

LUCIANE DE SOUZA

**EFEITO ANSIOGÊNICO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE
VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* EM RATOS WISTAR**

Monografia apresentada à disciplina Estágio II
como requisito parcial à conclusão do Curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

orientadora: Prof^ª Dr^ª Claudia Maria Sallai

MONBIO
SOUZA, Luciane de

CURITIBA
2007

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Prof^a Dr^a Claudia Maria Sallai, por ter aceitado me orientar, pela paciência e por fazer parecer tão simples, mesmo quando tudo parecia perdido,

A Diego Carvalho, pela ajuda no projeto e em sua execução, tanto na parte experimental quanto na escrita,

Ao Biotério da UFPR, em especial ao Luis,

Ao Departamento de Fisiologia da UFPR, e também a Ruth e ao Cláudio, que se mostraram sempre muito prestativos,

Ao Instituto Butantan, pelo fornecimento do veneno,

A Fernanda Tiemi, pela amizade e por me ajudar nos dias em que ninguém mais podia ajudar, mesmo não suportando mais a idéia de ter que trabalhar com ratos,

Ao pessoal do laboratório, especialmente ao Fernando, que mesmo não estagiando mais lá me ajudou sempre que precisei,

A Dil, Fer e Mariah, por estarem sempre comigo, pelas boas risadas, pelo futebol “de menina” das sextas, pelos “dias de gorda”, por sermos realmente uma equipe. Por estarem presente principalmente nas horas de total desespero, e tentarem me mostrar que para tudo sempre tinha um jeito, uma maneira diferente de se fazer, que só bastava me acalmar e analisar melhor a situação. E a você Dil, por me ajudar muito nessa reta final e aceitar ser a minha “consultora na elaboração de frases”,

A Arlete, Ká e Pedro, por me “adotarem” e me ajudarem sempre que precisei.

Aos meus amigos e minha família, por fazerem parte de minha vida, por agüentarem muitas vezes meu mau-humor e minha ausência e por entenderem que logo, logo, tudo isso passaria. Talvez vocês não saibam, mas são realmente muito importantes para mim,

Aos meus pais, pela pessoa que sou hoje e por me ensinarem tudo que sei, mesmo que na maioria das vezes nada precisasse ser dito. Por me apoiarem sempre, mesmo não sabendo exatamente em que. Por me ensinarem que eu precisava pensar e agir por mim mesma, mas que estariam sempre por perto caso precisasse de um abraço ou simplesmente do seu silêncio. Enfim, agradeço por tudo!!

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iv
RESUMO	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISAO DA LITERATURA	3
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ESPÉCIE.....	3
2.2 QUADRO CLÍNICO DO ENVENENAMENTO.....	3
2.3 COMPONENTES DO VENENO.....	4
2.4 ANSIEDADE.....	6
2.5 MEMÓRIA NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 ANIMAIS.....	8
3.2 INOCULAÇÃO DO VENENO.....	8
3.3 CAMPO ABERTO.....	8
3.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).....	9
3.5 CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA.....	11
3.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	12
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1 ACHADOS COMPORTAMENTAIS.....	14
4.1.1 CAMPO ABERTO.....	14
4.1.2 CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA.....	15
4.1.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	16
5 CONCLUSÕES	19
REFERÊNCIAS	20

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - CAMPO ABERTO	9
FIGURA 2 - LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	10
FIGURA 3 - DIMENSÕES DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	11
FIGURA 4 - DIMENSÕES DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	11
FIGURA 5 - CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA	12
FIGURA 6 - EFEITOS DO VENENO DE <i>C. DURISSUS TERRIFICUS</i> SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS AVALIADOS NO CAMPO ABERTO SOB OS PARÂMETROS: AMBULAÇÃO (A), "GROOMING" (B) E BOLOS FECAIS (C)	15
FIGURA 7 - EFEITO DO VENENO SOBRE A ATIVIDADE MOTORA AVALIADA NA CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA	16
FIGURA 8- NÚMERO DE ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO DO LCE (A) E PERMANÊNCIA NESTES (B) EXPRESSA EM PORCENTAGEM DO TEMPO TOTAL	17
FIGURA 9- NÚMERO DE ENTRADAS NOS BRAÇOS FECHADOS DO LCE (A) E TEMPO DE PERMANÊNCIA NESTES (B) EXPRESSO EM PORCENTAGEM DO TEMPO TOTAL	18
FIGURA 10- TEMPO DE PERMANÊNCIA NO QUADRADO CENTRAL DO LCE	18

RESUMO

Foram avaliados os efeitos ansiogênicos da administração sistêmica de duas doses (90µg/100g e 120µg/100g de peso corporal) de veneno de *Crotalus durissus terrificus*, bem como os efeitos sobre as atividades locomotora e exploratória em ratos Wistar, machos com aproximadamente 90 dias de idade. Os animais dos diferentes grupos experimentais foram submetidos a diferentes testes comportamentais para a avaliação do efeito do veneno bruto. Os resultados demonstraram que o veneno possui ação ansiogênica e sobre a atividade motora e exploratória. O Campo Aberto foi utilizado para avaliação da atividade exploratória; o Labirinto em Cruz Elevado para avaliar os efeitos ansiogênicos, exploratórios, bem como os relacionados a memória e aprendizagem, e a Caixa de Movimentação Espontânea para avaliação da atividade motora dos animais. Os dados encontrados no Labirinto em Cruz Elevado também indicam um possível efeito amnésico do veneno, indicado pelas diferenças significativas entre os parâmetros durante a primeira e segunda exposição.

1 INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos representam um grave problema de saúde pública, principalmente em países tropicais. Há cerca de 3 mil espécies de serpentes no mundo, e destas, aproximadamente 10% são consideradas peçonhentas. A maioria os acidentes ocorridos no Brasil deve-se a serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Micrurus* e *Crotalus* (PINHO e BURDMANN, 2000).

A mortalidade dos acidentados varia nas diferentes regiões do mundo. Na Ásia, principalmente na Índia, Paquistão e Birmânia, ocorre em torno de 25 mil a 35 mil óbitos por ano, sendo uma das serpentes mais importantes a *Vipera russelli*. Na Nigéria, ocorrem 500 casos por 100 habitantes, com taxa de mortalidade de 10%. Nos Estados Unidos há uma mortalidade de 0,2%. Na África, ocorrem de 400 a 1000 mortes por ano causadas principalmente pelas serpentes do gênero *Cobra*, mais conhecida como *Naja* (FEITOSA, MELO e MONTEIRO, 1997).

No Brasil são registrados entre 19 mil a 22 mil de casos de acidentes ofídicos ao ano. De acordo com o Ministério da Saúde, a distribuição dos acidentes não ocorre de maneira uniforme e tem incidência maior em épocas de calor e chuva, que coincide com o período de maior atividade humana no campo, o que na maioria dos estados corresponde aos meses de janeiro a abril. Os indivíduos mais suscetíveis são do sexo masculino e têm entre 15 e 49 anos e os locais mais atingidos pelas picadas são pés e pernas (PINHO e PEREIRA, 2001). O reconhecimento dos períodos de maior risco, dado pela sazonalidade característica na ocorrência dos acidentes, tem importância não somente para preparar os serviços e os profissionais de saúde para o aumento da demanda de casos, mas também para estabelecer estratégias de distribuição e controle dos estoques de soros específicos nos locais de atendimento.

Do total de casos, aproximadamente 10% ocorrem com serpentes do gênero *Crotalus*, ficando atrás somente dos acidentes ocorridos com o gênero *Bothrops*. Entretanto, essa situação se inverte quando se trata da letalidade do envenenamento, sendo o acidente crotálico responsável por um número maior de óbitos (PINHO e PEREIRA, 2001; JORGE e RIBEIRO, 1992).

A grande morbimortalidade gerada pelo acidente crotálico deve-se ao fato de na maioria dos casos o quadro clínico evoluir rapidamente para uma insuficiência renal aguda. O efeito da peçonha afeta também músculos esqueléticos, sistema nervoso e componentes do sangue. (PINHO e BURDMANN , 2000).

O presente trabalho tem como objetivos observar o possível efeito central do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* em ratos Wistar machos, bem como os efeitos relacionados à atividade motora e exploratória. Observar também se ocorre ação amnésica da peçonha sobre os animais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ESPÉCIE

Crotalus durissus, serpente viperínea, família Viperidae, subfamília Crotalinae, popularmente conhecida no Brasil como cascavel, apresenta hábito terrestre, e tem como característica marcante a presença do chocalho ou guizo no extremo caudal. Possui características comuns às demais serpentes peçonhentas como, cabeça triangular, um par de fossetas loreais, olhos pequenos com pupilas em fenda, escamas na cabeça e presas inoculadoras de veneno (POUGH, HEISER e MACFARLAND, 1999).

O gênero *Crotalus* está representado no Brasil por apenas uma espécie: *C. durissus*, e distribuídas em cinco subespécies: *Crotalus durissus terrificus*, encontrada em regiões altas e secas da região sul oriental e meridional, ocorrendo desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais; *Crotalus durissus collilineatus*, distribuída em regiões secas do centro-oeste do Brasil (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e norte do estado de São Paulo); *Crotalus durissus cascavella*, encontrada em áreas de caatinga no Nordeste do Brasil, desde o Maranhão até Minas Gerais; *Crotalus durissus ruruima*, ocorrendo nos estados de Roraima, Amapá, Pará, Amazonas e Rondônia e *Crotalus durissus marajoensis*, observada na Ilha de Marajó (PINHO e BURDMANN, 2000).

2.2 QUADRO CLÍNICO DO ENVENENAMENTO

As manifestações presentes no local da picada vão desde um simples arranhão até uma marca puntiforme única ou dupla; a dor, quando presente, não é intensa. Pode ocorrer também mal-estar, prostração, sudorese, náuseas, vômitos, sonolência ou inquietação além de sensação de boca seca. A miotoxicidade do veneno é evidenciada por mialgia generalizada. Os sinais neurológicos presentes são: ptose palpebral, flacidez da face, alteração do diâmetro pupilar, oftalmoplegia e diplopia. A principal complicação do acidente crotálico é a insuficiência renal aguda, com necrose tubular.

(PINHO e PEREIRA, 2001; JORGE e RIBEIRO, 1992; AMARAL, MAGALHÃES e RESENDE, 1991).

2.3 COMPONENTES DO VENENO CROTÁLICO

A composição do veneno crotálico compreende enzimas, toxinas e peptídios. Dentre estes, são mais abundantes as fosfolipases, metaloproteases, hialuronidase e as neurotoxinas (NOGUEIRA e SAKATE, 2004).

O veneno tem efeito sobre os músculos esqueléticos, rins, fígado, sangue e sistema nervoso. Possuindo, basicamente, duas frações distintas: uma com ação miotóxica e a outra neurotóxica. Quanto à ação tóxica sobre o sistema nervoso, a crotoxina, crotamina, convulxina, giroxina são os componentes do veneno de maior relevância (LAGO et al., 2004).

A crotoxina é um composto essencialmente neurotóxico, formada por duas subunidades: uma composta por uma fosfolipase A₂ (PLA₂) denominada "crotoxina B", com ação pouco tóxica e outra subunidade conhecida como "crotoxina A", formada por um complexo chamado crotapotinfosfolipase. As duas subunidades componentes da crotoxina quando inoculadas simultaneamente produzem efeitos neurotóxicos (GATTAZ, 2000). Porém, segundo HENDON e FRANKEL-CONRAT (1971), a inoculação isolada da "crotoxina A" produz efeito reduzido e a inoculação da "crotoxina B" é inócua.

As PLA₂ são uns dos constituintes mais estudados do veneno, sendo responsáveis pelas atividades miotóxicas, inflamatórias, citotóxicas e neurotóxicas. Elas são enzimas do tipo II que clivam os fosfolipídios da membrana na posição *sn*-2 liberando ácidos graxos livres, principalmente o ácido araquidônico e lisofosfolipídios. O ácido araquidônico livre e as prostaglandinas resultantes desta liberação são importantes mediadores na transmissão e no processamento de sinais neuronais. A função desta enzima, na ação da peçonha crotálica, tem sido apoiada por diversos autores como sendo a de bloquear a neurotransmissão tanto pré como pós-sináptica (LAGO et al., 2004; MOREIRA et al., 1996; GATTAZ, 2000).

Segundo BENNETT e cols. (1994) níveis elevados de PLA₂ levam à excessiva hidrólise da membrana lipídica danificando muitas células e, sendo assim, alterações na atividade enzimática podem ser relevantes para o surgimento de patologias neuropsiquiátricas.

A crotamina, outro componente da peçonha de Cascavel, possui menor ação do que a crotoxina. Este polipeptídeo induz a despolarização da membrana muscular esquelética pelo aumento da permeabilidade à Na⁺, provocando estado de fibrilação com contrações curtas e relaxamento demorado. Tal componente, em pequenas doses, tem forte ação analgésica, comparada a ação da morfina (LAGO et al., 2004; NICASTRO et al. 2003; HUDELSON e HUDELSON, 1995).

A giroxina é uma glicoproteína ligada a uma substância tipo trombina com atividades de esterase. Quando injetada intravenosamente em ratos induz episódios de rotação do corpo do animal no eixo longitudinal. A enzima tipo trombina é responsável pela ação coagulante do veneno transformando diretamente fibrinogênio em fibrina.(SANO-MARTINS, 2001; THOMAZINI-SANTOS et al., 1998; ALEXANDER et al., 1988).

Por fim, a convulxina é responsável pelas convulsões e distúrbios respiratórios observados tanto em humanos como em outros animais de experimento. Em experimentos *in vitro*, este componente causou agregação plaquetária no plasma rico em plaquetas de muitas espécies de mamíferos (KINI, 2006; FAILI et al., 1994; PRADO-FRANCESCHI e BRAZIL, 1981).

Quanto aos achados comportamentais, MOREIRA e cols. (1997) realizaram testes de interação social e tarefas comportamentais relacionados à ansiedade em ratos inoculados com crotoxina. O experimento demonstrou diminuição da atividade exploratória dos animais no teste do campo aberto além de diminuir o tempo de atividade nos testes de interação social, demonstrando o efeito ansiogênico da toxina.

Experimentos histológicos de BANCHER, ROSA e FURLANETO (1973) demonstraram que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* fixa-se preferencialmente em tecido nervoso e hepático de ratos, porém BARRAVIERA e colaboradores (1996)

sugerem que o veneno bruto desta serpente não seja capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica.

2.4 ANSIEDADE

Em um ambiente novo os animais apresentam um comportamento de avaliação de risco potencial, e confirmando-se um perigo real passam a apresentar um comportamento de fuga ou luta contra o agressor, sendo que essas respostas comportamentais são acompanhadas geralmente de alterações neurovegetativas e hormonais (GRAEFF, 1999).

A ansiedade diferencia-se do medo pelas situações nas quais é desencadeada. Enquanto o medo observa-se em situações específicas e de perigo evidente, a ansiedade é desencadeada quando o perigo é apenas potencial, incerto, de origem supostamente inexistente ou desconhecida (GRAEFF, 1989).

Ocorre o favorecimento em desempenhos de atividades motoras e cognitivas, decorrentes da ansiedade e é necessário em muitas situações da vida, entretanto ela se torna patológica quando a resposta ao estímulo passa a ser exacerbada, interferindo no funcionamento normal do indivíduo (PRATT, 1992).

Diversos experimentos sugerem que a ansiedade não seria mediada por áreas isoladas do sistema nervoso central, mas sim por diferentes circuitos neurais. Esses circuitos estariam associados hierarquicamente. O estado de ansiedade seria mediado pela substância periaquedutal e lócus coeruleus, relacionadas a organização de respostas automáticas simples, já as respostas que envolveriam experiências anteriores, estariam relacionadas com o sistema amígdalar e septo-hipocampal, e o córtex para-límbico seria o responsável por controlar estímulos relevantes para o funcionamento cognitivo (STANDFORD, ARGYROPOULUS e NUTT, 2000).

Dentre os principais modelos animais utilizados para avaliar a ansiedade, o labirinto em cruz elevado (LCE), tem sido o mais utilizado desde sua introdução, há mais de duas décadas. Seu fundamento está relacionado com o medo incondicionado e comportamento espontâneo do animal, que está representado na aversão que os roedores apresentam pelos lugares abertos. Do ponto de vista etológico, estes animais

preferem lugares fechados, que poderiam representar lugares seguros (MONTGOMERY, 1955).

O LCE apresenta várias características que podem ser indutoras de medo nos braços abertos, como: altura, os espaços abertos, a novidade do ambiente (TREIT, MENARD e ROYAN, 1993).

2.5 MEMÓRIA NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O aprendizado é o processo pelo qual os humanos e outros animais adquirem conhecimento sobre o mundo. A memória é a retenção ou armazenamento desse conhecimento. (KANDEL, SCHWARTZ e JESSE, 1997).

A formação hipocampal está relacionada a processos cognitivos e de memória. Esta estrutura compreende o giro denteado, o hipocampo, o complexo subicular e a área entorrinal (SANTOS, 2001). Vários autores descrevem o envolvimento da formação hipocampal no controle de funções que possibilitam ao indivíduo explorar um ambiente, aprendendo e armazenando estas informações por períodos variados de tempo (SALLAI, 2005).

O uso do labirinto em cruz elevado como modelo animal demonstrou ser muito eficiente na avaliação de uma grande parte de fármacos ansiolíticos, nos estudos dos mecanismos cerebrais que modulam a ansiedade, e mais recentemente nos estudos sobre aprendizagem e memória (PELLOW e CHOPIN, 1985; RODGERS et al., 1996). O transcurso temporal da atividade no labirinto indica, entre outras coisas, processos de armazenamento e recuperação da informação, referentes ao repertório de comportamento exploratório do rato (RODRIGUEZ, 1999). Os ensaios utilizando labirinto em cruz elevado com ratos ocorrem na forma de teste-reteste, ou seja, os animais são submetidos ao teste de labirinto em cruz durante 5 minutos e após 5 minutos de descanso a sessão é repetida com o mesmo animal. A primeira exposição visa a aprendizagem das características do aparato.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 24 ratos Wistar, machos, provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná, mantidos em ciclo invertido de claro-escuro de 12-12 horas sem restrições alimentares e de água, com 90 dias de idade.

Foram formados três grupos experimentais com 8 animais cada, sendo: um controle (CTRL), um inoculado com 90µg/100g, de veneno e outro grupo inoculado com 120µg/100g de peso corporal.

3.2 INOCULAÇÃO DO VENENO

Os ratos foram inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, cedido pelo Instituto Butantan de São Paulo (IBU-SP) Para tal, o veneno foi veiculizado em PBS tamponado pH=7,4 injetado por via intra-peritoneal, nas doses: 120 µg/100g do animal (dose 1) (BARRAVIERA, 1995) e 90 µg/100g do animal (dose 2). As duas doses são inferiores a DL50 (BARRAVIERA, 1995) para o veneno de *Crotalus durissus terrificus* em ratos, não provocando sintomas aparentes, possibilitando assim a realização dos testes comportamentais com os animais.

Cinco dias após os procedimentos anteriormente citados, os animais foram submetidos aos testes comportamentais no Laboratório de Fisiologia do Sistema Nervoso do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná.

3.3 CAMPO ABERTO

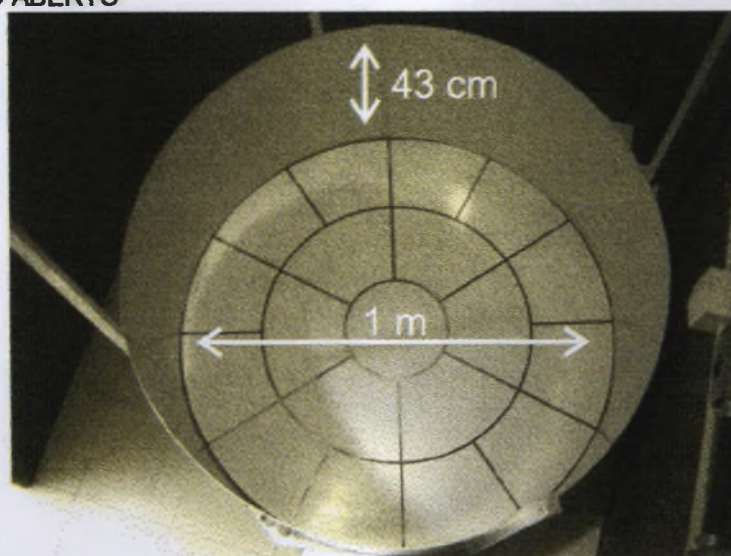
O campo aberto (Figura 1) é um aparelho que consiste em uma arena de madeira circular com 1 metro de diâmetro e 43 centímetros de altura, pintada de branco, com o chão dividido por linhas pretas em um círculo central e trapézios ao redor deste, somando um total de 19 unidades. O campo aberto foi construído baseado na descrição de HALL (1941).

Os animais foram colocados no círculo central do campo aberto e seu comportamento foi avaliado durante 5 minutos. Essa avaliação inclui quantificar os seguintes parâmetros: tempo gasto parado (*freezing*); tempo gasto com autolimpeza

(*grooming*); frequência de comportamento de elevar-se total ou parcialmente apoiando-se nas patas traseiras (*rearing*); número de setores percorridos pelo animal (ambulação); número de bolos fecais, presença/ausência de micção (XAVIER, 1999).

Cada animal foi avaliado individualmente, e ao final de cada sessão o aparelho foi limpo com solução de álcool 70%, para que os possíveis odores produzidos pelo animal exposto não interferissem no comportamento do próximo animal exposto ao equipamento.

FIGURA 1 - CAMPO ABERTO



3.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O LCE (Figura 2) é um dos modelos mais utilizados para avaliar a ansiedade e o comportamento exploratório de roedores. O equipamento foi construído conforme as especificações de PELLOW e CHOPIN (1985), sendo formado por quatro braços de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, sendo dois deles, opostos pelo centro, com paredes laterais de 40 cm denominados braços fechados e dois deles, também opostos pelo centro, com paredes de 1 cm de altura, denominados braços abertos (SALLAI, 2005). O aparelho é apoiado em suportes ficando a 50 cm do assoalho em sala isolada (Figuras 3 e 4). O experimento foi filmado pelo sistema de vídeo.

Cada animal foi colocado no centro do labirinto pelo experimentador, que imediatamente retirou-se da sala, acompanhando o comportamento do animal pelo

sistema de vídeo. O animal permaneceu no labirinto por 5 minutos para exposição prévia, visando a aprendizagem sobre as características do novo ambiente. Logo após foi colocado novamente na gaiola enquanto o aparelho foi limpo com álcool. Após 5 minutos de descanso, a sessão foi repetida com o mesmo animal.

As sessões experimentais foram analisadas através do programa X-Plo-Rat, versão 3.0 (CARDENAS, LAMPREA e MORATO, 2000), programa de computador usado para avaliar o comportamento de ratos e camundongos. Os parâmetros analisados foram o número de entradas nos braços fechados, que avaliam a atividade motora dos animais e número de entradas nos braços abertos, tempo de permanência neles e tempo de permanência nos braços fechados, que avaliam o nível de ansiedade do animal. Foi considerado como entrada ou saída apenas quando as quatro patas estavam em um dos braços (RODGERS e COLE, 1994).

FIGURA 2 – LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

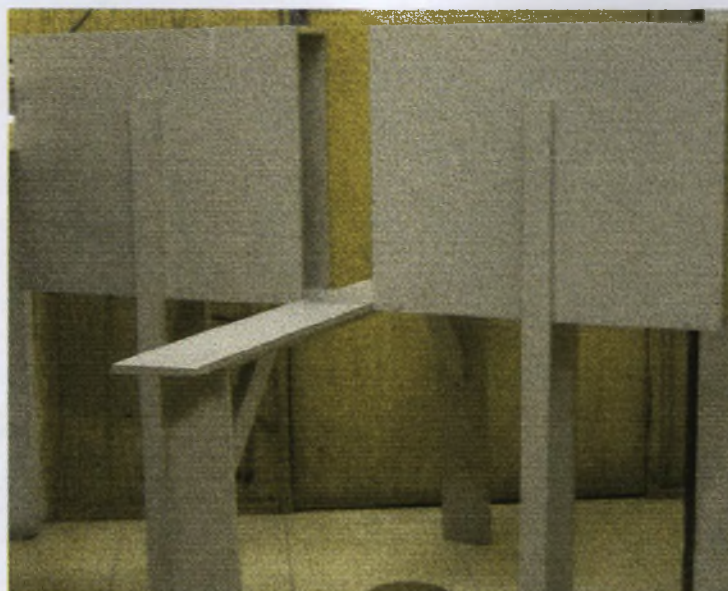


FIGURA 3 – DIMENSÕES DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

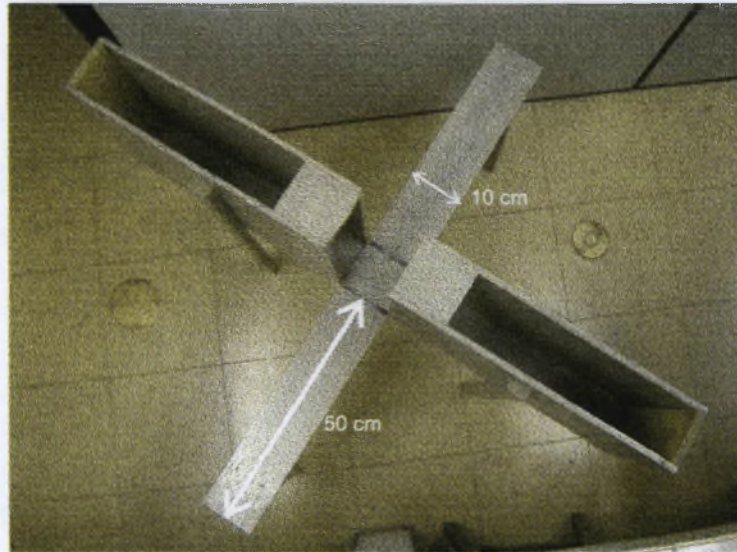
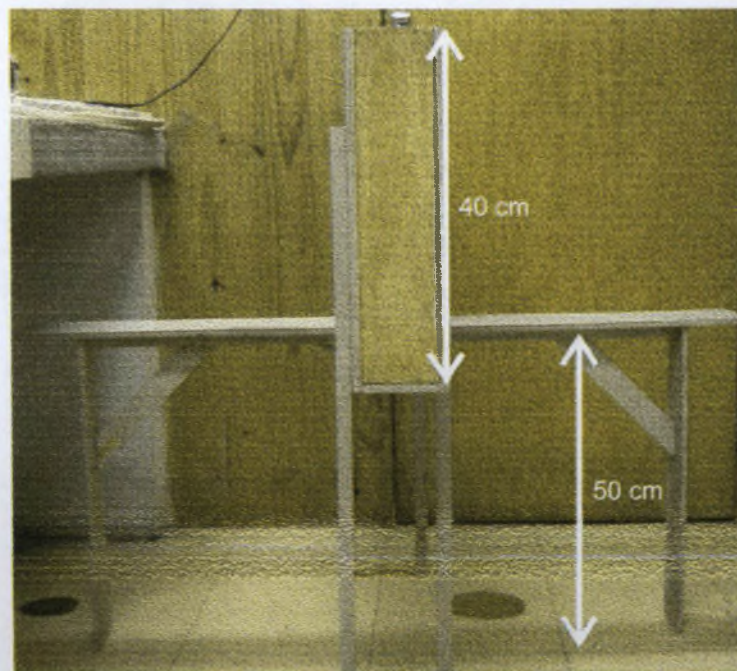


FIGURA 4 – DIMENSÕES DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



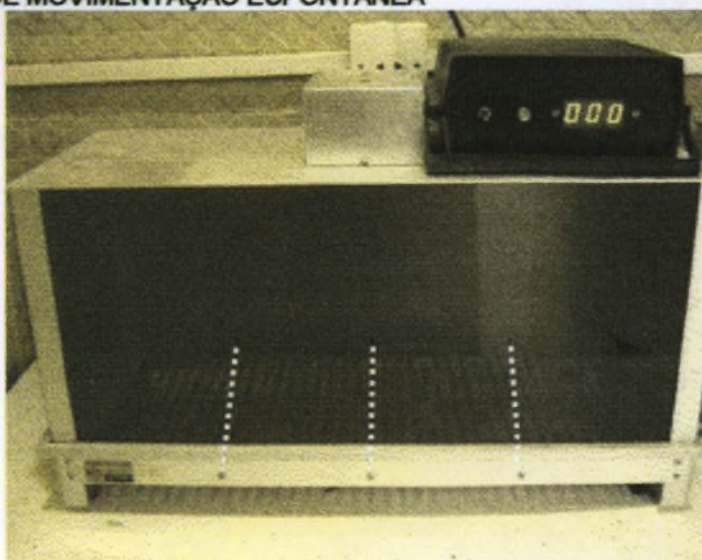
3.5 CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

A caixa de movimentação espontânea (Figura 5) tem por objetivo avaliar a taxa de atividade motora de roedores mensurada por meio do número de setores

imaginários percorridos pelo animal no interior do equipamento. Ela foi construída em aço e acrílico, medindo 60 X 20 X 30 cm conforme as especificações de SCHEIT (2004). O equipamento é formado por três paredes de aço escovado e a parede anterior em acrílico transparente escuro. O assoalho é formado por barras de aço de 0,5 cm de diâmetro separadas entre si por 1 cm. O teto foi construído em aço com tampa removível (SCHEIT, 2004).

Cada animal foi colocado na caixa por 5 minutos e o aparelho limpo com álcool no intervalo entre um teste e outro. O parâmetro analisado foi o número de cruzamentos entre as três linhas imaginárias que dividem o interior da caixa em três setores.

FIGURA 5 – CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA



3.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados referentes aos testes comportamentais foram analisados utilizando o pacote estatístico STATISTICA 5.0.

Os dados foram comparados entre as dosagens do veneno (90 μ g/100g e 120 μ g/100g) e os indivíduos controles (fator "grupo"), e quando aplicou-se no LCE utilizou-se o fator entre exposições (teste/reteste). Os resultados obtidos foram avaliados por meio da Análise de Variância para Medidas Repetidas (ANOVA).

A ANOVA para medidas repetidas foi adotada por testar a hipótese acerca dos efeitos "intra-sujeito", ou seja, as informações que cada animal carrega consigo ao longo dos experimentos. O grupo designa diferenças nos tratamentos entre os animais e por isso foi identificado como efeito entre-sujeitos, ou efeito de "grupo".

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Achados Comportamentais

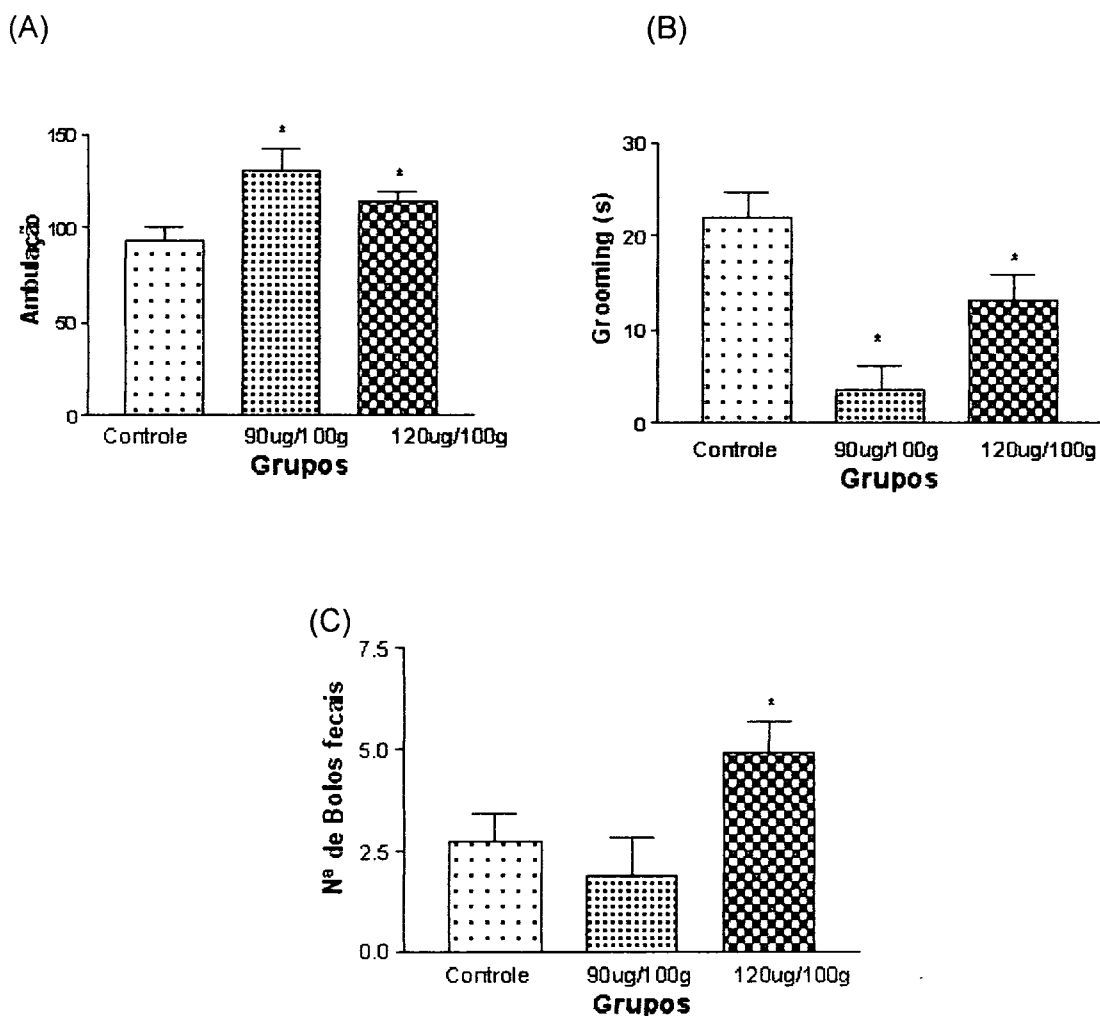
4.1.1 CAMPO ABERTO

No teste do Campo Aberto, a ANOVA revelou diferenças significativas entre os animais tratados e o grupo controle nos parâmetros: ambulação ($F(2,21)=5,25$; $p<0,0142$), "grooming" ($F(2,21)=12,99$; $p<0,0002$), como indicado nas Figuras 6-A, 6-B e 6-C. Em contrapartida, as médias de "Freezing" ($F(2,21)=3,01$; $p<0,0707$) e número de micções ($F(2,21)=1,28$; $p<0,2984$) não demonstraram diferenças significativas entre os grupos.

A alteração da atividade exploratória observada nos grupos-teste, caracterizada pelo aumento no número de setores percorridos pelos animais, indica uma possível ação central do veneno de *Crotalus*, e a diminuição do comportamento de autolimpeza (grooming) pode caracterizar o efeito ansiogênico do veneno.

Quando avaliamos o número médio de bolos fecais, observamos diferenças significativas entre os animais tratados com a maior dose de veneno ($F(2,21)=3,47$; $p<0,0460$), porém os dados obtidos no LCE também indicam uma tendência para o efeito ansiogênico na menor dose.

FIGURA 6 - EFEITOS DO VENENO DE *C. DURISSUS TERRIFICUS* SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS AVALIADOS NO CAMPO ABERTO SOB OS PARÂMETROS: AMBULAÇÃO (A), "GROOMING" (B) E BOLOS FECAIS (C).

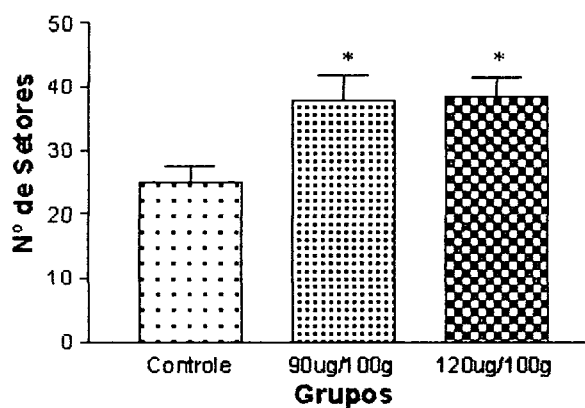


4.1.2 CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Em concordância com a avaliação da ambulação no teste do Campo aberto, o número de setores imaginários percorridos no teste da caixa de movimentação espontânea apontou diferença estatística ($F(2,21)=5,22$; $p<0,0145$) entre os grupos tratados e o controle (Figura 7).

De acordo com CARVALHO e cols (não publicado), o aumento da taxa de atividade locomotora demonstra um possível efeito ansiogênico do veneno.

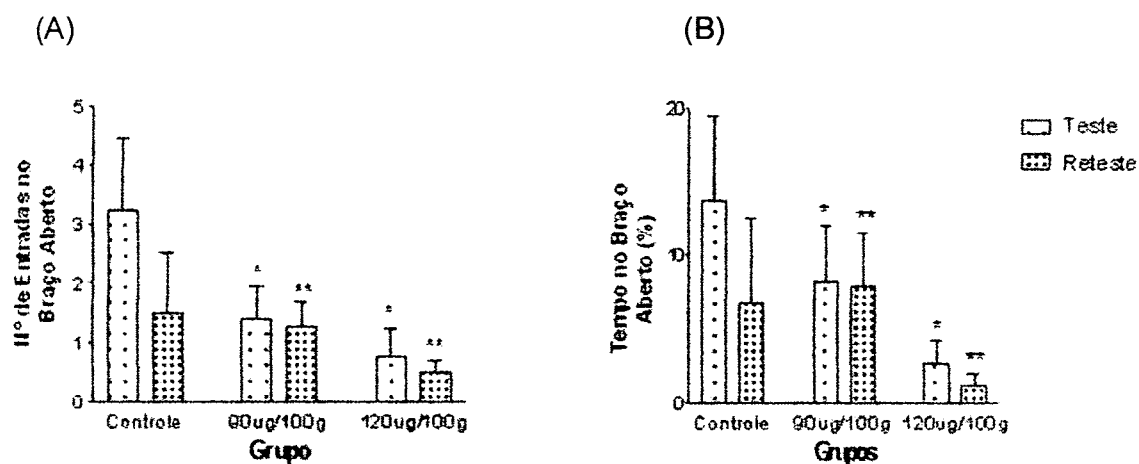
FIGURA 7 - EFEITO DO VENENO SOBRE A ATIVIDADE MOTORA AVALIADA NA CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA.



4.1.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O teste do LCE apontou diferença significativa no fator "grupo" na média das frequências de entradas nos braços abertos do aparato ($F(2,21)=1,80$; $p<0,0196$) (Figura 8-A). Tal diferença sugere que o veneno de *Crotalus*, tanto em concentração 90µg/100g quanto em concentração 120µg/100g induz aumento nos níveis de ansiedade dos ratos inoculados. A ANOVA também apontou diferença significativa, entre grupos, no tempo de permanência do animal nos braços abertos do LCE ($F(2,21)=1,34$; $p<0,0283$) (Fig 8-B). Com relação à atividade motora, há diminuição evidente do comportamento exploratório dos animais nos braços abertos. Este efeito reforça a atividade ansiogênica do veneno. Segundo PELLOW e CHOPIN (1985), fármacos com efeito ansiogênico induzem diminuição no número de entradas nos braços abertos e do tempo que os animais permanecem nos mesmos. Somente no grupo controle a diferença entre exposições foi significativa ($F(1,21)= 8,07$; $p<0,0329$).

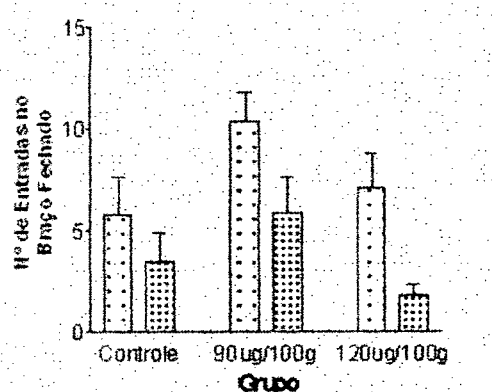
FIGURA 8 - NÚMERO DE ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO DO LCE (A) E PERMANÊNCIA NESTES (B) EXPRESSA EM PORCENTAGEM DO TEMPO TOTAL.



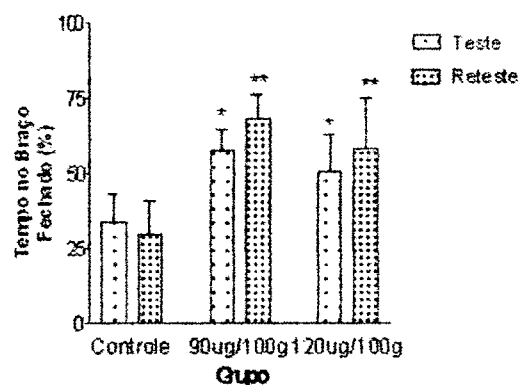
A análise estatística não revelou diferenças ($F(2,21)=2,60$; $p<0,0978$) entre as médias de entradas no braço fechado do LCE no fator "grupo"; porém, houve diferença significativa no fator "exposição" ($F(1,21)=21,25$; $p<0,0002$) neste mesmo quesito, como indicado na figura 9-A. O tempo de permanência do animal nos braços fechados do aparelho apontou diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o controle ($F(2,21)=4,45$; $p<0,0244$) (Fig. 9-B), o que reforça a hipótese do efeito ansiogênico do veneno nestes grupos. Não houve diferenças entre as exposições em tal parâmetro ($F(1,21)=1,57$; $p<0,2242$). O fato de os animais dos grupos-teste terem permanecido mais tempo nos braços fechados (Figura 9-B) evidencia a ansiedade induzida pelo veneno. Já, os dados da Figura 9-A mostram que houve diferença no teste/reteste, o que reforça a ideia do efeito amnésico do veneno, visto que os animais tratados apresentaram um déficit de desempenho na segunda exposição ao aparelho.

FIGURA 9 - NÚMERO DE ENTRADAS NOS BRAÇOS FECHADOS DO LCE (A) E TEMPO DE PERMANÊNCIA NESTES (B) EXPRESSO EM PORCENTAGEM DO TEMPO TOTAL.

(A)

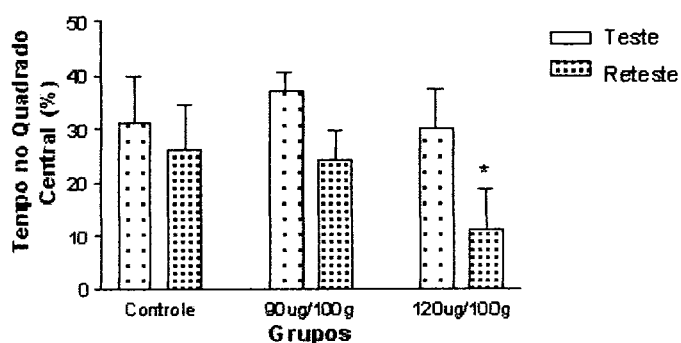


(B)



O tempo de permanência dos animais no quadrado central, que é a área entre os quatro braços do aparelho, não apresentou diferenças significativas entre os grupos ($F(2,21) = 1,98$; $p < 0,1635$). Por outro lado, o fator "exposição" demonstrou diferenças significativas, sobretudo no grupo $120\mu\text{g}/100\text{g}$ ($F(2,21) = 9,69$; $p < 0,0053$) (Fig. 10), indicando que os animais apresentaram um nível menor de indecisão quando comparados aos demais.

FIGURA 10- TEMPO DE PERMANÊNCIA NO QUADRADO CENTRAL DO LCE.



5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram um possível efeito ansiogênico do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em ratos Wistar. Mesmo quando administrados sistemicamente e, supostamente, os dados encontrados na literatura indicando que não ocorre a passagem pela barreira hematoencefálica, os nossos resultados indicam esta possível ação central. Como o veneno é formado por diferentes frações, provavelmente existe a passagem de uma ou mais. Podemos também concluir uma possível ação amnésica da peçonha sobre os animais.

É possível que o refinamento dos métodos empregados e as manipulações das frações isoladas do veneno revelem futuramente novas informações sobre os efeitos encontrados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER G.; GROTHUSEN J.; ZEPEDA H.; SCHWARTZMAN R.J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, Filadélfia, v.26, n.10, p.953-960, 1988.
- AMARAL. C.F.S.; MAGALHÃES, R.A.; RESENDE, N.A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.33, p.251-255, 1991.
- BANCHER, W.; ROSA, R.R.; FURLANETO, R.S. Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervosos, renal, hepático e muscular de *Mus musculus* Linnaeus, 1758. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 37, p. 139-148, 1973.
- BARRAVIERA, B. Liver dysfunction in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Botucatu (state of São Paulo) Brazil: experimental hepatic study in Wistar rats inoculated with *Crotalus durissus terrificus* (laurenti, 1768) venom. **J. Venom. Anim. Toxins.**, Botucatu, v. 1, n. 1, 1995.
- BARRAVIERA, B.; SARTORI, A.; SILVA, M. F. P. da; KANENO, R.; PERAÇOLI, M. T. S. Use of an ELISA assay to evaluate venom, antivenom, IgG and IgM human antibody levels in serum and cerebrospinal fluid from patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. v. 2, n. 1, p.14-27, 1996.
- BENNETT, C.F.; CHIANG,M.; LINGARDO, L.W.; WYATT,J.R. Sequence specific inhibition of human type II phospholipase A2 enzyme activity by phosphorothioate oligonucleotides. **Oxford Journals**, v.22, n.15, p.3202-3209, 1994.
- CARDENAS, F. P.; LAMPREA, M. R.; MORATO, S. X-Plo-Rat: freeware for animal recording, 2000.
- CARVALHO, D; SOUZA, L; SALLAI, C.M; TANHOFFER, E.A. Veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* induz prejuízos na tarefa do labirinto aquático de Morris e hiperatividade motora quando inoculado sistemicamente em ratos Wistar. 20p. 2007 (Não publicado).
- FAILI, A; RANDOM, J; FRANSISCHETTI, I.M; VARGAFITTING, B.B; HATMI, M. Convulxin-induced platelet aggregation is accompanied by a powerful activation of the phospholipase C pathway. **Biochem. J. V.** 298, p. 87-91, 1994.
- FEITOSA, R. F. G; MELO, I. M. L. A; MONTEIRO, H. S. A. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Estado do Ceará – Brasil. **Rev. Bras. Med. Trop.** V. 30, n. 4, p. 295-301, 1997.

GATTAZ, W. F. Neuroquímica da esquizofrenia: papel dos fosfolípidos. **Rev. Bras. Psiquiatria**, v.22, n.1, p.5-8, 2000.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: Graeff F. G., Brandão M. I. (Eds). **Neurobiologia das Doenças Mentais**. 5ª Ed., São Paulo: Lemos Editorial, pp144, 1999.

GRAEFF, F. G. **Drogas Psicotrópicas e seu modo de ação**. 2ª Ed. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária LTDA, 1989.

HALL, C. S. Temperament: A survey of animal studies. **Psychol. Bull.**, v. 38, p. 909-943, 1941.

HENDON, R.; FRANKEL-CONRAT, H. Biological Roles of the Two Components of Crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 7, p. 1560-1563, 1971.

HUDELSON, S.; HUDELSON, P. Pathophysiology of snake envenomization and evaluation of treatments-Part II. **Compendium of Continuing Education**, v.17, p.1035-40, 1995.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, vol. 34, n. 4, p. 347-354, julho-agosto, 1992.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSE, T. M. **Fundamentos da Neurociência e do Comportamento**. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil LTDA, 1997.

KINI, R. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem. J.** V. 397, n.3, p.377-387, 2006.

LAGO, L.A., MARQUES JUNIOR, A.P., MELO, M.M. *et al.*. Serological biochemical profile of bovines poisoned experimentally with free iodized crotalic poison and iodized incorporated in liposomes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n. 5, p.653-657, 2004.

MONTGOMERY, K.C. The Relation Between Fear Induced By Novel Stimulation And Exploratory Behavior. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**, 48: 254-260, 1955.

MOREIRA, E.G; NASCIMENTO, N; ROSA, G. J. M; ROGERO, J. R; VASSILIEF, V. F. Crotoxin-induced behavioral effects in rats. **Brazilian J. Of med. And bio. Research**. V.29, n. 05, p. 629-632, 1996.

MOREIRA, E.G; NASCIMENTO, N; ROSA, G. J. M; ROGERO, J. R; VASSILIEF, V. F. Effect of gamma irradiation on the behavioral properties of crotoxin. **Brazilian J. Of med. And bio. Research**. V.30, p. 245-249, 1997.

NICASTRO, G.; FRANZONI, L.; CHIARA, C.; MANCIN, A. C.; GIGLIO, J. R.; SPISNI A. Solution structure of crotamine, a Na⁺ channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. **European Journal of Biochemistry**, São Paulo, v.270 n.9, p.1969-1979, 2003.

NOGUEIRA, R. M. B.; SAKATE, M. Acidente crotálico em animais domésticos. **Revista CFMV**, v. 10, n. 31, 2004.

PELLOW, S. AND CHOPIN, P. Validation of Open: Closed Arm Entries in an Elevated Plus-Maze as a Measure of Anxiety in the Rat. **Journal of Neuroscience Methods** 14:149-167, 1985.

PINHO, F.M.O; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 47, n. 1, p.24-29, 2001.

PINHO, F. M. O. ; BURDMANN E. A . Insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, Artigo de atualização, v. 22, n. 3, p. 162-168, 2000.

POUGH, F. H.; HEISER J. B.; MACFARLAND, W. N. **A vida dos vertebrados**. 2ª edição. Editora Atheneu: São Paulo, 1999.

PRADO-FRANCESCHI J.; BRAZIL, O. V. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v.19, n.6, p.875-887, 1981.

PRATT, J. A. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacol. ther**, v. 55, n. 2, pp. 149-181, 1992.

RODGERS, R.J. AND COLE, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In : Cooper S.J. & Hendrie C.A. (Editors), *Ethology and Psychopharmacology*. Chichester: Wiley, p.9-44, 1994.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T.; COLE, J.C.; DEWAR, C.W.; KIDD, G.R. AND KIMPSON, P.H. Plus-maze retest prolife in mice: importance of initial stages of Trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockcade. **Pharmacol. Biochemistry Behavior**, 54: 41-50, 1996.

RODRIGUEZ, M. L. **Efeitos da lesão colinérgica específica no núcleo septal mediai do comportamento exploratório de ratos no labirinto em cruz elevado em um paradigma teste-reteste**. São Paulo, 1999. 79 p. Tese (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

SALLAI, C. M. **Amifostine minimiza a perda celular hipocampal e previne os efeitos amnésicos induzidos pela radiação ionizante neonatal em ratos.** São Paulo, 2005. 109p. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, departamento de fisiologia Universidade de São Paulo.

STANDFORD, J.J.; ARGYROPOULUS, S.V. AND NUTT, D.J. The Psychobiology of Anxiolytic Drugs Part 1 : Basic Neurobiology. **Pharmacology & Therapeutics** 88: 197-212, 2000.

SANO-MARTINS, I.S. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **Oxford Journals**, v.94, n.10, p.551-559, 2001.

SANTOS, A.M.G. **envolvimento do giro denteado e córtex entorrinal medial, mas não do córtex entorrinal lateral, com o processamento de informações de natureza espacial.** Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fisiologia. São Paulo, 2001.

SCHEIT, D.J.F. **Desenvolvimento de um modelo animal para dependência de etanol em camundongos: validação preditiva.** Curitiba, 2004. 129f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

THOMAZINI-SANTOS, I. A., GIANNINI, M. J. S. M., TOSCANO, E. *et al.*. The evaluation of clotting time in bovine thrombin, reptilase ® , and thrombin-like fraction of *crotalus durissus terrificus* venom using bovine, equine, ovine, bubaline and human cryoprecipitates. **J. Venom. Anim. Toxins**, v.4, n.2, p.120-136, 1998.

TREIT, D.; MENARD, J. AND ROYAN, C. Anxiogenic Stimuli in the Elevated Plus-Maze, **Pharmacology and Biochemistry Behavior**, 44: 463-469, 1993.

XAVIER, G. F. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso.** São Paulo: Plêiade, 1999.