistry of polyamine toxins. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, Amsterdam, V. 1, p. 217-338, 2001.

STROMGAARD, K., MELLOR, I. AMPA receptor ligands: synthetic and pharmacological studies of polyamines and polyamine toxins. *Medicinal Research Reviews*, New York, V. 24 (5), p.589-620, 2004.

STROMGAARD, K., JENSEN, L. S., VOGENSEN, S. B. Polyamine toxins: development of selective ligands for ionotropic receptors. *Toxicon*, New York, V. 45, p. 249-254, 2005.

SWANSON, L. W., LIND, R. W. Neural projections subserving the initiation of a specific motivated behavior in the rat: new projections from the subfornical organ. *Brain Research*, Amsterdam, V. 379, p. 399-403, 1986.

SWANSON, L. W. The hypothalamus. In: Bjorklund, A., Hokfelt, T., Swanson, L.W. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, V. 5. Elsevier, Amsterdam, p. 1-124, 1987.

TAKANO, K., OGURA, M., NAKAMURA, Y., YONEDA, Y. Neuronal and Glial Responses to Polyamines in the Ischemia Brain. *Current neurovascular research*, Amsterdam, V. 2 (3), p. 213-223, 2005.

TAMMINGA, C. A. Schizophrenia and glutamatergic transmission. *Critical Reviews in Neurobiology*, New York, V. 12(1-2), p. 21-36, 1998.

TARAZI, F., BALDESSARINI, R. J. Regional localization of dopamine and ionotropic glutamate receptor subtypes in striatolimbic brain regions. *Journal of Neuroscience Research*, New York, V. 55, p. 401-410, 1999.

USHERWOOD, P.N., BLAGBROUGH, I.S. Spider toxins affecting glutamate receptors: polyamines in therapeutic neurochemistry. *Pharmacology and Therapeutics*, Kansas City, V. 52, p. 245-268, 1991.

VAJDA, F.J. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *Journal Clinical Neuroscience*, Melbourne, V. 9, p. 4– 8, 2002.

YOKOTA, H., TSUBOKAWA, H., MIYAWAKI, T., KONNO, K., NAKAYAMA, H., MASUZAWA, T., KAWAI, N. Modulation of synaptic transmission in hippocampal CA1 neurons by a novel neurotoxin (beta-pompilidotoxin) derived from wasp venom. *Neuroscience Research*, Shannon, V. 41 (4), p. 365-371, 2001.

WANG, C. G., HE, X. L., SHAO, F., LIU, W., LING, M. H., WANG, D. C., CHI, C. W. Molecular Characterization of an anti-epilepsy peptide from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, V. 268, p. 2480-2485, 2001.

WEST, M. J., KAWAS, C. H., STEWART, W. F., RUDOW, G. L., TRONCOSO, J. C. Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, New York, V. 25, p. 1205-1212, 2004.

WILLNER, P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: Learned helplessness as a paradigm case. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, Oxford, V. 10, p. 677-690, 1986.

WILLNER, P. Animal models of depression: An overview. *Pharmacology & Therapeutics*, Oxford, V. 45, p. 425-455, 1990.

WILLNER, P., MITCHELL, P. J. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural Pharmacology*, Hagerstown, V. 13 (3), p. 169-188, 2002.