



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

A INFUSÃO INTRAHIPOCAMPAL DA CROTAMINA ISOLADA DO VENENO DA
CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS PROMOVE A PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA E
ALTERA PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM RATOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Liane da Silva de Vargas

Uruguaiana, RS, Brasil.

2014

A INFUSÃO INTRAHIPOCAMPAL DA CROTAMINA ISOLADA DO VENENO DA
CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS PROMOVE A PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA E
ALTERA PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM RATOS

por

Liane da Silva de Vargas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof^ª Dr^ª Pâmela Billig Mello Carpes

Co-orientador: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

Uruguaiana, RS, Brasil.

2014

Universidade Federal do Pampa
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado:

**A INFUSÃO INTRAHIPOCAMPAL DA CROTAMINA ISOLADA DO VENENO DA
CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS PROMOVE A PERSISTÊNCIA DA
MEMÓRIA E ALTERA PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM RATOS**

Elaborada por
Liane da Silva de Vargas

como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Bioquímica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Pâmela Billig Mello Carpes (Presidente, orientador)

Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes (UFSM)

Prof. Dr. Vanusa Manfredini (UNIPAMPA)

Uruguaiiana, RS, Brasil

2014

DEDICO

À minha família e professores,
pelo incentivo e exemplo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha mestre e orientadora, Prof. Dr^a Pâmela Billig Mello Carpes, por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar e conviver com ela, pelos seus ensinamentos, por sua compreensão, apoio e confiança. Muito obrigada por tudo!

Ao professor Cháriston, pela co-orientação desse trabalho, pelo apoio, ensinamentos e presteza, mesmo à distância.

Aos meus pais, Celi e Vanderlei, por estarem sempre ao meu lado, apoiando minhas decisões, além de serem meu exemplo e o motivo pelo qual busco sempre melhorar.

Aos meus irmãos, Rafael e Liziane, pelo incentivo e apoio durante essa jornada.

Aos alunos de graduação Marcus, Rithiele e Ben-Hur, pelo apoio nos experimentos, companheirismo, cumplicidade e pela amizade construída.

À todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Fisiologia, os quais de alguma forma estiveram ao meu lado, não só como colegas de trabalho, mas também nas horas de lazer, tanto em dias alegres como em dias tristes.

À professora Vanusa Manfredini, bem como suas alunas, por conduzirem os experimentos de toxicidade.

À professora Daiana Àvila, bem como seus alunos, pela disponibilidade em todas as vezes que precisei de um auxílio.

Aos demais amigos e colegas que colaboraram de alguma forma no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal do Pampa por tornar possível o sonho da graduação e pós-graduação em uma universidade pública e de qualidade.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Por último, mas não menos importante, a Deus pelos dons da vida, e por ter me colocado no caminho de todas essas pessoas.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	09
Lista de Tabelas	10
Lista de abreviaturas	11
Resumo	12
Abstract	14
Apresentação	16

PARTE I

Introdução	17
1.1 Memória	17
1.2 Tipos de memória	17
1.3 Estruturas neurais envolvidas nos processos de memória	19
1.4 Os sistemas colinérgico e dopaminérgico e o hipocampo	21
1.5 Veneno crotálico	24
1.6 Crotamina	26
Objetivos	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29

PARTE II

The intrahippocampal infusion of crotamine isolated from the crotalus terrificus venom promotes memory persistence and alters biochemical parameters in rats	30
Abstract	32
1. Introduction	33
2. Materials and Methods	34
2.1 Animals	34

2.2 Surgery and Drug Infusion Procedures.....	35
2.3 Crotamine purification and treatment	36
2.4 Object recognition memory test	36
2.5 Aversive memory test	37
2.6 Open field, plus maze and tail flick	37
2.7 Biochemical, hematological, cardiac markers and oxidative parameters analysis ...	38
2.8 Statistical Analysis	39
3. Results	40
3.1 Object recognition (OR) memory test	40
3.2 Aversive memory test	41
3.3 Open field, plus maze and tail flick	42
3.4 Biochemical, hematological, cardiac markers and oxidative parameters analysis	43
4. Discussion.....	44
5. Conclusion	47
6. References	48

PARTE III

3.1 Discussão	50
3.2 Conclusões	55
3.3 Perspectivas	56
Referências	57

ANEXOS

Protocolo de aprovação pelo comitê de ética no uso de animais – CEUA

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 01: Principais áreas envolvidas na formação das memórias declarativas.

Figura 02: Esquema das principais estruturas do circuito hipocampal.

Figura 03: Vias colinérgicas encefálicas.

Figura 04: Vias dopaminérgicas encefálicas.

Figura 05: Ilustração do envolvimento integrado dos neurotransmissores dopamina e acetilcolina em uma sinapse.

Figura 06: *Crotalus durissus terrificus*.

Figura 07: Modelo tridimensional da crotamina.

PARTE II

Figura 01: Porcentagem do tempo total gasto para exploração dos diferentes objetos durante o treino e teste na tarefa de reconhecimento de objetos.

Figura 02: Latência de descida no treino e teste na tarefa de esquiva inibitória.

LISTA DE TABELAS

PARTE II

Tabela 01: Resultados dos testes comportamentais.

Tabela 02: Resultados da análise dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e marcadores cardíacos.

Tabela 03: Resultados da análise dos parâmetros de estresse oxidativo.

LISTA DE ABREVIATURAS

BHE – Barreira Hematoencefálica

Cdt – Crotalus Durissus Terrificus

CK - Creatina kinase

CK-MB - Creatina kinase e sua isoenzima

ENTO – Córtex Entorrinal

GD – Giro Denteado

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TGO - Transaminase Glutâmico Oxalacética

TGP - Transaminase glutâmico pirúvica

SNC – Sistema Nervoso Central

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa, RS, Brasil

A INFUSÃO INTRAHIPOCAMPAL DA CROTAMINA ISOLADA DO VENENO DA *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* PROMOVE A PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA E ALTERA PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM RATOS

Autor: Liane da Silva de Vargas

Orientador: Pâmela Billig Mello Carpes

Co-orientador: Cháriston André Dal Belo

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 27 de janeiro de 2014.

A crotamina, toxina isolada do veneno da *Crotalus Durissus Terrificus* (*Cdt*), é uma miotoxina polipeptídica, não enzimática, de caráter básico, que é composta por 42 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 4.880 daltons. Conhecida por induzir a despolarização da membrana muscular esquelética pelo aumento da permeabilidade ao íon sódio, estudos demonstraram que a toxina é capaz de promover a liberação de acetilcolina e dopamina no sistema nervoso central de ratos. Particularmente, estes neurotransmissores são importantes moduladores nos processos de formação da memória. Considerando a importância destes neurotransmissores nos processos mnemônicos, torna-se interessante estudar substâncias que possam atuar sobre eles, modulando assim os processos mnemônicos, muitas vezes prejudicados por disfunções cognitivas diversas do sistema nervoso central. Diante disso, este estudo investigou os efeitos da infusão intrahipocampal de crotamina na persistência da memória e nos parâmetros hematológicos e de estresse oxidativo em ratos. Foram utilizados 40 ratos Wistar machos de 3 meses de idade. Os experimentos foram realizados em duas etapas. Na etapa 1, posteriormente à implantação de cânulas hipocampais, a amostra foi dividida em dois grupos: controle e experimental. Ambos foram treinados nas tarefas de reconhecimento de objetos (RO) e esQUIVA INIBITÓRIA (EI) para verificar os efeitos da crotamina sobre a consolidação e persistência das memórias de reconhecimento e aversiva, na etapa 2 foram realizadas avaliações de parâmetros hematológicos e de estresse oxidativo. A infusão de crotamina (1µg/µL, 1µL/lado) induziu a persistência da memória de reconhecimento e aversiva, ambas testadas 24 horas, 7, 14 e 21 dias após o treino e infusão da toxina. No entanto, a toxina promoveu processo inflamatório e toxicidade demonstrada

pelas alterações nos parâmetros hematológicos e de estresse oxidativo.. Estes resultados demonstram uma notória possibilidade do uso da crotamina como instrumento farmacológico em doenças que envolvem comprometimento da persistência da memória, como as demências, no entanto, pesquisas adicionais são necessárias no intuito de buscar alternativas que minimizem os efeitos tóxicos da crotamina, viabilizando o seu uso.

Palavras-Chave: veneno de cascavel, parâmetros toxicológicos, memória de reconhecimento de objetos, memória aversiva.

ABSTRACT

Master Dissertation

Graduate Program in Biochemistry

Federal University of Pampa

THE INTRAHIPPOCAMPAL INFUSION OF CROTAMINE ISOLATED FROM THE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* VENOM PROMOTES MEMORY PERSISTENCE AND ALTERS BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RATS

Author: Liane da Silva de Vargas

Advisor: Pâmela Billig Mello Carpes

Co-advisor: Cháriston André Dal Belo

Place and Date of Defense: Uruguaiiana, January 27th, 2014.

The crotamine, a toxin isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) is a polypeptide myotoxin, nonenzymatic, with basic character, which is composed of 42 amino acid residues with a molecular weight of 4,880 daltons. Known to induce depolarization of skeletal muscle by increasing membrane permeability to sodium ions, studies have shown that this toxin is able to promote the release of acetylcholine and dopamine in the central nervous system of rats. Particularly, these neurotransmitters are important modulators in the process of memory formation. Considering the importance of these neurotransmitters in mnemonic processes, it becomes interesting to study substances who can act on them, thereby modulating the mnemonic processes often hampered by various cognitive dysfunctions of the central nervous system. Thus, this study investigated the effects of intrahippocampal infusion of crotamine in persistence of memory and in hematological and oxidative stress parameters in rats. 40 male Wistar rats 3 months aged were used. The experiments were performed in two stages. In step 1, after the implantation of hippocampal cannulae, the sample was divided into two groups: experimental and control. Both were trained in the object recognition (OR) and inhibitory avoidance (IA) task to verify the effects of crotamine on consolidation and persistence of recognition and aversive memories, in step 2 were performed the evaluations of hematological and oxidative stress parameters. The infusion of crotamine (1µg/µl, 1µl/lado) improved the persistence of recognition memory (object recognition task) and aversive memory (inhibitory avoidance task), both tested 24 hours, 7, 14 and 21 days after training and toxin infusion. However, the toxin promoted inflammation and toxicity as demonstrated by

serum changes in hematological and oxidative stress parameters. These results demonstrate a remarkable possibility of using crotamine as a pharmacological tool in diseases involving impairment of memory persistence, such as dementias, however, additional research is needed in order to seek alternatives that minimize the toxic effects of crotamine, enabling the its use.

Keywords: Snake venom; toxicological parameters; object recognition memory; inhibitory avoidance memory.

APRESENTAÇÃO

Os resultados que compõem essa dissertação são parte do projeto de pesquisa com título “*Efeitos da crotamina sobre a consolidação e persistência da memória aversiva*”, registrado junto à Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Pampa com protocolo de registro nº 10.007.13 e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa com parecer de aprovação nº 044-2012.

O capítulo da introdução apresenta uma breve revisão da literatura sobre a temática do estudo, bem como a identificação do problema de pesquisa, associado a sua importância. A parte II contempla os métodos empregados, resultados e discussão dos achados, seguidos pela conclusão com base nos resultados obtidos nos experimentos desenvolvidos, apresentados no formato de artigo original, o qual será submetido para apreciação no periódico *Toxicon* (Qualis B2 na área CB II). A parte III é integrada com os itens discussão, conclusões e perspectivas, os quais representam interpretações e comentários acerca dos resultados apresentados no artigo original supracitado.

Compõem as referências bibliográficas somente as citações pertencentes aos itens introdução, discussão e conclusão desta dissertação, uma vez que as referências do artigo científico estão inseridas na parte II.

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Memória

A memória pode ser definida como a capacidade de adquirir, formar, conservar e evocar informações, sendo considerada como um processo de armazenamento de informações, as quais provêm de experiências, podendo ser lembradas a qualquer instante (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE, 1992). Sendo assim, a memória é dividida em três fases: aquisição, quando a informação é adquirida, consolidação, quando a informação é armazenada e por fim a evocação, quando a informação é recuperada, ou seja, lembrada (IZQUIERDO, 2011).

Compreende-se memória como um conjunto de habilidades as quais são mediadas por diferentes sistemas anatômicos e funcionais do Sistema Nervoso Central (SNC), sistemas estes que funcionam independentemente, mas de forma cooperativa. É válido ressaltar que as emoções, o nível de alerta e o estado de ânimo são reguladores da aquisição, da formação e da evocação de memórias, por isso são importantes moduladores nestes processos (CAHILL & MCGAUGH, 1998; MCGAUGH 2004, 2005; IZQUIERDO, 2011;).

1.2 Tipos de Memória

Existem diferentes tipos de memórias, sendo elas classificadas de acordo com sua função, com o tempo de duração e/ou com o seu conteúdo, além de serem influenciadas pela relevância da informação adquirida (IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000).

De acordo com a duração, as memórias podem ser classificadas em três tipos: memória de trabalho, de curta e de longa duração (SQUIRE & ZOLA, 1996; IZQUIERDO & MCGAUGH 2000; SQUIRE & KANDEL, 2003).

A memória de trabalho depende apenas da atividade elétrica neuronal, é uma memória breve que permite o armazenamento temporário da informação, até que esta seja processada (CURTIS & D'ESPOSITO, 2003). A memória de curta duração permite a evocação de cada memória enquanto a sua forma definitiva ainda não esta consolidada, ela pode durar minutos ou poucas horas (IZQUIERDO & IZQUIERDO, 2004), tempo necessário para que as memórias de longa duração se consolidem. A formação de uma memória de longa duração envolve uma série de processos metabólicos no hipocampo e em outras regiões cerebrais (IZQUIERDO & MEDINA, 1997).

Uma vez consolidada, a memória de longa duração pode persistir por horas, dias ou anos (MCGAUGH, 2000), sendo que sua persistência irá depender de diferentes fatores, como a idade, o nível do estímulo emocional no momento da consolidação, entre outros (MEDINA et. al., 2008). A persistência da memória muitas vezes se encontra prejudicada em algumas demências, como no caso da doença de Alzheimer e também na doença de Parkinson. Em ambas as demências ocorrem alterações nos sistemas de neurotransmissores e, em consequência disso, a persistência de memórias já consolidadas fica comprometida (XU et al., 2012).

Em relação ao conteúdo as memórias podem ser divididas em declarativas (ou explícitas), não declarativas (implícitas ou de procedimentos) e operacionais. As memórias declarativas são aquelas que podemos facilmente relatar, declarar; e registram fatos, eventos ou conhecimentos e são classificadas de duas formas: episódicas ou semânticas. Enquanto as memórias episódicas referem-se a eventos específicos dos quais participamos ou assistimos, as memórias semânticas remetem a conhecimentos gerais (SQUIRE & KANDEL, 2003;

IZQUIERDO, 2011). As memórias não-declarativas correspondem àquelas memórias que não podem ser descritas por meio de palavras, enquanto que as memórias operacionais correspondem ao processamento contínuo das informações recém adquiridas e/ou recém evocadas, possibilitando o raciocínio e também o planejamento do comportamento (SQUIRE & ZOLA, 1996; SQUIRE & KANDEL, 2003).

1.3 Estruturas neurais envolvidas no processo de memória

São essenciais para a consolidação e evocação da memória declarativa a formação hipocampal (hipocampo, giro denteado, subículo e pré-subículo), o córtex parahipocampal e áreas conectadas ao hipocampo (amígdala, córtex entorrinal, córtex perirrinal, giro do cíngulo, área pré-frontal e córtex de associação parietal) (figura 01) (SQUIRE & KANDEL, 2003).

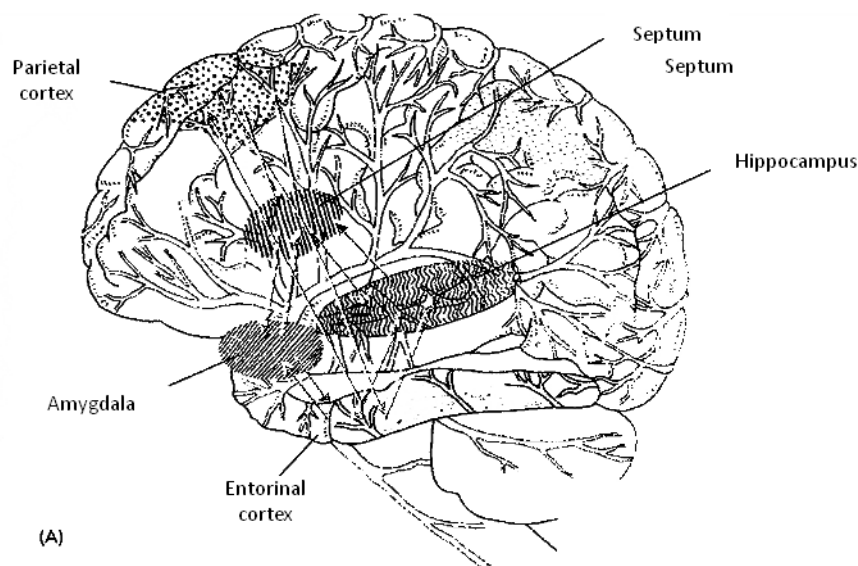


Figura 01. Principais áreas envolvidas na formação das memórias declarativas (cérebro humano). Gentilmente cedido por Izquierdo (2002).

Mesmo com participação de regiões corticais como a pré-frontal, a entorrinal e a parietal no processo, o hipocampo é a estrutura central para a formação de memórias declarativas (IZQUIERDO, 2011), apresentando conexões sinápticas diretas ou indiretas com praticamente todas as áreas supracitadas. Os principais componentes do hipocampo podem

ser observados simultaneamente em cortes horizontais (esquematizado na figura 02). Partindo da fissura rinal para a borda medial do córtex, encontram-se o córtex entorrinal, os campos CA1 e CA3 e o giro denteado (PAXINOS & WATSON, 1986). Várias das estruturas internas do hipocampo são capazes de evidenciar plasticidade, porém a região CA1, cuja abreviatura CA vem do latim *Cornu Ammonis* (Corno de Ammon), denominação utilizada antigamente para hipocampo, tem a função relacionada ao aprendizado e à memória melhor documentada.

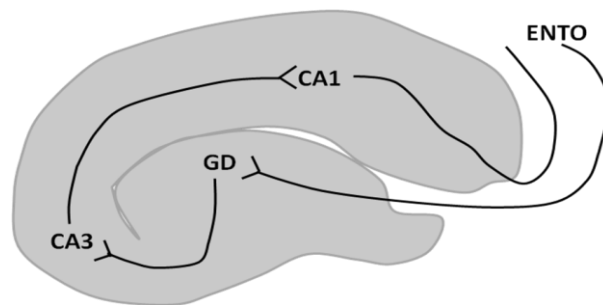


Figura 02. Esquema das principais estruturas do circuito hipocampal no cérebro de um rato. ENTO = córtex entorrinal. GD = Giro Denteado.

O córtex entorrinal é a grande via de entrada de informações no hipocampo, ele envia informações ao hipocampo mediante um feixe de axônios chamado via perforante. Estes axônios estabelecem sinapses em neurônios do giro denteado que, por sua vez, projetam axônios (chamados de fibras musgosas) estabelecendo sinapses em células de CA3, as quais projetam axônios ramificados (PAXINOS & WATSON, 1986). Um ramo deixa o hipocampo pelo fórnix, circundando o tálamo antes de terminar no hipotálamo, e o outro ramo, chamado colateral de Schaffer, forma sinapses excitatórias em neurônios da CA1 (LORENTE DE NÓ, 1934). A partir da região CA1 do hipocampo a informação neural é transmitida ao subículo, assim como outras áreas, constituindo uma saída da informação pré-processada no hipocampo (PAXINOS & WATSON, 1986).

1.4 Os Sistemas Colinérgico e Dopaminérgico e o Hipocampo

Como já se sabe, o hipocampo é uma área que desempenha um importante papel na aprendizagem e memória, especialmente para as memórias declarativas, sendo alvo de muitos estudos nesta temática (IZQUIERDO & MEDINA, 1995; CARRE & HARLEY, 2000; KIRBY & RAWLINS, 2003). As interações do hipocampo com outras estruturas cerebrais permitem a formação, a consolidação e a evocação deste tipo de memória (NADEL et al., 2000; KIM & BAXTER, 2001; REZAYOF et al., 2011).

Dentre os diversos sistemas de neurotransmissores que atuam no hipocampo, o sistema colinérgico hipocampal (figura 03) é um importante modulador para o desempenho da memória (LOPES et al, 2008; MUNERA et al., 2000). A acetilcolina é o neurotransmissor mais conhecido envolvido nos processos de aprendizagem, memória e atenção. Tanto seus receptores nicotínicos, como os muscarínicos participam da codificação de novas informações (ROBINSON et al., 2011; DORALP & LEUNG, 2008). Izquierdo e colaboradores, (1991; 1992), ao comparar o efeito de antagonistas e agonistas colinérgicos sobre a consolidação da memória em ratos, demonstraram que a inibição dos receptores colinérgicos hipocampais impede a consolidação da memória aversiva, uma memória declarativa, enquanto que os agonistas facilitam este processo (IZQUIERDO, et al., 1991; 1992). Recentemente, Partiff e colaboradores (2012) demonstraram que os receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos da região CA1 do hipocampo estão envolvidos também com a persistência da memória (PARTIFF et al., 2012).

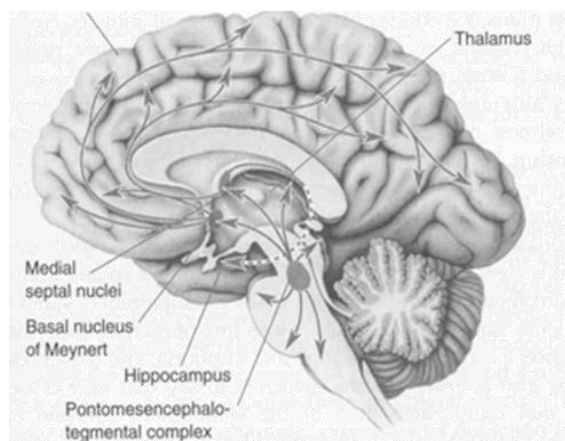


Figura 03. Vias colinérgicas encefálicas. Adaptado de Bear et al. (2008).

O sistema dopaminérgico (figura 04) também desempenha um papel crítico na modulação da atividade neuronal relacionada com as diferentes formas de aprendizagem e de memória (JAY, 2003), podendo alterar a capacidade de aprender e armazenar informações (ADRIANI et al. 1998). A dopamina é considerada o neurotransmissor mais influente na modulação da atividade mnemônica relacionada à tarefa de esquiva inibitória em ratos (MYHRER, 2003). Lecourtier e colaboradores (2008) afirmam que a disponibilidade prolongada deste neurotransmissor em áreas como o córtex pré-frontal e *nucleus accumbens* é fundamental para a manutenção dos estados de motivação, aprendizagem associativa e memória de trabalho (LECOURTIER et al., 2008).

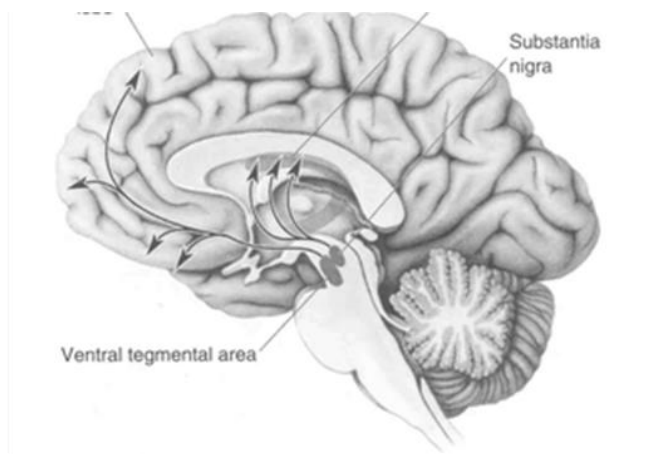


Figura 04. Vias dopaminérgicas encefálicas. Adaptado de Bear et al. (2008).

Foi demonstrado por Memo e colaboradores (1988) que a administração de antagonistas dopaminérgicos, como a escopolamina, promove amnésia após a tarefa na esQUIVA inibitória em ratos (MEMO et al., 1998). Também a modulação da evocação da memória envolve, entre outras, as fibras dopaminérgicas, sendo a evocação melhorada pela ativação dos receptores D1 (IZQUIERDO, 2011). Recentemente, a dopamina teve também destacado seu importante papel na persistência da memória. Rossato e colaboradores (2009) verificaram que a memória aversiva de longa duração desapareceu rapidamente quando o antagonista dos receptores D1, SCH 23390, foi injetado no hipocampo dorsal de ratos horas depois da experiência com medo. Por outro lado, a aplicação intrahipocampal do agonista D1, SK38393, ao mesmo tempo pós-treinamento tornou a memória persistente (ROSSATO et al., 2009).

O efeito conjunto destes dois sistemas, colinérgico e dopaminérgico, no funcionamento cognitivo de roedores está bem documentado. Estudos comportamentais demonstram que a dopamina pode promover a consolidação da memória no sistema hipocampal através da facilitação da função colinérgica (HERSI, 1995; LEVIN & ROSE, 1991) (figura 05). Considerando a importância destes neurotransmissores nos processos

mnemônicos, torna-se importante estudar substâncias que possam atuar sobre eles, modulando assim estes processos, muitas vezes prejudicados em disfunções cognitivas diversas do SNC.

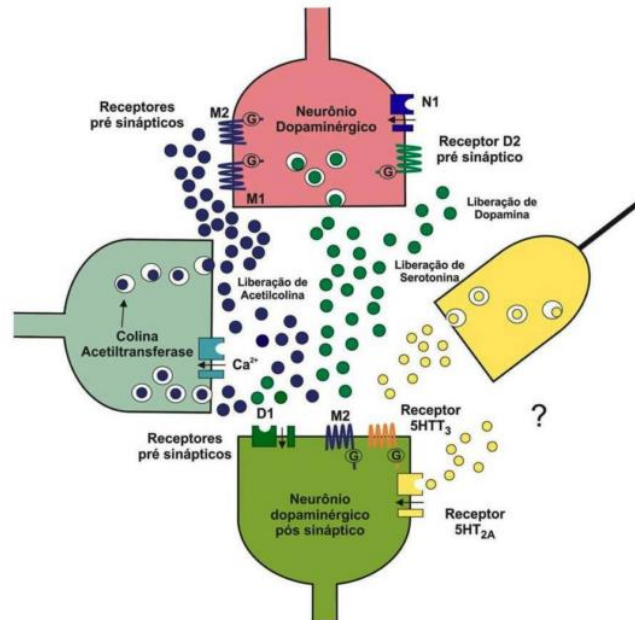


Figura 05. Ilustração do envolvimento integrado dos neurotransmissores dopamina e acetilcolina em uma sinapse. STÜRMER (2012) adaptado de DATY (2012).

1.5 Veneno crotálico

O veneno da serpente sul-americana *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) (figura 06) é um complexo concentrado composto por proteínas biologicamente ativas que, conjuntamente, causam a morte ou lesões graves na presa ou indivíduo por ela picado (DAL PAI & NETO, 1994). Sua peçonha extremamente ativa é neurotóxica, determinando sempre um quadro grave à vítima.



Figura 06. *Crotalus durissus terrificus*. FONTE: (Fotografia Giuseppe Puerto).

O veneno crotálico é responsável por exercer três atividades com importância clínica conhecida, a atividade neurotóxica, com ação central e periférica, cujo efeito causa paralisia flácida das musculaturas esquelética e facial, paralisia do globo ocular e às vezes, paralisia dos músculos respiratórios, o que pode levar à insuficiência respiratória (VITAL BRAZIL, 1972; AMARAL et al, 1991; JORGE & RIBEIRO, 1990), atividade coagulante, devido ao conjunto de fibrinogênio e incoagulabilidade sanguínea (AMARAL et al., 1988), e atividade miotóxica sistêmica, responsável por lesionar fibras musculares esqueléticas, as quais são evidenciadas por dores musculares ou rbdomiolise generalizadas, podendo ocasionar, como complicação secundária, insuficiência renal aguda (AMARAL et al., 1986; AZEVEDO MARQUES, et al., 1987), além da atividade hemolítica *in vitro* (ROSENFELD et al., 1960-62; KELEN et al., 1960-62).

Quando fracionado em cromatografia de exclusão molecular, o veneno da Cdt apresenta quatro frações principais: a crotoxina, crotamina, giroxina e convulxina (VITAL BRAZIL, 1972; OKAMOTO et al., 1983; PUIG et al, 1995; ROODET et al., 1996), sendo estas as responsáveis pelas ações neurotóxica, miotóxica e coagulante do veneno (NOGUEIRA E SAKATE, 2004; AZEVEDO-MARQUES et al., 2009).

1.6 Crotamina

A Crotamina é um dos componentes do veneno bruto da cascavel sul-americana e foi isolada pela primeira vez há mais de 50 anos, do veneno da Cdt argentina, por Gonçalves e Polson (1947) e posteriormente, foi designada crotamina quando Gonçalves e Vieira (1950) a isolaram do veneno da cascavel brasileira da região central e sul. Ambos os autores demonstraram que esta toxina é capaz de induzir espasmos musculares em camundongos e estes achados foram posteriormente convalidados (BARRIO E VITAL BRAZIL, 1951; CHEYMOL et al., 1969; CHEYMNOL et al., 1971a; CHEYMOL et al., 1971b).

A estrutura primária da crotamina foi purificada e determinada em 1975 por Laure (LAURE, 1975). Trata-se de uma miotoxina polipeptídica, não enzimática, de caráter básico, que é composta por 42 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 4.880 daltons (MANCIN et al, 1998). A presença de nove resíduos de lisina e três pontes dissulfeto confere a crotamina compatibilidade elevada, estabilidade, carga positiva líquida, apresentando uma estrutura similar com defensina, um peptídeo antimicrobiano do epitélio humano (NICASTRO et al., 2003) . A crotamina é estruturalmente estabilizada por seis cisteínas envolvidas em três pontes dissulfetos nas posições, Cys4-Cys36, Cys11 Cys30 e Cys18-Cys37 (figura 07) (LAURE, 1975; NICASTRO et al., 2003; FADEL et al., 2005).

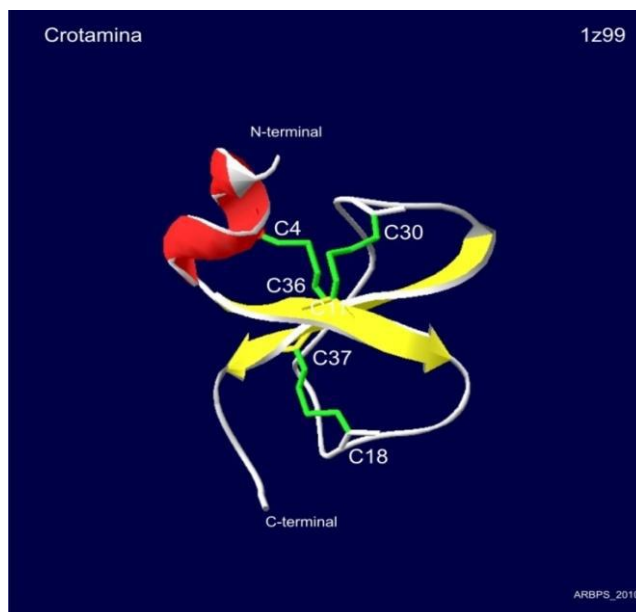


Figura 07. Modelo tridimensional da crotamina: em branco a estrutura secundária do esqueleto dos carbonos alfa da cadeia polipeptídica da crotamina baseada no modelo de ressonância nuclear magnética da estrutura da crotamina (PDB # 1z99). Em vermelho é representada a alfa hélice e em amarelo as folhas beta-pregueadas. Em verde são mostradas as pontes dissulfeto entre as cisteínas indicadas de acordo com a posição ocupada na cadeia: C4-C36; C30-C11 e C37-C18. O amino e o carboxi terminal estão indicados (FONTE: Pereira, 2011).

As serpentes *Crotalus durissus terrificus* podem ou não apresentar na peçonha a fração crotamina, assim, quanto à presença de crotamina, o veneno de Cdt pode ser crotamina positivo e crotamina negativo. As serpentes que possuem venenos crotamina positivo encontram-se ao oeste do Estado de São Paulo e os crotamina-negativo, ao leste do estado (SCHENBERG, 1959).

Referente aos acidentes crotálicos, a crotamina parece ter grande influência na imobilização da presa a ser ingerida pela serpente. Alguns estudos realizados com venenos de serpentes Cdt mostraram que, imediatamente após a picada, o camundongo atingido fica totalmente imobilizado, impedindo, dessa forma, a sua fuga. Resultados semelhantes foram

observados para *Crotalus viridis concolor*, *Crotalus viridis viridis* e *Crotalus viridis helieri*, que expressam proteínas homólogas à crotamina (OWNBY et al., 1988).

A crotamina é conhecida por induzir a despolarização da membrana muscular esquelética pelo aumento da permeabilidade ao íon sódio (Na^+), sugerindo que a mesma se liga a canais de Na^+ voltagem-dependente no sarcolema (RUFF & LENNON, 1998). No entanto, já existem estudos opostos, que sugerem que os canais de sódio não são o principal alvo da crotamina ou que os mesmos não estão envolvidos na sua ação (RIZZI et al., 2007). Esta contradição sobre o mecanismo molecular de ação farmacológica da crotamina continua sendo uma questão em aberto.

Alguns estudos nas últimas décadas têm sido realizados na tentativa de avaliar os efeitos da crotamina no SNC. Camillo e colaboradores (2001) estudaram o efeito da crotamina, assim como a crotoxina, ambas componentes do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*, e verificaram que as toxinas estudadas produziram um claro aumento na liberação basal de acetilcolina e dopamina no estriado de ratos e camundongos. Assim, visto que existem poucos estudos relacionados aos efeitos da crotamina no SNC e nenhum que envolva o seu efeito especificamente na memória e, considerando a importância de ambos neurotransmissores, dopamina e acetilcolina, nos processos mnemônicos, torna-se importante estudar substâncias que possam atuar sobre eles, modulando assim estes processos, muitas vezes prejudicados em disfunções cognitivas diversas do (SNC. Nesse sentido, o presente estudo investigou o efeito da administração intrahipocampal da crotamina sobre a consolidação e persistência da memória em roedores.

Durante o desenvolvimento deste estudo, todos os experimentos foram conduzidos em concordância com os “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication nº 80-23, revisada em 1996), tendo todos sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais

(CEUA) da Universidade Federal do Pampa, com protocolo de aprovação número 044/2012 (ANEXO I).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar os efeitos da crotamina na persistência da memória e parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo em ratos

2.2 Objetivos específicos

Dentre os objetivos específicos deste estudo estão:

Verificar os efeitos da crotamina na consolidação da memória de reconhecimento e memória aversiva em ratos;

Verificar os efeitos da crotamina na persistência da memória de reconhecimento e memória aversiva em ratos;

Verificar o efeito sistêmico da crotamina sobre parâmetros hematológicos, bioquímicos e marcadores cardíacos, aguda e cronicamente;

Verificar o efeito da crotamina sobre parâmetros de estresse oxidativo em plasma e encéfalo, aguda e cronicamente.

PARTE II

CAPÍTULO I

Artigo para submissão

Toxicon

THE INTRAHIPPOCAMPAL INFUSION OF CROTAMINE ISOLATED FROM THE CROTALUS TERRIFICUS VENOM PROMOTES MEMORY PERSISTENCE AND ALTERS BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RATS.

Liane S Vargas¹, Marcus Vinícius S Lara¹, Rithiele Gonçalves¹, Vanusa Mandredini¹, Luis Ponce Soto², Sergio Marangoni², Cháriston A Dal-Belo³ & Pâmela B Mello-Carpes¹

¹ Grupo de Pesquisa em Fisiologia. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Universidade Federal do Pampa. Campus Uruguaiana. Uruguaiana/RS/Brazil

² Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP/Brazil.

³ Universidade Federal do Pampa. Campus São Gabriel. São Gabriel/RS/Brazil.

*corresponding author

Pâmela B Mello-Carpes, PhD.

BR 472, km 592, Zip code 97500-970. Po box 118.

Uruguaiana/RS/Brazil.

Phone: +55(55)96612454

Email: panmello@hotmail.com; pamelacarpes@unipampa.edu.br

HIGHLIGHTS

1. The intrahippocampal infusion of crotamine promotes object recognition memory persistence.
2. The intrahippocampal infusion of crotamine promotes inhibitory avoidance memory persistence.
3. Intrahippocampal crotamine infusion causes significant changes on biochemical and hematological parameters.
4. Intrahippocampal crotamine infusion causes significant changes on plasma and brain oxidative parameters.

ABSTRACT

According to previous research, crotamine, a toxin isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), promotes the release of acetylcholine and dopamine in the central nervous system of rats (CNS). Particularly, these neurotransmitters are important modulators of memory processes. In this study we investigated the effects of crotamine infusion on persistence of memory in rats. We verified that the intrahippocampal infusion of crotamine (1 µg/µl; 1µl/side) improved the persistence of object recognition and aversive memory. Still, the intrahippocampal infusion of the toxin promoted inflammation and toxicity, when analyzed biochemical, hematologic and cardiac markers in plasma and oxidative stress in plasma and brain. These results demonstrate a marked possibility of using crotamine as potent pharmacological tool for diseases involving memory impairment, although it is still necessary to find alternatives that will enable its use, decreasing the toxicity.

Keywords: Snake venom; toxicity; object recognition memory; inhibitory avoidance memory.

1. Introduction

The crotoamine is one of the components of the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Cdt). Crotoamine is a non-enzymatic polypeptide myotoxin, composed by 42 amino acid residues with a molecular weight of 4,880 daltons ([Mancin, Soares et al. 1998](#)). It is known that this toxin induce depolarization of skeletal muscle membrane by increase the permeability to sodium ion (Na^+), suggesting that it binds to voltage-dependent Na^+ channels in the sarcolemma ([Ruff and Lennon 1998](#)). However, there are already opposing studies, suggesting that sodium channels are not the main target of crotoamine or that they are not involved in its action ([Rizzi, Carvalho-de-Souza et al. 2007](#)). This contradiction about the molecular mechanism of pharmacological action of crotoamine remains an open question.

Some studies in last decades have been performed to evaluate the effects of crotoamine in the Central Nervous System (CNS) ([Mello and Cavalheiro 1989](#));([Habermann and Cheng-Raude 1975](#)). Camillo et al. (2001) studied the effect of crotoamine, as the crotoxin, both components of the venom of Cdt, and found that the studied toxins produced a clear increase in basal release of acetylcholine and dopamine in the striatum of mice and rats ([Camillo, Arruda Paes et al. 2001](#)).

Acetylcholine is the neurotransmitter best known involved in learning, memory and attention processes, participating in encoding of new information ([Robinson, Platt et al. 2011](#)) ([Doralp and Leung 2008](#)). The dopaminergic system also plays a critical role in the modulation of neuronal activity relates to different forms of learning and memory ([Jay 2003](#)) ([Rossato, Radiske et al. 2013](#)) and may alter the ability to learn and store information ([Adriani, Felici et al. 1998](#)).

The combined effect of these two systems, cholinergic and dopaminergic, in the cognitive functioning of rodents is well documented ([Wahlstrom, Collins et al. 2010](#); [Klinkenberg, Sambeth et al. 2011](#); [Newman, Gupta et al. 2012](#)). Behavioral studies have shown that dopamine can promote memory consolidation in the hippocampal system by facilitating cholinergic function ([Levin and Rose 1991](#); [Hersi, Rowe et al. 1995](#)) and is also important to promote memory persistence ([Rossato, Bevilaqua et al. 2009](#)). Furthermore, it is known that changes in these systems affect negatively the persistence of memory, which has impaired in some diseases such as, for example, in Alzheimer's disease and Parkinson's disease ([Xu, Yan et al. 2012](#)).

Considering the importance of these neurotransmitters in mnemonic processes, it becomes important to study substances that can act on them, thereby modulating these processes, often impaired in several cognitive disorders of the CNS. In the present study we demonstrate that intrahippocampal administration of crotamine promotes the persistence of aversive and object recognition memory in rodents.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Adult male Wistar rats were bought at a registered vivarium. They were housed four per cage and maintained under controlled light and environmental conditions (12h light/12 h dark cycle at a temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and humidity of $50 \pm 10\%$) with food and water *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with the “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication n° 80-23, revised 1996) and with the guidelines established by

the Institutional Animal Care and Use Committee of the Local Institution (IRB #0442012), ensuring that animal numbers and suffering were kept to a minimum.

To study the effects of crotamine on memory persistence, rats were implanted with chronic bilateral guide cannulae in CA1 region of hippocampus and divided into two groups: controls (n=20), which received 1 μ L/side of vehicle (saline), and crotamine (n=20), which received 1 μ L/side of crotamine infusion (1 μ g/ μ L) after training in the behavioral procedures described hereafter. CA1 region of hippocampus was chosen considering its important role in memory processes ([Harooni, Naghdi et al. 2009](#)). Retention tests were conducted 24h after training and persistence tests 7, 14 and 21 days after training. Afterwards, animals from all groups were euthanized for posterior verification of cannulas' placement. Also, three animals of each group were euthanized 24h and 21 days after training for tissue preparation and biochemical analyses described hereafter. Reagents for oxidative parameters analyses were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), and the other reagents used in this study were of analytical grades and obtained from standard commercial supplier.

2.2 Surgery and Drug Infusion Procedures

In order to implant the rats with indwelling cannulas, they were deeply anesthetized with ketamine and xylazine (i.p., 75 mg/kg and 10 mg/kg, respectively) and 27-gauge cannulas were placed, stereotaxically aimed at CA1 region of the dorsal hippocampus (A – 4.2, L \pm 3.0, V – 2.0 mm) (coordinates according to Paxinos & Watson, 1986). The cannulae were affixed with dental cement. Animals were allowed to recover from surgery for 4 days before submitting them to any other procedure.

At the time of drug delivery, 30-gauge infusion cannulas were tightly fitted into the guides. Infusions (1 μ L/side in CA1 region of hippocampus) were carried out over 60 s with

an infusion pump, and the cannulas were left in place for 60 additional seconds to minimize backflow. The placement of cannulas was verified postmortem (except by the animals used in biochemical procedures): 2-4 h after the last behavioral test, a 4% methylene-blue solution was infused in the same volume used in each of the mentioned places as described earlier, and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as an indication of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given to each animal. Only data from animals with correct implants were analyzed. All procedures were conducted in accordance with the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication N. 85-23, revised 1996).

2.3 Crostamine purification

Crostamine was isolated and purified from the venom of the Cdt snake as described by Boni-Mitake et al. (2001) ([Boni-Mitake, Costa et al. 2001](#)). The purity of crostamine was confirmed by the N-terminal analysis of five residues: Tyr–Lys–Gln–Cys–Hys and by amino acid analysis. The amino acid composition of the native toxin was the same as previously reported (Laure, 1975) ([Laure 1975](#)).

The isolated toxin was dissolved in 0.9% saline at 1 µg/µL to hippocampal infusion.

2.4 Object recognition memory test

Training and testing in the object recognition (OR) task were carried out in an open-field arena (50 x 50 x 50 cm) built of polyvinyl chloride plastic, plywood and transparent acrylic as described elsewhere ([Ennaceur and Delacour 1988](#)). The first procedure consisted in habituation of the animals. Each animal was placed in the apparatus for 20 min to freely exploration per day during 4 consecutive days before the training. On training day two

different objects (A and B) were placed in the apparatus; animals were allowed to explore them freely for 5 min. The objects were made of metal, glass, or glazed ceramic. Exploration was defined as sniffing or touching the objects with the nose and/or forepaws. Sitting on or turning around the objects was not considered exploratory behavior. 24 h, 7, 14 or 21 days later, on test phase, one of the objects was randomly exchanged for a novel object (named C, D, E and F, respectively) and rats were reintroduced into the apparatus for an additional 5 min period. To avoid confounds by lingering olfactory stimuli and preferences, the object and the arena were cleaned after testing each animal with 70% ethanol.

2.5 Aversive memory test

Rats were trained in a one-trial step-down inhibitory avoidance task. The training apparatus was a 50 x 25 x 25 cm plexiglass box with a 5 cm-high, 8 cm-wide, and 25 cm-long platform on the left end of a series of bronze bars which made up the floor of the box ([Rossato, Bevilaqua et al. 2009](#)). For training, animals were gently placed on the platform facing the left rear corner of the training box. When they stepped down and placed their four paws on the grid, received a 2 s, 0.5 mA scrambled footshock. Memory retention was evaluated in a no reinforced test session carried out 24 h, 7, 14 and 21 days after training, when the step down latency was measured.

2.6 Open field, plus maze and tail flick

To analyze exploratory and locomotor animal activities and ensure that the toxin infusion did not impaired such behaviors, altering the results of the memory tests, 24 h after crotamine infusion rats were placed on the left quadrant of a 50 x 50 x 39 cm open field made

with wooden painted white, with a frontal glass wall. Black lines were drawn on the floor to divide it into 12 equal quadrants. Crossing and rearing, as measures for locomotor activity and exploration, respectively, were measured over 5 min ([Bonini, Bevilaqua et al. 2006](#)) (Bonini et al., 2006). To evaluate the animals' anxiety state, 24 h after toxin infusion rats were exposed to an elevated plus maze as detailed in Pellow et al. (1985) ([Pellow, Chopin et al. 1985](#)). The total number of entries into the four arms, the number of entries and the time spent into the open arms were recorded over a 5 min session. To ensure the inhibitory avoidance testing efficacy, nociception was measure in the tail flick test ([Tjolsen, Lund et al. 1989](#)). For the test, pain was induced by giving infrared light on the tail of the mice 5 cm away from the tip of the tail. Reaction time (tail-flick latency) was noted by observing the interval between placing the tail on the infrared light source and the withdrawal of the tail.

2.7 Biochemical, hematological, cardiac markers and oxidative parameters analysis

24 h and 21 days after crostamine intrahippocampal infusion, two animals of each group were submitted to euthanasia to tissue collection for biochemical, hematological, cardiac markers and oxidative parameters analyses.

The hemograms (complete blood count) were performed in an automatic counter Cell-Dyn 3200 Hematology Analyzer (Abbott Diagnostic, St Clara, CA, USA), total cholesterol, triglycerides, glucose, creatinine, urea, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), protein and *creatine-kinase* (CK) levels using automatic analyzers A-25 Biosystems (Biosystems SA, Barcelona, Spain) for *in vitro* diagnostics, and Creatine kinase-Muscle B (CK-MB) using Architect Abbott for *in vitro* diagnostics.

The following oxidative parameters were measured using spectrophotometric methods: assessment of DNA damage and micronucleus frequency in leukocytes ([Singh,](#)

[McCoy et al. 1988](#)); lipid peroxidation ([Ohkawa, Ohishi et al. 1979](#)) et and protein carbonyls ([Levine, Garland et al. 1990](#)) in plasma and brain.

For brain's analyses, the brain was homogenized in 10 volumes of Tris HCl (50 mM, pH 7.4). Afterwards, samples were centrifuged at 2400x g for 20 min, and supernatant were used for assay.

Lipoperoxidation was evaluated by the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) test ([Ohkawa, Ohishi et al. 1979](#)) Tests were rapidly homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1/10, w/v), and centrifuged at 2500x g for 15 min. One aliquot of supernatant was incubated at 95°C for 2h, and the colour reaction was measured at 532 nm. Results were expressed as nmol of malondialdehyde per mg protein.

All biochemical assays were carried out in triplicate.

2.8 Statistical analyses

Each object exploration time in OR task was converted in percentage of total exploration time and analyzed using one sample *t*-test with theoretical mean = 50%. For IA results, since a ceiling of 180 s was imposed to step-down latencies during retention tests and this variable does not follow a normal distribution; comparisons between training and test were accomplished using Wilcoxon test. In OF, PM and TF tests the data were analyzed using Student's *t*-test. For comparison of biochemical, hematological and cardiac markers and of oxidative parameters between saline and crostamine groups, and between 24 h and 21 days crostamine group were used unpaired and paired *t*-test, respectively. All data were expressed as mean \pm SEM. The sample size (n, number of animals in each group) for each experiment is state in the figure captions. Statistically significant differences were established at $P < 0.01$.

3. Results

3.1 Object recognition (OR) memory test

We evaluated the persistence of memory through the object recognition task. Rats were trained in the OR, when all they explored for a similar percent of total exploration time two new objects (A and B; Figure 1, training) and received an intrahippocampal infusion of crotamine immediately after. A test session was done until 21 days after training. We found that 24 hours after training all animals were able to recognize the new object, exploring it for a significantly greater percentage of time than 50% of the total exploration time (control $69.65 \pm 3.05\%$, $P=0.004$; crotamine $75.87 \pm 3.04\%$, $P=0.001$; figure 01 test 24h). In 7, 14 and 21 day tests, however, the control group explored equally the two objects, ($P=0.1$, $P=0.06$, $P=0.1$ respectively; figure 01 test 7d, 14d and 21d saline), while animals of crotamine group were able to recognize the new object until 14 days after training, since explored the new object significantly more than 50% of the total exploration time at day 7 test ($66.46 \pm 4.0\%$, $P=0.004$; figure 01 test 7d crotamine) and at day 14 test ($60.46 \pm 2.0\%$, $P=0.009$, figure 01 test 14d crotamine), but not on day 21 test ($60.07 \pm 4.8\%$, $P=0.07$, figure 01 test 21d crotamine).

There are no differences between groups in total time of exploration on OR task in training and tests sessions (Figure 01 – exploration time in OR).

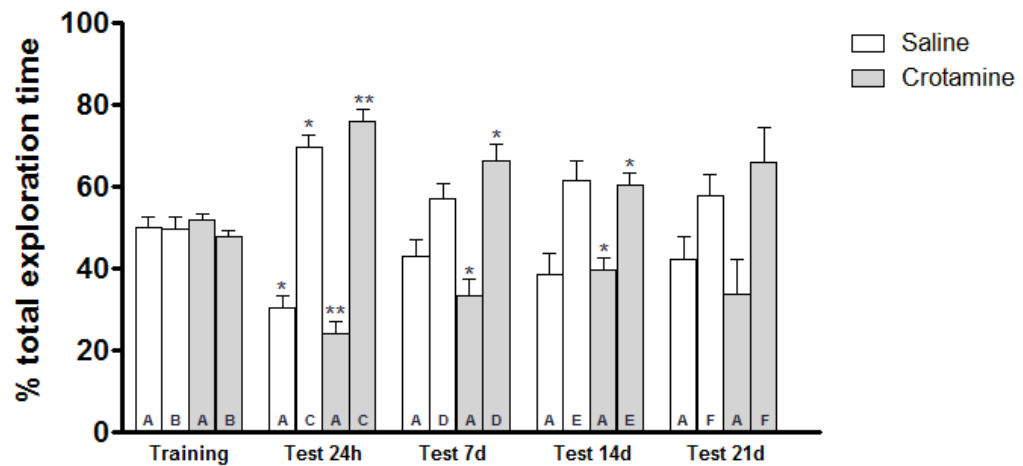


Fig 01. Percent of total exploration time spent for different objects during training and test in the object recognition task. In the training, the objects A and B were equally explored by all groups (one-sample t-test, theoretical mean of 50%) and therefore data are presented averaged for all groups. The test sessions are made 24h, 7, 14 and 21 days after training and saline/crostamine (1 μ g/ μ L) infusion (1 μ L/side). * indicates difference between the percent of exploration time for object and theoretical mean (50%) (* P <0.01; ** P <0.001; One sample t-test).

3.2 Aversive memory test

The persistence of aversive memory was assessed by inhibitory avoidance (IA) task. We found that in the 24 h test all animals increased significantly the step down latency of platform (control training: 11.36 ± 4.29 s x test: 234.1 ± 88.49 s, $P=0.01$; Crostamine training: 9.65 ± 3.41 s x test: 247 ± 87.32 s, $P=0.01$; figure 02 training and test 24 h). In persistence tests made 7, 14 and 21 days after training, control animals showed no significantly longer step down latency when compared with the training session (7 days: 137.7 ± 52.06 s, $P=0.015$; 14 days: $228,7 \pm 86.44$ s, $P=0.015$; 21 days: $118,9 \pm 44.92$ s, $P=0.015$; figure 2 saline tests). The animals of the crostamine group, however, showed a significantly higher latency than the training in 7 days test (118.45 ± 41.87 s, $P=0.0078$, figure 02 test 7d crostamine), 14 days test (171 ± 60.45 s, $P=0.0078$, figure 02 test 14d crostamine) and 21 days test (144.75 ± 51.17 s, $P=0.0078$, figure 02 test 21d crostamine).

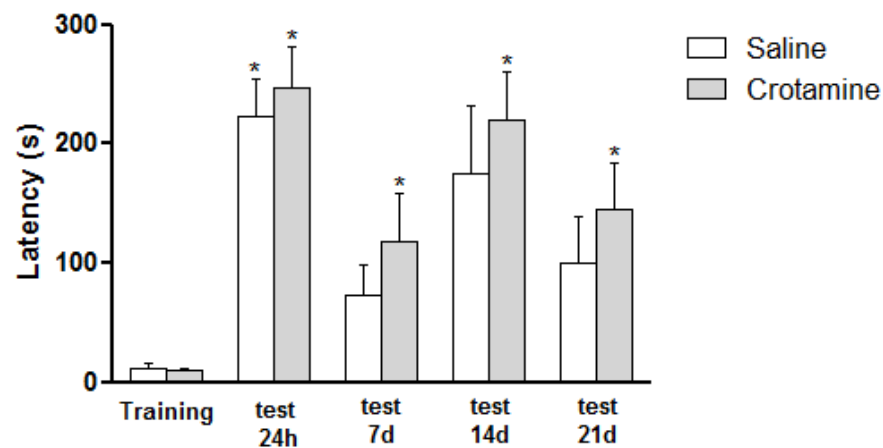


Fig 02. Step down latency in the inhibitory avoidance aversive task training and testing. All the groups increased their latency in 24h test when compared with training. In persistence tests (7, 14 and 21 days) only the rats that received intrahippocampal crostamine ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$; $1\mu\text{L}/\text{side}$) after training showed step down latency increased. * $P < 0.01$; Wilcoxon test. Data represent the mean \pm SEM of escape latency to step down in inhibitory avoidance on training and test. $n = 6-10$ per group.

3.3 Open Field, plus maze and tail flick

Rats were exposed to an open-field arena, elevated plus maze and tail flick test after the toxin infusion to verify exploratory and locomotor activity, anxiety, and pain threshold, respectively. The intrahippocampal crostamine infusion ($1\mu\text{g}/\mu\text{g}$; $1\mu\text{L}/\text{side}$) did not affect the number of crossings and rearing during the 5 min long free exploration session at the open field (Table 1 – Open Field). Similarly, no effects in the total number of entries or in time spent at open arms during the plus maze session were found (Table 01 – Plus maze) and in latency time to reaction in the tail flick (Table 01 – Tail Flick).

Table 01. Result of behavioral tasks. The intrahippocampal crostamine infusion had no effect on total time of exploration in object recognition task (OR), locomotor and exploratory activities, anxiety and pain thresholds. Data are expressed as mean \pm SEM of the total time of exploration for OR, number of crossings (open field), the time spent in the open arms (plus maze), and time latency (tail flick). There were no differences between the groups (one sample t test; $n = 6-10$ per group for all tests).

Behavioral task		Groups	
		Control	Crotamine
Total Exploration Time in OR	Training session (s)	30.02 ± 12.73	40.35 ± 14.97
	24h test session (s)	27.98 ± 9.89	26.95 ± 9.52
	7 days test session (s)	28.87 ± 10.20	27.77 ± 9.81
	14 days test session (s)	28.73 ± 10.12	30.05 ± 10.62
	21 days test session (s)	26.42 ± 5.80	26.55 ± 9.38
Open field	Crossings (n°)	34.00 ± 12.85	46.65 ± 16.48
	Rearings (n°)	18.40 ± 6.96	18.62 ± 6.58
Plus maze	Total entries (n°)	3.14 ± 1.18	2.50 ± 0.88
	Time in open arms (s)	3.42 ± 1.29	2.93 ± 1.03
Tail Flick	Latency (s)	5.20 ± 1.94	5.10 ± 1.81

3.4 Biochemical, hematological, cardiac markers and oxidative parameters analysis

24 h and 21 days after intrahippocampal infusion of crotamine animals were euthanized for tissue collection and preparation for biochemical, hematological, cardiac markers and oxidative parameters analysis. In the saline group we did not observed differences between 24h and 21 days parameters and reference values (data was showed as mean of the measurements; table 02 saline group).

Table 02. Result of biochemical, hematological and cardiac parameters. The intrahippocampal crotamine altered some measurements 24h and 21 days after infusion. Data are expressed as mean ± SEM.

	Saline group 24h/21 days	Crotamine group	
		24h	21 days
Creatinine (mg/dL)	0.58 ± 0.006	0.57 ± 0.005	0.83 ± 0.01 ^{#*}
Urea (mg/dL)	45.5 ± 0.89	52.75 ± 1.26 [*]	34.29 ± 0.3 ^{#*}
GOT (U/L)	120 ± 0.56	142 ± 2.22 [*]	266.1 ± 3.32 ^{#*}
GPT (U/L)	73.25 ± 0.98	82.75 ± 2.75 [*]	94.43 ± 1.11 ^{#*}
CK (U/L)	806.3 ± 4.69	947 ± 15.71 [*]	1.52 ± 12.62 ^{#*}
CK-MB (U/L)	2.24 ± 19.11	2.33 ± 49.86	2.41 ± 0.06 ^{#*}
Red Blood Cells (106/μL)	7.21 ± 0.01	6.66 ± 0.04 [*]	7.84 ± 0.31
Hemoglobin (g/dL)	13.58 ± 0.11	13.1 ± 0.16	13.4 ± 0.25
Hematocrit (%)	40.88 ± 0.18	38.6 ± 0.57 [*]	37.76 ± 0.5 [*]
Leukocytes (103/μL)	5.87 ± 57.9	4.5 ± 56.41 [*]	9.28 ± 0.25 ^{#*}
Platelets (103/μL)	444.8 ± 2	532.3 ± 3.158 [*]	889 ± 16.14 ^{#*}

* Differ from saline values; # Differ from 24h crotamine group P<0.01.

24h after infusion, crostamine altered the values of urea, GOT, GPT, CK, red blood cells, hematocrit, leukocytes and platelets when compared to the saline group values ($P<0.01$, table 02, crostamine group 24h). 21 days after infusion of crostamine the values of creatinine, urea, GOT, GPT, CK, hematocrit, leukocytes, platelets remained different from saline values ($P<0.01$, table 02 crostamine group 21 days), and also CK-MB, creatinine ($P<0.01$, table 02 crostamine group 21 days), TBARS (plasma and brain), carbonyl (plasma and brain) and micronucleus ($P<0.01$, table 03 crostamine group 21 days) are different of saline group values.

Table 3. Result of oxidative parameters. The intrahippocampal crostamine altered oxidative parameters 21 days after infusion. Data are expressed as mean \pm SEM.

	Saline Group 24h/21 days	Crostamine Group	
		24h	21 days
TBARS Plasma (nmol MDA/L)	27.43 \pm 0.27	27.43 \pm 0.92	50.51 \pm 1.37 ^{#*}
TBARS Brain (nmol MDA/L)	96.13 \pm 1.32	97.73 \pm 3.62	143.3 \pm 4.34 ^{#*}
Carbonyl Plasma (nmol carbonyl/mg protein)	0.01 \pm 0.0002	0.01 \pm 0.0004	0.02 \pm 0.0006 ^{#*}
Carbonyl Brain (nmol carbonyl/mg protein)	0.01 \pm 0.0003	0.01 \pm 0.0005	0.02 \pm 0.0007 ^{#*}
Micronucleus (% frequency)	0.75 \pm 0.13	1 \pm 0.21	1.87 \pm 0.19 [*]

* Differ from saline values; # Differ from 24h crostamine group $P<0.01$.

5. Discussion

The crostamine is a strongly basic polypeptide consisting of 42 amino acid residues and found in the venom of a South American rattlesnake. Little is known about its effects on the CNS. Here we demonstrate, for the first time, that the intrahippocampal infusion of crostamine (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 1 $\mu\text{L}/\text{side}$) promotes the persistence of recognition and aversive memory in rats.

According to our knowledge, no previous study has investigated the effects of crostamine on memory. Studies of toxins isolated from the venom of Cdt have investigated the effects of crostamine the Peripheral Nervous System, in the neuromuscular junction, and draft crostamine as a myotoxin ([Maeda, Tamiya et al. 1978](#); [Boni-Mitake, Costa et al. 2006](#); [Rizzi,](#)

[Carvalho-de-Souza et al. 2007](#)). For example, recently, Silva et al (2013) demonstrated the benefit of the use of crotaminem, compared to neostigmine, in the treatment of myasthenia gravis, since the mice treated with crotamine showed progressive and sustained muscle contractions, as well as an improvement in exercise tolerance ([Hernandez-Oliveira e Silva, Rostelato-Ferreira et al. 2013](#)).

Here we demonstrate that a single infusion of crotamine directly in the rat's hippocampus after a new learning improves memory persistence in object recognition task, allowing that the animal remember the original memory lasts up to 14 days after learning, which does not occur in animals that not received the infusion. The crotamine also allowed the persistence of aversive memory up to 21 days after the training session in inhibitory avoidance, which did not occur with those animals that received no infusion of the toxin. Although no previous study has investigated the effect of crotamine specifically on memory, Camillo et. al. (2001) showed that the infusion of 5 μ M of crotamine, as well as the infusion of crotoxin, both isolated fractions from snake venom, promotes a clear increase in basal levels of dopamine and acetylcholine in the striatum of rats ([Camillo, Arruda Paes et al. 2001](#)).

Considering that the cholinergic system is an important memory performance modulator ([Lopes Aguiar, Romcy-Pereira et al. 2008](#)) it can explain the crotamine effect on memory persistence. Studies have shown that acetylcholine is best known neurotransmitter involved in the processes of learning, memory and attention, both its nicotinic, such as muscarinic receptors, participate in encoding of new information ([Doralp and Leung 2008](#); [Robinson, Platt et al. 2011](#)). Likewise, dopamine is regarded as the most influential neurotransmitter in modulating the mnemonic activity related to inhibitory avoidance task in mice ([Myhrer 2003](#)) and is involved in persistence of this type of memory ([Rossato, Bevilaqua et al. 2009](#)). Thus, these data corroborate to our hypothesis that crotamine promotes persistence of memory through the increment of the acetylcholine and dopamine release, both

important modulators in the process of formation, consolidation and persistence of declarative and aversive memories evaluated here.

In our study, unlike the findings of Matavel (1998) and Harbermann (1975), who showed that in rats, when crostamine is inoculated alone, produces muscle spasms and spastic paralysis, whereas when injected directly into the mice's brain produces spasticity and convulsive states, as well as body jerks, myoclonus of the legs, walking in circles, episodes isolated of abrupt races or accompanied by generalized tonic-clonic seizures, our results showed no significant motor behavioral changes occurred in open field and elevated plus maze tests ([Habermann and Cheng-Raude 1975](#); [Matavel, Ferreira-Alves et al. 1998](#)). This may be related to the route of administration used here (intrahippocampal), and the motor control effects may be related to the action of the toxin in structures such as the striatum, like observed by Camillo et al. (2001) ([Camillo, Arruda Paes et al. 2001](#)).

We also observed that the administration of the toxin caused acute changes (24h) and chronic (21 days) significant changes on biochemical, hematological and cardiac parameters, and chronic changes in plasma and brain oxidative parameters. Although brain changes were expected, was not known whether systemic changes would occur, since there is a controversy in the literature regarding the metabolism of crostamine. On the one hand, some authors argue that this toxin is able to cross the blood brain barrier and exert CNS effects ([Habermann and Cheng-Raude 1975](#); [Mancin, Soares et al. 1998](#)), on the other hand, findings of Mitake (2006) on the native and irradiated crostamine biodistribution after intraperitoneal injection indicated that both forms are hepatic and renal clearance and metabolism also have affinity for the skeletal muscle, but do not cross the blood brain barrier ([Boni-Mitake, Costa et al. 2006](#)). Our findings corroborate the assumption that crostamine is able to cross the blood brain barrier, since a single intrahippocampal infusion crostamine (1 μ L/side) in a small concentration (1 μ g/ μ L) was able to alter hematological parameters and cardiac markers, as well as blood

oxidative parameters, not only on brain, indicating systemic inflammatory and toxicological effects.

Therefore, the crothamine, an isolated fraction from the venom of *Cdt*, demonstrated that can be a potent pharmacological tool for diseases involving memory impairment, although it is still necessary to find alternatives that will enable its use, decreasing the toxicity. In this sense, although studies are still necessary, there are already tools that can alleviate the toxicity of crothalic compounds. Mitake (2006) found that the gamma irradiation decreased the toxicity of crothamine without abolished its biological activity, which may enable the use thereof for therapeutic purposes with the mitigation of its toxic effects ([Boni-Mitake, Costa et al. 2006](#)).

5. Conclusion

Here we reported the intrahippocampal infusion of crothamine isolated from *crotalus terrificus* venom promotes object recognition and aversive memory persistence in rats. Despite the data show here indicates the possibility of using crothamine as potent pharmacological tool for diseases involving memory impairment, more experiments are needed to elucidate the mechanisms involved in memory persistence and to investigate ways to reduce the toxicity of the toxin.

Acknowledgments

This study was supported by Federal University of Pampa (Research's Groups Grant). L. Vargas was supported by CAPES student scholarship. M.V. Lara and R.Gonçalves were supported by Federal University of Pampa scholarship.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Adriani, W., A. Felici, et al. (1998). "N-methyl-D-aspartate and dopamine receptor involvement in the modulation of locomotor activity and memory processes." Exp Brain Res 123(1-2): 52-59.
- Boni-Mitake, M., H. Costa, et al. (2001). "Effects of (60)Co gamma radiation on crotamine." Braz J Med Biol Res 34(12): 1531-1538.
- Boni-Mitake, M., H. Costa, et al. (2006). "Distribution of (125)I-labeled crotamine in mice tissues." Toxicol 48(5): 550-555.
- Bonini, J. S., L. R. Bevilaqua, et al. (2006). "Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval." Horm Behav 50(2): 308-313.
- Camillo, M. A., P. C. Arruda Paes, et al. (2001). "Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue." Toxicol 39(6): 843-853.
- Doralp, S. and L. S. Leung (2008). "Cholinergic modulation of hippocampal CA1 basal-dendritic long-term potentiation." Neurobiol Learn Mem 90(2): 382-388.
- Ennaceur, A. and J. Delacour (1988). "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data." Behav Brain Res 31(1): 47-59.
- Habermann, E. and D. Cheng-Raude (1975). "Central neurotoxicity of apamin, crotamin, phospholipase A and alpha-amanitin." Toxicol 13(6): 465-473.
- Harooni, H. E., N. Naghdi, et al. (2009). "The role of hippocampal nitric oxide (NO) on learning and immediate, short- and long-term memory retrieval in inhibitory avoidance task in male adult rats." Behav Brain Res 201(1): 166-172.
- Hernandez-Oliveira e Silva, S., S. Rostelato-Ferreira, et al. (2013). "Beneficial effect of crotamine in the treatment of myasthenic rats." Muscle Nerve 47(4): 591-593.
- Hersi, A. I., W. Rowe, et al. (1995). "Dopamine D1 receptor ligands modulate cognitive performance and hippocampal acetylcholine release in memory-impaired aged rats." Neuroscience 69(4): 1067-1074.
- Jay, T. M. (2003). "Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms." Prog Neurobiol 69(6): 375-390.
- Klinkenberg, I., A. Sambeth, et al. (2011). "Acetylcholine and attention." Behav Brain Res 221(2): 430-442.
- Laure, C. J. (1975). "[The primary structure of crotamine (author's transl)]." Hoppe Seylers Z Physiol Chem 356(2): 213-215.
- Levin, E. D. and J. E. Rose (1991). "Interactive effects of D1 and D2 agonists with scopolamine on radial-arm maze performance." Pharmacol Biochem Behav 38(2): 243-246.
- Levine, R. L., D. Garland, et al. (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins." Methods Enzymol 186: 464-478.

- Lopes Aguiar, C., R. N. Romcy-Pereira, et al. (2008). "Muscarinic acetylcholine neurotransmission enhances the late-phase of long-term potentiation in the hippocampal-prefrontal cortex pathway of rats in vivo: a possible involvement of monoaminergic systems." Neuroscience 153(4): 1309-1319.
- Maeda, N., N. Tamiya, et al. (1978). "Some chemical properties of the venom of the rattlesnake, *Crotalus viridis helleri*." Toxicon 16(5): 431-441.
- Mancin, A. C., A. M. Soares, et al. (1998). "The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study." Toxicon 36(12): 1927-1937.
- Matavel, A. C., D. L. Ferreira-Alves, et al. (1998). "Tension generation and increase in voltage-activated Na⁺ current by crotamine." Eur J Pharmacol 348(2-3): 167-173.
- Mello, L. E. and E. A. Cavalheiro (1989). "Behavioural, electroencephalographic and neuropathological effects of the intrahippocampal injection of the venom of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*)." Toxicon 27(2): 189-199.
- Myhrer, T. (2003). "Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks." Brain Res Brain Res Rev 41(2-3): 268-287.
- Newman, E. L., K. Gupta, et al. (2012). "Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models." Front Behav Neurosci 6: 24.
- Ohkawa, H., N. Ohishi, et al. (1979). "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction." Anal Biochem 95(2): 351-358.
- Pellow, S., P. Chopin, et al. (1985). "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat." J Neurosci Methods 14(3): 149-167.
- Rizzi, C. T., J. L. Carvalho-de-Souza, et al. (2007). "Crotamine inhibits preferentially fast-twitching muscles but is inactive on sodium channels." Toxicon 50(4): 553-562.
- Robinson, L., B. Platt, et al. (2011). "Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory." Behav Brain Res 221(2): 443-465.
- Rossato, J. I., L. R. Bevilaqua, et al. (2009). "Dopamine controls persistence of long-term memory storage." Science 325(5943): 1017-1020.
- Rossato, J. I., A. Radiske, et al. (2013). "Consolidation of object recognition memory requires simultaneous activation of dopamine D1/D5 receptors in the amygdala and medial prefrontal cortex but not in the hippocampus." Neurobiol Learn Mem 106: 66-70.
- Ruff, R. L. and V. A. Lennon (1998). "End-plate voltage-gated sodium channels are lost in clinical and experimental myasthenia gravis." Ann Neurol 43(3): 370-379.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, et al. (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." Exp Cell Res 175(1): 184-191.
- Tjolsen, A., A. Lund, et al. (1989). "An improved method for tail-flick testing with adjustment for tail-skin temperature." J Neurosci Methods 26(3): 259-265.
- Wahlstrom, D., P. Collins, et al. (2010). "Developmental changes in dopamine neurotransmission in adolescence: behavioral implications and issues in assessment." Brain Cogn 72(1): 146-159.
- Xu, Y., J. Yan, et al. (2012). "Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease." Prog Neurobiol 97(1): 1-13.

PARTE III

3.1 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da crotamina, toxina isolada do veneno da Cdt, na persistência da memória em ratos. Para isso, submetemos os animais a dois diferentes testes de memória, reconhecimento de objetos e esquiva inibitória, infundindo crotamina intrahipocampal imediatamente após a sessão de aprendizagem. 24 horas, 7, 14 e 21 dias após a aprendizagem os submetemos a sessões de teste (evocação da aprendizagem).

A crotamina é um polipeptídeo fortemente básico, constituída por 42 resíduos de aminoácidos, encontrada no veneno de cascavel sul-americana. Pouco se sabe a respeito de seus efeitos sobre o SNC. Nós demonstramos que a infusão intrahipocampal da crotamina (1µg/1µL; 1µL/lado) provocou melhora na persistência da memória de reconhecimento de objetos, de forma que os animais que receberam a toxina conseguiram manter esta memória até 14 dias após o aprendizado, já os animais que receberam salina (controle), só foram capazes de evocar a memória original 24h após a aprendizagem, e, após este período, o traço mnemônico decaiu. Da mesma forma, a crotamina promoveu a persistência da memória aversiva, de forma que os animais treinados na esquiva inibitória que receberam infusão de crotamina foram capazes de lembrar a memória original até 21 dias após a aprendizagem, ao contrário dos controles, que só foram capazes de evocar até 24h após a aprendizagem.

Estudos realizados com toxinas isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* têm destacado a crotamina, um dos componentes do veneno bruto, como uma miotoxina (MAEDA et al., 1978; BONI-MITAKE et al., 2006.; RIZZI et al., 2007). Esta toxina é conhecida por induzir a despolarização da membrana muscular esquelética mediante o aumento da permeabilidade ao Na⁺, provocando um estado de fibrilação com curtas

contrações musculares acompanhadas de relaxamento demorado. Esses efeitos são explicados, por alguns autores, como decorrência de sua atuação por meio de canais de sódio nas fibras musculares (MATAVEL et al., 1998; OGIURA et al., 2005). Diante desse achado, diversos estudos têm voltado a sua investigação para os efeitos da crotamina no tratamento da miastenia grave, doença autoimune, caracterizada por disfunção na junção neuromuscular, resultando em episódios de fraqueza muscular e cansaço anormal (AKNIN & PANSE, 2013).

Recentemente, Silva e colaboradores (2013), demonstraram o benefício do uso da crotamina, em comparação a neostigmina, no tratamento da miastenia grave (SILVA et al., 2013). A neostigmina é uma das poucas ferramentas farmacológicas disponíveis para o tratamento desta patologia (SHENG et al., 2010), e, mesmo fornecendo alívio sintomático, seus efeitos colaterais inconvenientes limitam consideravelmente a sua eficácia a longo prazo em muitos pacientes. Os autores verificaram que os animais tratados com crotamina apresentaram contrações musculares progressivas e sustentadas, além de uma melhora na tolerância ao exercício, a qual foi caracterizada pela diminuição do número de episódios de fadiga muscular após duas semanas de tratamento com uma única dose de crotamina, demonstrando que a crotamina foi mais eficiente na performance muscular de ratos miastênicos do que a neostigmina, possivelmente pela melhora na transmissão neuromuscular.

Embora ainda não encontrem estudos que tenham avaliado o efeito da crotamina especificamente na memória, já se sabe que esta toxina tem relação direta com a liberação de neurotransmissores no SNC de ratos e camundongos. Camillo et al. (2001) buscaram investigar a relação comportamental e possível liberação de neurotransmissores utilizando a giroxina, a crotamina e a crotoxina, ambas componentes do veneno crotálico. Os autores verificaram que a infusão de 5µM de crotamina promove um claro aumento nos níveis basais de acetilcolina e dopamina no estriado de ratos e camundongos (CAMILLO et al., 2001).

De acordo com Lopes e colaboradores (2008) o sistema colinérgico é um importante modulador para o desempenho da memória (LOPES et al, 2008). Corroborando com esses autores, estudos têm demonstrado que a acetilcolina é o neurotransmissor mais conhecido envolvido nos processos de aprendizagem, memória e atenção, uma vez que tanto seus receptores nicotínicos, como os muscarínicos participam da codificação de novas informações e da persistência da memória (ROBINSON et al., 2011; DORALP & LEUNG, 2008; PARTIFF et al, 2012).

As vias dopaminérgicas também desempenham um papel crítico na modulação da atividade neuronal relacionada com as diferentes formas de aprendizagem e de memória (JAY, 2003), podendo alterar a capacidade de aprender e armazenar informações (ADRIANI et al. 1998). Conforme Myhrer (2003), a dopamina é o neurotransmissor mais influente na modulação da atividade mnemônica relacionada à tarefa de esQUIVA inibitória em ratos (MYHRER, 2003). Lecourtier e colaboradores (2008) afirmam que a disponibilidade prolongada deste neurotransmissor em áreas como o córtex pré-frontal e *nucleus accumbens* é fundamental para a manutenção dos estados de motivação, aprendizagem associativa e memória de trabalho (LECOURTIER et al., 2008). A modulação da evocação da memória também envolve as fibras dopaminérgicas, sendo a evocação melhorada pela ativação dos receptores D1 (IZQUIERDO, 2011). Além disso, já foi documentado que os receptores dopaminérgicos hipocámpais controlam a persistência da memória de longa duração (ROSSATO et al, 2009).

Levando em consideração a carência de estudos que visem a investigação dos efeitos da crotamina no SNC, os achados de Camillo sustentam a nossa hipótese, a qual baseia-se no fato de que a crotamina promoveu uma melhora da persistência da memória mediante a liberação desses neurotransmissores, acetilcolina e dopamina, ambos importantes moduladores nos processos mnemônicos, no hipocampo dorsal dos ratos. Sabe-se que

alterações nos sistemas dopaminérgico e colinérgico estão presentes em demências, a saber, doença de Alzheimer e doença de Parkinson, alterações estas que repercutem prejudicando as funções mnemônicas, entre elas a persistência da memória (XU et al., 2012). Diante disso, ressalta-se a importância dos achados previamente relatados, que apontam a crotamina como uma toxina capaz de promover a persistência mnemônica e a liberação de neurotransmissores importantes no SNC, uma vez que a mesma pode se tornar uma promissora alternativa de tratamento em patologias como as demenciais.

Ainda em nosso estudo, visando avaliar se a infusão intrahipocampal da crotamina não alterou a atividade locomotora dos animais, bem como ansiedade dos mesmos, o que poderia alterar nossos resultados dos testes comportamentais que avaliam a memória, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto e labirinto em cruz elevado, respectivamente. Nossos resultados não demonstraram quaisquer alterações comportamentais significativas mediante estes testes, o que comprova que a crotamina não influenciou esses parâmetros comportamentais. Diferentemente de nossos achados, Matavel (1998) e Habermann (1975), mostraram que quando inoculada isoladamente em ratos, a crotamina produz efeitos de espasmos musculares e paralisia espástica, enquanto que quando injetada diretamente no cérebro de camundongos produz espasticidade e estados convulsivos, assim como sacudidas corporais, mioclonias das patas, andar em círculos, episódios de corridas abruptas isoladas ou acompanhadas por convulsões tônicoclônicas generalizadas. Estes diferentes achados encontrados podem estar relacionados com as diferentes vias de administração utilizadas nos diferentes estudos (periférica, intra-estriatal, entre outras) (MATAVEL et al., 1998; HABERMANN & CHENG-RAUDE, 1975).

No entanto, em nosso estudo, verificamos que a administração da toxina provocou alterações significativas em parâmetros hematológicos e oxidativos, tanto aguda como cronicamente. Existe uma controvérsia em relação ao metabolismo da crotamina, uma vez que

alguns autores defendem que a mesma, quando administrada perifericamente, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e exercer efeitos no SNC (HABERMANN & CHENG-RAUDE, 1975; MANCIN et al., 1998). De acordo com Cardi e colaboradores (1998) estudos sobre a biodistribuição de toxinas integrantes do veneno de *Cdt* mostraram que uma pequena quantidade dessas toxinas se fixa no tecido cerebral após administração sistêmica (CARDI et al., 1998). Ainda neste mérito, Maruyama et al. (2005) observaram que o veneno de *Cdt* pode induzir apoptose em células endoteliais que compõem a BHE reduzindo sua competência (MARUYAMA et al., 2005). Opondo-se aos achados supracitados, Mitake (2006) estudou a biodistribuição da crotamina nativa e irradiada, mediante injeção intraperitoneal, e demonstrou que ambas têm metabolismo hepático e eliminação renal e também apresentaram afinidade por músculo esquelético, entretanto não atravessaram a BHE (MITAKE et al., 2006).

Nossos achados corroboram com a premissa de que a crotamina é capaz de atravessar a BHE, já que uma única infusão intrahipocampal de crotamina (1µg/1µL; 1µL/lado), foi capaz de alterar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e marcadores cardíacos, bem como parâmetros de estresse oxidativo em sangue e encéfalo, tanto 24 horas como também 21 dias após a infusão, evidenciando um efeito a curto e longo prazo no processo inflamatório e toxicidade.

Nesse sentido, já existem estudos visando atenuar a toxicidade de compostos crotálicos. Mitake e colaboradores. (2006), por exemplo, avaliaram a biodistribuição da crotamina nativa e irradiada e demonstraram que a radiação gama diminui a toxicidade da crotamina, mas não abole a sua atividade biológica. Estudos como este são de ampla importância, pois a partir desses resultados pode-se viabilizar o uso da crotamina para fins terapêuticos, uma vez que houve a atenuação dos seus efeitos tóxicos (MITAKE et al., 2006).

3.2 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho podemos afirmar que a crotamina induziu a persistência da memória de reconhecimento e memória aversiva em ratos. Além disso, a infusão da toxina não alterou parâmetros comportamentais motores e de ansiedade dos animais, no entanto, promoveu alterações em parâmetros hematológicos e de estresse oxidativo.

Assim, fica clara a possibilidade futura do uso desse composto como instrumento farmacológico, principalmente no diz respeito a doenças relacionado com o SNC que tenham como sintomas o prejuízo das funções mnemônicas, no entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na persistência da memória e investigar maneiras de reduzir a toxicidade induzida pela crotamina.

3.3 PERSPECTIVAS

Buscando de elucidar os mecanismos envolvidos na melhora da persistência da memória, a pesquisa nesse tema será continuada, de forma que pretendemos mensurar a liberação dos neurotransmissores envolvidos em nossa hipótese, dopamina e acetilcolina, no hipocampo dos animais mediante a infusão de crotamina, utilizando, para isso, a técnica de HPLC (*High-Pressure Liquid Chromatography*).

Ainda, pretendemos realizar avaliações histológicas como complemento à investigação dos mecanismos envolvidos com os efeitos da crotamina no SNC. Também buscaremos explorar os resultados de toxicidade, investigando os possíveis mecanismos envolvidos no metabolismo dessa toxina. Desta forma, presente trabalho pode ser continuado como trabalho de doutorado, com subprojetos de iniciação científica e mestrado associados.

REFERÊNCIAS

ADRIANI, W., A. FELICI, F. SARGOLINI, P. ROULLET, A. USIELLO, A. OLIVERIO, AND A. MELE. "N-Methyl-D-Aspartate and Dopamine Receptor Involvement in the Modulation of Locomotor Activity and Memory Processes." *Exp Brain Res* 123, no. 1-2 (1998): 52-9.

AMARAL CFS, MAGALHÃES RA, REZENDE NA. Comprometimento respiratório secundário e acidente ofídico crotálico. *Rer Inst Med Trop.* (1991): 33:251-5.

AMARAL CFS, MAGALHÃES RA, REZENDE NA, PEDROSA TMG. A fibrogenemia secundária e acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Ver. Inst. Med> Trop.* (1988) 30: 288-292.

AMARAL CFS, REZENDE NA, SILVA AO. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico: Análise de 63 casos. *Rer Inst Med Torp.* (1986) 28:220-7.

AZEVEDO-MARQUES, M. M., S. E. HERING, AND P. CUPO. "Evidence That *Crotalus Durissus Terrificus* (South American Rattlesnake) Envenomation in Humans Causes Myolysis Rather Than Hemolysis." *Toxicon* 25, no. 11 (1987): 1163-8.

AZEVEDO-MARQUES, M.M; HERING, S.E; CUPO, P. Acidente crotalico In: Cardoso, J.L.C. Franca, F.O.S.; Wen, F.H. Malaque, C.M.S. Haddadjunior, V. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Sarvier. Sao Paulo. (2009) 2^a ed.

BARRIO, A., AND O. V. BRAZIL. "Neuromuscular Action of the *Crotalus Terrificus* (*Laur.*) Poisons." *Acta Physiol Lat Am* 1, no. 4 (1951): 291-308.

BEAR, MARK; CONNORS, F. BARRY W.; PARADISO, MICHAEL A. Neurociências: Desvendando o sistema nervosa. Editora: ARTMED. (2008): 858.

BERRIH-AKNIN, S., AND R. LE PANSE. "Myasthenia Gravis: A Comprehensive Review of Immune Dysregulation and Etiological Mechanisms." *J Autoimmun*, (2014).

BONI-MITAKE, M., COSTA, H., VASSILIEFF, V.S., ROGERO, J.R. Distribution of 125I-labeled crotoxin in mice tissues. *Toxicon* (2006), 550–555.

CAHILL, L., AND J. L. MCGAUGH. "Mechanisms of Emotional Arousal and Lasting Declarative Memory." *Trends Neurosci* 21, no. 7 (1998): 294-9.

CAMILLO, M. A., P. C. ARRUDA PAES, L. R. TRONCONE, AND J. R. ROGERO. "Gyroxin Fails to Modify in Vitro Release of Labelled Dopamine and Acetylcholine from Rat and Mouse Striatal Tissue." *Toxicon* 39, no. 6 (2001): 843-53.

CARDI, B. A., H. F. ANDRADE, JR., J. R. ROGERO, AND N. NASCIMENTO. "Differential Biodistribution of Native and 2 Kgy 60co Irradiated Crotoxin in Tissues of Cba/J Mice." *Nat Toxins* 6, no. 1 (1998): 19-25.

CARRE, G. P., AND C. W. HARLEY. "Glutamatergic Activation of the Medial Septum Complex: An Enhancement of the Dentate Gyrus Population Spike and Accompanying Eeg and Unit Changes." *Brain Res* 861, no. 1 (2000): 16-25.

CHEYMOL, J., GONÇALVES, J.M., BOURILLET, F. et al. Effects neuromusculaires dès venins deux varietes de *Crotalus durissus terrificus*. *Archs. mIn. Pharmacodyn.* (1969): 40-55.

CHEYMOL, J., GONÇALVES, J.M., BOURILLET, F. et al. Action neuromusculaire comparée de la crotoxin et du venin de *Crotalus durissus terrificus var crotaminus*. *II* Sur préparations neuromusculaire in situ. *Toxicon*.(1971 a): 279-86.

CHEYMOL, J., GONÇALVES, J.M., BOURILLET, F. et al. Action neuromusculaire comparée de la crotoxin et du venin de *Crotalus durissus terrificus var crotaminus*. *II*./ Sur préparations isolées. *Toxicon*. (1971 b): 287-89, 1971b.

CURTIS, C. E., AND M. D'ESPOSITO. "Persistent Activity in the Prefrontal Cortex During Working Memory." *Trends Cogn Sci* 7, no. 9 (2003): 415-423.

DAL PAI V, NETO HS. Ação dos venenos sobre os tecidos animais. In: Barravieira B. Venenos animais. Uma visão integrada. São Paulo: Publicações Científicas 1994.

DORALP, S., AND L. S. LEUNG. "Cholinergic Modulation of Hippocampal Ca1 Basal-Dendritic Long-Term Potentiation." *Neurobiol Learn Mem* 90, no. 2 (2008): 382-8.

FADEL, V., P. BETTENDORFF, T. HERRMANN, W. F. DE AZEVEDO, JR., E. B. OLIVEIRA, T. YAMANE, AND K. WUTHRICH. "Automated Nmr Structure Determination and Disulfide Bond Identification of the Myotoxin Crotamine from *Crotalus Durissus Terrificus*." *Toxicon* 46, no. 7 (2005): 759-67.

GONÇALVES, J. M., AND A. POLSON. "The Electrophoretic Analysis of Snake Venoms." *Arch Biochem* 13, no. 2 (1947): 253-9.

GONÇALVES JM, VIEIRA LG. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras I. Análise eletroforética. *An Acad Bras Cienc* (1950) 22:141-50.

HABERMANN, E., AND D. CHENG-RAUDE. "Central Neurotoxicity of Apamin, Crotaamin, Phospholipase a and Alpha-Amanitin." *Toxicon* 13, no. 6 (1975): 465-73.

HAROONI, H. E., N. NAGHDI, H. SEPEHRI, AND A. H. ROHANI. "The Role of Hippocampal Nitric Oxide (No) on Learning and Immediate, Short- and Long-Term Memory Retrieval in Inhibitory Avoidance Task in Male Adult Rats." *Behav Brain Res* 201, no. 1 (2009): 166-72.

HERNANDEZ-OLIVEIRA E SILVA, S., S. ROSTELATO-FERREIRA, T. A. ROCHA-E-SILVA, P. RANDAZZO-MOURA, C. A. DAL-BELO, E. F. SANCHEZ, C. R. BORJA-OLIVEIRA, AND L. RODRIGUES-SIMIONI. "Beneficial Effect of Crotaamin in the Treatment of Myasthenic Rats." *Muscle Nerve* 47, no. 4 (2013): 591-3.

HERSI, A. I., W. ROWE, P. GAUDREAU, AND R. QUIRION. "Dopamine D1 Receptor Ligands Modulate Cognitive Performance and Hippocampal Acetylcholine Release in Memory-Impaired Aged Rats." *Neuroscience* 69, no. 4 (1995): 1067-74.

IZQUIERDO, I. *Memória*. Porto Alegre: Artmed. 2011.

IZQUIERDO, I.; IZQUIERDO, L. A. Neurobiologia da memória. In: Kapczinski, F. Quevedo, J.; Izquierdo, I. A. Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

IZQUIERDO, I., C. DA CUNHA, R. ROSAT, D. JERUSALINSKY, M. B. FERREIRA, AND J. H. MEDINA. "Neurotransmitter Receptors Involved in Post-Training Memory Processing by the Amygdala, Medial Septum, and Hippocampus of the Rat." *Behav Neural Biol* 58, no. 1 (1992): 16-26.

IZQUIERDO, I., AND J. L. MCGAUGH. "Behavioural Pharmacology and Its Contribution to the Molecular Basis of Memory Consolidation." *Behav Pharmacol* 11, no. 7-8 (2000): 517-34.

IZQUIERDO, I., AND J. H. MEDINA. "Gaba_A Receptor Modulation of Memory: The Role of Endogenous Benzodiazepines." *Trends Pharmacol Sci* 12, no. 7 (1991): 260-5.

IZQUIERDO, I. AND MEDINA, J. H. "Correlation between the Pharmacology of Long-Term Potentiation and the Pharmacology of Memory." *Neurobiol Learn Mem* 63, no. 1 (1995): 19-32.

IZQUIERDO, I. AND MEDINA, J. H. "Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures." *Neurobiol Learn Mem* 68, no. 3 (1997): 285-316.

JAY, T. M. "Dopamine: A Potential Substrate for Synaptic Plasticity and Memory Mechanisms." *Prog Neurobiol* 69, no. 6 (2003): 375-90.

JORGE MT, RIBEIRO LA. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. Ver. Ass.Méd.Brs. (1990): 36: 66-77.

KELEN EMA, ROSENFELD G, NUDEL F. Hemolytic activity of animal venoms. II. Variation in relation to erythrocyte species. Mem Inst Butantan. (1960-62): 30: 133-42.

KIM, J. J., AND M. G. BAXTER. "Multiple Brain-Memory Systems: The Whole Does Not Equal the Sum of Its Parts." *Trends Neurosci* 24, no. 6 (2001): 324-30.

KIRBY, B. P., AND J. N. RAWLINS. "The Role of the Septo-Hippocampal Cholinergic Projection in T-Maze Rewarded Alternation." *Behav Brain Res* 143, no. 1 (2003): 41-8.

LAURE, C. J. "[the Primary Structure of Crostamine (Author's Transl)]." *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 356, no. 2 (1975): 213-5.

LECOURTIER, L., A. DEFRANCESCO, AND B. MOGHADDAM. "Differential Tonic Influence of Lateral Habenula on Prefrontal Cortex and Nucleus Accumbens Dopamine Release." *Eur J Neurosci* 27, no. 7 (2008): 1755-62.

LEVIN ED, ROSE JE. Interactive effects of D1 and D2 agonists with scopolamine on radial-arm maze performance. *Pharmacol Biochem Behav* (1991): 243-6.

LOPES AGUIAR, C., R. N. ROMCY-PEREIRA, R. ESCORSIM SZAWKA, O. Y. GALVIS-ALONSO, J. A. ANSELMO-FRANCI, AND J. PEREIRA LEITE. "Muscarinic Acetylcholine Neurotransmission Enhances the Late-Phase of Long-Term Potentiation in the Hippocampal-Prefrontal Cortex Pathway of Rats in Vivo: A Possible Involvement of Monoaminergic Systems." *Neuroscience* 153, no. 4 (2008): 1309-19.

LORENTE DE NÓ, R. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal of Psychology and Neural*, (1934): 46 113-174.

MAEDA, N., N. TAMIYA, T. R. PATTABHIRAMAN, AND F. E. RUSSELL. "Some Chemical Properties of the Venom of the Rattlesnake, *Crotalus Viridis Helli*." *Toxicon* 16, no. 5 (1978): 431-41.

MANCIN, A. C., A. M. SOARES, S. H. ANDRILAO-ESCARSO, V. M. FACA, L. J. GREENE, S. ZUCCOLOTTO, I. R. PELA, AND J. R. GIGLIO. "The Analgesic Activity of Crotamine, a Neurotoxin from *Crotalus Durissus Terrificus* (South American Rattlesnake) Venom: A Biochemical and Pharmacological Study." *Toxicon* 36, no. 12 (1998): 1927-37.

MARUYAMA, J., H. HAYASHI, J. MIAO, H. SAWADA, AND S. ARAKI. "Severe Cell Fragmentation in the Endothelial Cell Apoptosis Induced by Snake Apoptosis Toxin Vap1 Is an Apoptotic Characteristic Controlled by Caspases." *Toxicon* 46, no. 1 (2005): 1-6.

MATAVEL, A. C., D. L. FERREIRA-ALVES, P. S. BEIRAO, AND J. S. CRUZ. "Tension Generation and Increase in Voltage-Activated Na⁺ Current by Crotamine." *Eur J Pharmacol* 348, no. 2-3 (1998): 167-73.

MCGAUGH, J. L. "Memory--a Century of Consolidation." *Science* 287, no. 5451 (2000): 248-51.

MCGAUGH, J. L. "The Amygdala Modulates the Consolidation of Memories of Emotionally Arousing Experiences." *Annu Rev Neurosci* 27, (2004): 1-28.

MCGAUGH, J. L. "Emotional Arousal and Enhanced Amygdala Activity: New Evidence for the Old Perseveration-Consolidation Hypothesis." *Learn Mem* 12, no. 2 (2005): 77-9.

MEDINA, J. H., BEKINSCHTEIN, P., CAMMAROTA, M., AND IZQUIERDO, I. "Do Memories Consolidate to Persist or Do They Persist to Consolidate?" *Behav Brain Res* 192, no. 1 (2008): 61-9.

MEMO, M., C. MISSALE, L. TRIVELLI, AND P. F. SPANO. "Acute Scopolamine Treatment Decreases Dopamine Metabolism in Rat Hippocampus and Frontal Cortex." *Eur J Pharmacol* 149, no. 3 (1988): 367-70.

MUNERA, A., A. GRUART, M. D. MUNOZ, AND J. M. DELGADO-GARCIA. "Scopolamine Impairs Information Processing in the Hippocampus and Performance of a Learned Eyeblink Response in Alert Cats." *Neurosci Lett* 292, no. 1 (2000): 33-6.

MYHRER, T. "Neurotransmitter Systems Involved in Learning and Memory in the Rat: A Meta-Analysis Based on Studies of Four Behavioral Tasks." *Brain Res Brain Res Rev* 41, no. 2-3 (2003): 268-87.

NADEL, L., A. SAMSONOVICH, L. RYAN, AND M. MOSCOVITCH. "Multiple Trace Theory of Human Memory: Computational, Neuroimaging, and Neuropsychological Results." *Hippocampus* 10, no. 4 (2000): 352-68.

NICASTRO, G., L. FRANZONI, C. DE CHIARA, A. C. MANCIN, J. R. GIGLIO, AND A. SPISNI. "Solution Structure of Crostamine, a Na⁺ Channel Affecting Toxin from *Crotalus Durissus Terrificus* Venom." *Eur J Biochem* 270, no. 9 (2003): 1969-79.

NOGUEIRA, R. M. B.; SAKATE, M. Acidente crotalico em animais domesticos. *Revista Conselho federal de medicina veterinária*. (2004) 10:31.

OGUIURA, N., M. BONI-MITAKE, AND G. RADIS-BAPTISTA. "New View on Crostamine, a Small Basic Polypeptide Myotoxin from South American Rattlesnake Venom." *Toxicon* 46, no. 4 (2005): 363-70.

OKAMOTO, M., L. J. VISKATIS, G. DE LA ROZA, AND J. C. VIDAL. "Induction of Tolerance to Crotoxin in Mice." *J Pharmacol Exp Ther* 265, no. 1 (1993): 41-6.

OWNBY, C. L., S. D. AIRD, AND KAISER, II. "Physiological and Immunological Properties of Small Myotoxins from the Venom of the Midget Faded Rattlesnake (*Crotalus Viridis Concolor*)." *Toxicon* 26, no. 3 (1988): 319-23.

PARFITT, G. M., R. C. CAMPOS, A. K. BARBOSA, A. P. KOTH, AND D. M. BARROS. "Participation of Hippocampal Cholinergic System in Memory Persistence for Inhibitory Avoidance in Rats." *Neurobiol Learn Mem* 97, no. 2 (2012): 183-8.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates (2nd ed.). San Diego: Academic Press, 1986.

PELLOW, S., P. CHOPIN, S. E. FILE, AND M. BRILEY. "Validation of Open:Closed Arm Entries in an Elevated Plus-Maze as a Measure of Anxiety in the Rat." *J Neurosci Methods* 14, no. 3 (1985): 149-67.

PERERIRA, A. Toxicidade seletiva da crotamina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre as células indutoras de Tumores. Alexandre Pereira. - São Paulo, (2011).

PUIG, J., M. VILAFRANCA, A. FONT, J. CLOSA, M. PUMAROLA, AND J. MASCORT. "Acute Intrinsic Renal Failure and Blood Coagulation Disorders after a Snakebite in a Dog." *J Small Anim Pract* 36, no. 7 (1995): 333-6.

QIAN-SHENG Y, HAROLD WH, WEIMING L, DEBOMOY KL, ARNOLD B, NIGEL H. Long-acting anticholinesterases for myasthenia gravis: synthesis and activities of quaternary phenylcarbammates of neostigmine, pyridostigmine and physostigmine. *Bioorg Med Chem* (2010);18:4687–4693.

REZAYOF, A., P. HABIBI, AND M. R. ZARRINDAST. "Involvement of Dopaminergic and Glutamatergic Systems of the Basolateral Amygdala in Amnesia Induced by the Stimulation of Dorsal Hippocampal Cannabinoid Receptors." *Neuroscience* 175, (2011): 118-26.

RIZZI, C. T., J. L. CARVALHO-DE-SOUZA, E. SCHIAVON, A. C. CASSOLA, E. WANKE, AND L. R. TRONCONE. "Crotamine Inhibits Preferentially Fast-Twitching Muscles but Is Inactive on Sodium Channels." *Toxicon* 50, no. 4 (2007): 553-62.

ROBINSON, L., B. PLATT, AND G. RIEDEL. "Involvement of the Cholinergic System in Conditioning and Perceptual Memory." *Behav Brain Res* 221, no. 2 (2011): 443-65.

ROODETED AR, DOLAB JA, SEGRE L. Fisiopatología Y diagnóstico Del ataque por serpientes venenosas. Una breve actualización. (1996) 77: 64-71.

ROSENFELD G, KELEN EMA, NUDEL F. Hemolytic activity of animal venoms. I. Classification in different types and activities. *Mem Inst Butantan.* (1960-62) 30:103-16.

ROSSATO, J. I., L. R. BEVILAQUA, I. IZQUIERDO, J. H. MEDINA, AND M. CAMMAROTA. "Dopamine Controls Persistence of Long-Term Memory Storage." *Science* 325, no. 5943 (2009): 1017-20.

RUFF, R. L., AND V. A. LENNON. "End-Plate Voltage-Gated Sodium Channels Are Lost in Clinical and Experimental Myasthenia Gravis." *Ann Neurol* 43, no. 3 (1998): 370-9.

SCHENBERG, S. "Geographical Pattern of Crotonamine Distribution in the Same Rattlesnake Subspecies." *Science* 129, no. 3359 (1959): 1361-3.

SQUIRE, L. R. "Memory and the Hippocampus: A Synthesis from Findings with Rats, Monkeys, and Humans." *Psychol Rev* 99, no. 2 (1992): 195-231.

SQUIRE, L. R., AND S. M. ZOLA. "Structure and Function of Declarative and Nondeclarative Memory Systems." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, no. 24 (1996): 13515-22.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. *Memória: da mente às moléculas*, Porto Alegre, Artmed Editora S.A, 2003.

VITAL BRAZIL O. Neurotoxins from the South American Rattlesnake.Venom J Formos Med Assoc. 1972; 71: 294-400.

XU, Y., J. YAN, P. ZHOU, J. LI, H. GAO, Y. XIA, AND Q. WANG. "Neurotransmitter Receptors and Cognitive Dysfunction in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease." *Prog Neurobiol* 97, no. 1 (2012): 1-13.**ANEXOS**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

Data: 15 de Abril de 2013

PROTOCOLO N° 044/2012

Pesquisador: PÂMELA BILLIG MELLO CARPES

Campus: Uruguiana

Telefone: : (55)96612454

Título: EFEITOS DA CROTAMINA SOBRE A CONSOLIDAÇÃO E PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA AVERSIVA

E-mail: pamelacarpes@unipampa.edu.br

Após a análise detalhada do projeto de pesquisa revisado a relatoria da CEUA-Unipampa emite parecer **FAVORÁVEL** para o cadastro do protocolo e execução deste.

Luiz E. Henkes
Professor Adjunto
Coordenador do CEUA/Unipampa