

Leila Miguel Stávale

ENVOLVIMENTO DA AQP 4 NO ENVENENAMENTO POR
Phoneutria nigriventer

INVOLVEMENT OF AQP4 IN *Phoneutria nigriventer*
ENVENOMATION

Campinas, 2013

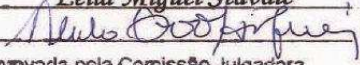


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LEILA MIGUEL STÁVALE

**“Envolvimento da AQP4 no envenenamento por
Phoneutria nigriventer”**

*"Involvement of AQP4 in Phoneutria nigriventer
envenomation"*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Leila Miguel Stávale

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
da UNICAMP para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na
área de Histologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Hofling

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA
POR MARA JANAINA DE OLIVEIRA -
CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA -
UNICAMP

St29e	<p>Stávale, Leila Miguel, 1985- Envolvimento da AQP4 no envenenamento por <i>Phoneutria nigriventer</i> / Leila Miguel Stávale. - Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Maria Alice da Cruz Höfling. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Sistema nervoso central. 2. Aranha. 3. Aquaporinas. 4. Astrócitos. 5. Edema. I. Cruz- Höfling, Maria Alice da, 1944-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Involvement of AQP4 in *Phoneutria nigriventer* envenomation

Palavras-chave em Inglês:

Aquaporin

Astrocytes

Central nervous system

Edema

Spider

Área de concentração: Histologia

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Alice da Cruz Höfling

[Orientador] Rosana Ferrari

Yara Cury

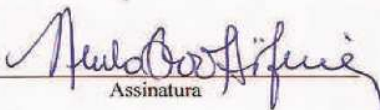
Data da defesa: 01-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

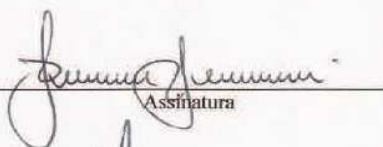
Campinas, 1 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

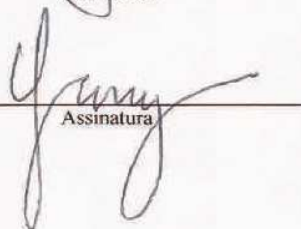
Dra. Maria Alice da Cruz Hofling (Orientadora)


Assinatura

Dra. Rosana Ferrari


Assinatura

Dra. Yara Cury


Assinatura

Dr. Stephen Hyslop

Assinatura

Dra. Thalita Rocha

Assinatura

Dedico este trabalho aos meus pais, Maurício Stávale e Márcia de Lourdes Miguel Stávale, por todo amor e confiança que sempre depositaram em mim, e aos meus avós paternos Hélio Stávale (in memorian) e Lygia Stávale (in memorian) e maternos José Ribeiro Miguel (in memorian) e Aparecida Vellardi Miguel (in memorian) que mesmo ausentes fisicamente acredito que nunca deixaram de estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Profª Dra Maria Alice da Cruz Höfling por toda paciência, incentivo, ensinamentos e, principalmente, por acreditar em minha capacidade crítica e intelectual.

Aos meus pais, Maurício Stávale e Márcia de Lourdes Miguel Stávale, pelo amor e apoio incondicionais. Ser sua filha é a maior bênção da minha vida.

À minha irmã Thaís Helena Miguel Stávale que, mesmo ao seu modo, sempre me protegeu, amou e esteve ao meu lado.

Às minhas colegas de laboratório, Edilene Siqueira Soares e Monique Culturato Padilha Mendonça, pela parceria, auxílio, risadas e palavras amigas.

Às minhas amigas Andressa Coope, Emerielle Cristina Vanzela e Elisa Tebaldi que me acolheram, dividiram suas vidas e uma casa comigo e se tornaram irmãs de coração. Seus conselhos, amizade e carinho foram muito importantes em todos os momentos.

Aos meus amigos Cynthia Renata de Oliveira Jacob, Hellen Maria Soares, Wagner Paschoal de Andrade Antônio, Jéssica Bianconi, Paula de Melo Bacci e Marília Amaral Costa Frangiotti que mesmo distantes sempre foram meu porto seguro.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho: Catarina Rapôso, Rosana Ferrari, Sílvia Pierre, Stephanie S. M. Federighi, Líliam Panagio, professores, colegas e funcionários do Deptº de Histologia e Embriologia e da PG em Biologia Celular e Estrutural.

Ao Prof. Dr. Lício A. Veloso pela autorização ao uso de seu laboratório e ao Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis e Instituto Butantan pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* concedido.

A Proex/Capes, Capes, CNPq, Faepex/Unicamp e Fapesp pelas bolsas de auxílio concedidas.

*"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo viu."
(Arthur Schopenhauer)*

RESUMO

O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (PNV), também conhecida como aranha armadeira, é uma mistura complexa de peptídeos com ação neurotóxica em alguns canais iônicos. No sistema nervoso central (SNC) alguns peptídeos do PNV causam permeabilização da barreira hematoencefálica (BHE) e interferem na liberação de neurotransmissores. A BHE, embora essencial para a manutenção da homeostase do SNC, pode representar uma barreira muito restritiva para o acesso de drogas terapêuticas ao microambiente neural. O entendimento dos mecanismos associados à disfunção da BHE é relevante do ponto de vista científico e médico. O objetivo do estudo foi investigar alguns mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do veneno da *Phoneutria nigriventer* em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). Para esse fim, o efeito vasogênico causado pela neurotoxicidade do veneno no cérebro, foi examinado através da avaliação da expressão de aquaporina 4 (AQP4), uma proteína formadora dos canais de água e abundantemente localizada nos pés astrocitários perivasculares e relacionada com o aparecimento de edema no cérebro. A análise da expressão da proteína foi feita por imunohistoquímica e *western blotting* e a expressão de RNAm por PCR em tempo real no cerebelo e hipocampo de animais neonatos (14 dias) e adultos (8 semanas). Os resultados obtidos mostraram aumento da expressão de AQP4 e seu RNAm nos animais envenenados, que entretanto foi variável em função do tempo de envenenamento (2, 5 ou 24 h), da região do cerebelo ou hipocampo examinada e da idade dos animais. Os resultados mostraram também intensa marcação anti-AQP4 ao redor de vasos com edema perivascular ou não, como também entre os corpos neuronais e seus prolongamentos. Concluímos que a AQP4 tem papel nas alterações de volume dos astrócitos perivasculares e na formação e resolução do edema ao redor da BHE causado pelo PNV. A dinâmica da expressão da AQP4 no cerebelo e hipocampo em função do tempo, região e idade dos animais sugere a existência de fatores intrínsecos que modulam diferencialmente a funcionalidade da BHE em função do microambiente local. A compreensão dos mecanismos envolvidos no envenenamento por PNV pode contribuir para o desenvolvimento de ferramentas úteis para a intervenção clínica, bem como pode ser relevante para o entendimento dos mecanismos relacionados ao funcionamento da BHE e de proteínas envolvidas na formação de canais de água, como a AQP4.

ABSTRACT

The *Phoneutria nigriventer* spider venom (PNV), also known as armed-spider, is a complex mixture of ion channels-acting peptides which exhibit neurotoxic action. In the central nervous system (CNS), PNV-containing peptides cause permeabilization of the blood-brain barrier (BBB) and interfere with neurotransmitter release. The BBB, although essential for the maintenance of homeostasis of the CNS, may represent a very restrictive barrier for the access of therapeutic drugs into the neural microenvironment. The understanding of BBB impairment-associated mechanisms are of scientific and medical importance. The aim of this study was to investigate some of the mechanisms involved in the neurotoxicity caused by *Phoneutria nigriventer* venom in Wistar rats (*Rattus norvegicus*). To this end, the vasogenic effect caused by the venom neurotoxicity in the brain was examined by evaluating the expression of aquaporin 4 (AQP4), a water channel forming protein abundantly expressed in perivascular astrocytic endfeet processes and associated to the formation and resolution of edema in the brain. The analysis of AQP4 expression was assessed in the cerebellum and hippocampus of neonate (14 day-old) and adult rats (8 week-old) through immunohistochemistry and western blotting, and the expression of mRNA by Real Time-PCR. The results showed increases of AQP4 expression and its mRNA in the envenomed animals, which though showed time- (2, 5 or 24h), regional- (regions of the cerebellum and hippocampus examined) and age-associated differences. Marked anti-AQP4 labeling was found around vessels with or without edema and among the neuron bodies and their processes. We conclude that AQP4 has a role in the volume alterations of the perivascular astrocytes and in the formation and resolution of edema around the BBB induced by PNV. The variability of the dynamics of AQP4 expression in the cerebellum and hippocampus in function of the time, region and animals age suggests the existence of intrinsic factors that modulate the BBB functionality depending on the molecular biology dynamics of the local microenvironment. The understanding of the mechanisms involved in the envenomation by *PNV* can contribute to the development of useful tools for clinical intervention, and may be relevant for understanding the mechanisms related to the functioning of the BBB and proteins involved in the formation of water channels, such as AQP4.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xi
1. Introdução	
1.1 <i>Phoneutria nigriventer</i>	1
1.2 Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i>	2
1.3 Barreira Hematoencefálica.....	4
1.4 Astrócitos.....	6
1.5 Canais de água.....	8
1.6 Aquaporina 4.....	10
1.7 Cerebelo.....	13
1.8 Hipocampo.....	15
2. Hipótese	17
3. Justificativa	19
4. Objetivos	21
5. Materiais e Métodos	
5.1 Animais e Veneno.....	23
5.2 Exposição ao veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i>	23
5.3 Imunohistoquímica.....	23
5.4 Western Blotting.....	24
5.5 PCR em tempo real.....	25
5.6 Análise das imagens.....	25
5.6.1 Imunohistoquímica.....	26
5.6.2 Western Blotting.....	26
5.6.3 PCR em tempo real.....	26
5.7 Estatística.....	26
6. Resultados	
6.1 Cerebelo.....	29
6.1.1 Imunohistoquímica.....	29
6.1.1.1 Substância branca.....	29
6.1.1.2 Camada granular.....	32
6.1.1.3 Camada molecular.....	34
6.1.1.4 Camada de Purkinje.....	36
6.1.2 Western Blotting e PCR em tempo real.....	38
6.2 Hipocampo.....	40
6.2.1 Imunohistoquímica.....	40

6.2.1.1 Camada CA1.....	40
6.2.1.2 Camada CA2.....	43
6.2.1.3 Camada CA3.....	45
6.2.1.4 Giro Denteado.....	47
6.2.2 Western Blotting.....	49
6.2.3 PCR em tempo real.....	51
7. Discussão	
7.1 Cerebelo.....	53
7.1.1 Imunohistoquímica.....	53
7.1.2 Western Blotting e PCR em tempo real.....	58
7.2 Hipocampo.....	62
7.2.1 Imunohistoquímica.....	62
7.2.2 Western Blotting e PCR em tempo real.....	64
8. Conclusões.....	69
9. Referências bibliográficas.....	71
10. Anexos	
10.1 Certificado CEUA/UNICAMP.....	85
10.2 Artigo 1.....	87
10.3 Artigo 2.....	97

Lista de abreviaturas

AQP4 - Aquaporina 4

BHE - Barreira Hematoencefálica

CG - Camada granular

CM - Camada molecular

CP - Camada de Purkinje

GD - Giro denteado

GFAP - Proteína Fibrilar Glial Ácida

GLT-1 - Transportador de glutamato - 1

Kir4.1 - Canal retificador de potássio

PNV - *Phoneutria nigriventer* venom

SB - Substância branca

SNC - Sistema Nervoso Central

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Phoneutria nigriventer*

As aranhas do gênero *Phoneutria* pertencem à família Ctenidae, que possui um total de 40 gêneros e 468 espécies identificadas morfologicamente (Platnick, 2012). Cinco espécies foram descritas para este gênero: *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891); *P. fera* Perty, 1833; *P. bahiensis* sp, *P. boliviensis* (Frederick Octavius Pickard-Cambridge, 1897) e *P. reidyi* (Frederick Octavius Pickard-Cambridge, 1897) (Simó & Brescovit, 2001). Todas essas aranhas podem ser encontradas no Brasil e localizam-se na região Amazônica e Estados do Centro-Oeste, Sudeste e Sul do território brasileiro (Lucas, 1988).

A *P. nigriventer* é comumente conhecida como “armadeira” pelo fato de levantar as patas dianteiras e os palpos, além de abrir as quelíceras, como forma de defesa ao se sentir ameaçada (Figura 1). Diferentemente de outras aranhas venenosas, como as do gênero *Loxosceles* e *Latrodectus*, essa aranha não foge quando é surpreendida e é bastante ágil, o que caracteriza sua natureza agressiva (Lucas, 1988).



Figura 1 - *P. nigriventer* em posição de ataque. Retirado de www.washington.edu

A aranha *P. nigriventer* mede, em média, três centímetros de corpo e até 15 centímetros de envergadura de patas quando adulta. Possui hábitos solitários, não constrói teia e têm coloração marrom-acinzentada com manchas claras formando pares no dorso do abdome. Conhecida também por aranha de bananeira por preferir plantações desse fruto, seu habitat pode incluir troncos, folhagens densas, bromélias, montes de lenha ou materiais de construção empilhados,

demonstrando que ambientes escuros são sua prioridade. Por viverem próximas de residências humanas e caçarem à noite, os maiores acidentes com *P. nigriventer* ocorrem dentro das casas ou em seus arredores, principalmente durante o período de acasalamento (meses de março e abril na região Sudeste do país), quando se tornam mais ativas (Lucas, 1988; Schenberg & Pereira-Lima, 1971).

Acidentes com humanos são frequentes, porém são raros os fatais (Bucarechi et al., 2000). Nos últimos anos, mais de 5400 casos de acidentes com *Phoneutria* foram reportados ao Ministério da Saúde do Brasil, ao contrário de outros gêneros como *Latrodectus*, onde foram notificados apenas 146 casos, comprovando a natureza mais agressiva daquela aranha (SINAN/SVS, Ministério da Saúde do Brasil).

1.2 Veneno de P. nigriventer

Em 1925, Brazil & Velard foram os pioneiros a relatar os sintomas provenientes de envenenamento por *P. nigriventer* e concluíram que sua ação era neurotóxica ao observar pacientes acometidos pela picada dessa aranha e em animais submetidos a experimentos com o veneno da mesma.

Diniz (1963) e Schenberg & Pereira Lima (1971) fizeram a separação inicial de proteínas presentes no veneno de *P. nigriventer* para caracterizar as substâncias ativas e sua ação sobre o sistema nervoso, após injeção intracerebral ou sistêmica em ratos e camundongos.

Rezende e colaboradores (1991) realizaram o fracionamento do PNV (*Phoneutria nigriventer* venom), separando-o em três frações: PhTx1, PhTx2 e PhTx3. Estas possuem similaridades com venenos de outros animais, como a presença de cisteínas e peso molecular. Diversas manifestações clínicas foram observadas em camundongos envenenados por meio de injeção intracerebral-ventricular, mas os sintomas variaram de acordo com a fração injetada. A administração de PhTx1 causou paralisia espática dos membros posteriores e elevação da cauda. Já a PhTx2 promoveu salivação, priapismo, paralisia espática dos membros anteriores e posteriores, convulsão, além de contração lenta do músculo liso de vasos e do íleo. A PhTx3 acarretou paralisia flácida em todos os membros do animal, por um grande período (acima de 24 horas).

Figueiredo e colaboradores (1995) descobriram uma quarta fração do veneno (PhTx4) utilizando os mesmos métodos de Rezende e colaboradores (1991). Sua ação neurotóxica foi mais efetiva em insetos do que em camundongos, sendo que aqueles apresentaram salivação, tremores intensos e espasmos dos membros do corpo. Mafra e colaboradores (1999) encontraram evidências de que o PhTx4 inibe a captação de glutamato em sinaptossomas de cérebro de ratos mas não se sabe de que maneira esse bloqueio ocorre, já que há diferentes isoformas de transportadores nos terminais pré-sinápticos.

Através da repurificação das frações encontradas (PhTx1, 2, 3, 4), foi possível isolar as neurotoxinas presentes, tais como Tx1, Tx2-1, Tx3-1, comprovando suas ações em canais iônicos de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ e receptores químicos de membranas excitáveis do sistema neuro-muscular de insetos e mamíferos, causando distúrbios no sistema nervoso central (SNC), periférico (SNP) e autônomo (SNA) (Cruz-Höfling et al., 1985; Fontana & Vital Brazil, 1985; Prado et al., 1996; Miranda et al., 1998; Figueiredo et al., 2001; Le Sueur et al., 2003, 2004). Em 2008, Nunes e colaboradores verificaram que a toxina Tx2-6 pode provocar priapismo e promover a liberação de óxido nítrico no tecido cavernoso de ratos normais e hipertensos.

Em camundongos, a ação do PNV no SNP foi mostrada por meio da injeção intra-muscular ou intra-neural do veneno, levando à paralisia espática dos membros posteriores, potenciais repetitivos da placa terminal, aumento da amplitude e frequência dos potenciais de placa em miniatura e redução dos potenciais de ação do músculo. Além disso, causou alterações morfológicas nos nodos de Ranvier dos axônios mielínicos compatíveis com mudança na homeostase hidroeletrolítica nodal. Essas alterações fisiológicas e morfológicas foram abolidas pelo pré-tratamento com TTX, um bloqueador de canais de Na⁺, indicando a ação ativadora de canais de sódio por componentes do PNV (Cruz-Höfling et al., 1985; Love & Cruz-Höfling, 1986; Love et al., 1986).

Estudos demonstraram a ação central do PNV, uma vez que a injeção intravascular do mesmo causa rompimento da barreira hematoencefálica (BHE), como pode ser visto pelo extravasamento de um traçador extracelular injetado 30 min antes do sacrifício do animal (Le Sueur et al., 2003, 2004). A ação central do PNV foi reiterada pela demonstração de que após o envenenamento há ativação neuronal em áreas relacionadas à motricidade e em áreas relacionadas a estresse agudo (Cruz-Höfling et al., 2007), provoca gliose astrocitária e neuroinflamação (Cruz-Höfling et al., 2009). Além disso, induz edema vasogênico, com inchaço importante dos pés astrocitários peri-

vasculares, indicando que alterações osmóticas também ocorrem nessas células gliais (Le Sueur et al., 2003; Rapôso et al. 2007), como ocorreram no SNP (Love & Cruz-Höfling, 1986; Love et al., 1986).

1.3 Barreira Hematoencefálica (BHE)

A BHE constitui uma estrutura física bem definida, responsável pela regulação da passagem de substâncias entre os capilares sanguíneos e o cérebro, sendo essencial para a manutenção da homeostase do SNC. Possui características plásticas, sendo capaz de responder prontamente a alterações sistêmicas na interface sangue-cérebro (Huber et al., 2001). Também tem a função de transportar seletivamente compostos necessários ao cérebro, detectar alterações na composição do sangue e comunicá-las ao cérebro e metabolizar componentes presentes nos compartimentos sangue-cérebro (Gloor et al., 2001). Por fim, a função de neuroproteção é bem desenvolvida pela BHE, já que impede que substâncias tóxicas entrem no cérebro e retira aquelas que possam ser prejudiciais ao seu funcionamento, além de evitar, com isso, a morte de neurônios cuja reposição é extremamente restrita (Begley, 2004).

A BHE é facilmente detectada em qualquer região cerebral comandada pelo SNC, mas está ausente naquelas reguladas pelo SNA e por glândulas endócrinas do corpo (Ballabh et al., 2004). Sua base estrutural é a interação entre a membrana basal formada por proteínas e proteoglicanos derivados da matriz extracelular e capilares sanguíneos contínuos e sem fenestrações, pés astrocitários e pericitos (Figura 2).

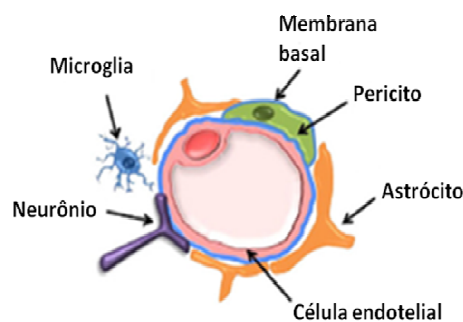


Figura 2 – Componentes da BHE. Adaptado de Abbott, 2010.

Diferentemente dos capilares periféricos, as células endoteliais de revestimento dos capilares cerebrais apresentam receptores e carreadores, além de um relevante número de junções intercelulares, principalmente as conhecidas como "junções de oclusão" e "zônulas de adesão" (Rubin & Staddon, 1999). As junções intercelulares mantêm as células endoteliais dos vasos sanguíneos estreitamente justapostas e impossibilita o transporte paracelular. Em termos fisiológicos, a impossibilidade de transporte paracelular e a existência de um restrito e altamente seletivo transporte transcelular mediado por receptores na BHE são essenciais para promover a homeostase típica do ambiente cerebral, que é a chave para o desempenho normal das funções neuronais (Abbott et al., 2010).

Além do suporte estrutural, os pericitos possuem diferentes funções na BHE, como síntese de componentes da membrana basal, regulação na diferenciação, migração e proliferação de células endoteliais, controle do fluxo sanguíneo e transporte através da barreira, regulação da permeabilidade juncional, além de migrarem por pequenos vasos cerebrais em resposta às injúrias dessa região (Cardoso et al., 2010).

Há várias rotas de transporte através da BHE, sendo inibida a via paracelular devido a presença de junções de oclusão e de aderência e mais ativa a transcelular. Pequenos solutos não polares e lipídios são capazes de atravessar a barreira por difusão passiva, mas para ocorrer a entrada e saída de outras substâncias como glicose, aminoácidos, nucleosídeos e íons se faz necessário a presença de carreadores de influxo e efluxo que são altamente seletivos e precisam de ATP para realizar esse transporte transcelular (Abbott et al., 2010).

Danos a qualquer componente da barreira promovem sua permeabilidade, pois seus elementos estão intimamente conectados. Carvey e colaboradores (2009) mostraram que a interrupção da membrana basal promove diversas alterações no citoesqueleto de células endoteliais e essas, por sua vez, podem afetar as proteínas que formam as junções de oclusão, o que levaria a uma permeabilidade na BHE. Já Nishioku e colaboradores (2009) mostraram que o distanciamento dos pericitos provoca uma quebra na barreira e, conseqüentemente, um aumento na passagem de substâncias pela via paracelular.

Trabalhos anteriores demonstraram que a quebra da BHE após injeção endovenosa do veneno de *P. nigriventer* ocorria por aumento do transporte de vesículas de pinocitose e que o transporte transendotelial mediado por microtúbulos era uma das vias que levaram à ruptura da BHE por ação sistêmica do veneno de *P. nigriventer* (Le Sueur et al., 2004).

Diversos experimentos que utilizaram o modelo experimental de rompimento da BHE por PNV forneceram novas evidências sobre o papel da barreira no SNC. Cruz-Höfling e colaboradores (2007) demonstraram que há envolvimento neuronal de áreas motoras e relacionadas ao estresse, além de ativação de nNOS e cFOS em animais envenenados por PNV; Rapôso e colaboradores (2007) mostraram a presença de edemas vasogênicos e extravasamento de traçador no hipocampo e cerebelo, além de inchaço nos pés astrocitários perivasculares do cerebelo e perda da membrana basal após degradação da laminina; Cruz-Höfling e colaboradores (2009) evidenciaram alteração na expressão das proteínas GFAP e S100 (marcadores astrocitários), IFN- γ e TNF- α (citocinas pró-inflamatórias) no hipocampo e cerebelo após injeção intravenosa do PNV; Rapôso e colaboradores (2012) demonstraram diminuição na expressão de proteínas da membrana basal e juncionais após envenenamento por PNV, além de inibição na atividade da P-gp em astrócitos, sugerindo interrupção no transporte paracelular na BHE e ativação de transportadores de efluxo P-gp localizados na BHE; Mendonça e colaboradores (2012) mostraram um aumento no receptor Flt-1 do VEGF em neurônios das regiões hipocâmpais em animais adultos e edemas perivasculares em neonatos após injeção intraperitoneal de PNV, inferindo que o VEGF confere neuroproteção nos adultos e tem papel pró-inflamatório nos jovens.

1.4 Astrócitos

Os astrócitos são os mais abundantes dentre as células da glia, apresentando uma população celular homogênea no tecido nervoso. Possuem prolongamentos citoplasmáticos constituídos de filamentos intermediários compostos pela proteína GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial), um marcador astrocitário cuja expressão é aumentada em situações diversas de injúria ao SNC. Sua ação no organismo foi estabelecida a partir de observações em lesões cerebrais que desencadeiam um processo denominado astrogliose, promotor de mudanças moleculares, funcionais e celulares nos astrócitos, como alterações na expressão molecular, hipertrofia celular e formação de cicatrizes cerebrais. Suas funções estão relacionadas à manutenção do espaço extracelular, onde fornece os substratos necessários para os neurônios, além de atuar na plasticidade sináptica, liberação de neurotransmissores (glutamato, glicina, GABA) e fluxo sanguíneo (Wang & Bordey, 2008). São divididos de acordo com as suas localizações anatômica e morfológica em

protoplasmáticos e fibrosos, sendo que ambos possuem conexões com vasos sanguíneos. Os protoplasmáticos são encontrados em toda substância cinzenta e apresentam muitas ramificações envolvendo sinapses, enquanto os fibrosos são vistos na substância branca com várias fibras alongadas e finas ao redor dos nodos de Ranvier (Sofroniew & Vinters, 2009; Wang & Bordey, 2008).

O papel dos astrócitos como suporte metabólico e estrutural dos neurônios é conhecido desde o início do século passado. Essas células apresentam atividades relacionadas à manutenção da homeostase da água, fluidos, pH e níveis de íons, como K^+ , além de participarem ativamente na formação da barreira hematoencefálica no SNC (Gee & Keller, 2005; Sofroniew & Vinters, 2009; Wang & Bordey, 2008). Possuem a capacidade de prover grande quantidade de proteínas da matriz extracelular e moléculas de adesão do SNC. Devido à sua localização estratégica entre os neurônios e capilares (Figura 3), podem monitorar e controlar o nível de atividade sináptica e, em função desta, fornecer metabólitos energéticos aos neurônios e remover excesso de neurotransmissor decorrente de atividade aumentada dos neurônios (Wang & Bordey, 2008). Igualmente, a regulação pelos astrócitos do equilíbrio de água e eletrólitos é de importância crítica na formação de edema cerebral. Estudos também indicam que astrócitos promovem a expressão de proteínas anti-oxidantes em células endoteliais, uma importante forma de proteção contra danos oxidativos no cérebro (Schroeter et al., 2001).

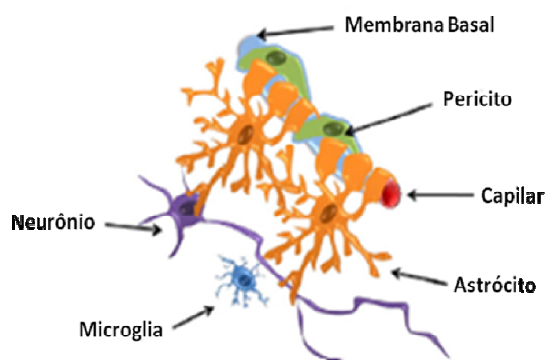


Figura 3 – Astrócitos e células com as quais se comunica.

Adaptado de Cardoso et al., 2010.

Os mecanismos que regulam a permeabilidade dos astrócitos à água possuem ainda muitos pontos obscuros. Por eles interferirem no balanço de água, podem estar relacionados à formação

de edema citotóxico ou vasogênico se estiverem em excesso ou em pequena quantidade no cérebro, respectivamente. Desempenham papel chave os canais de água; estes são poros hidrofílicos constituídos por uma família de proteínas, as aquaporinas (AQP).

1.5 Canais de água

Inúmeros pesquisadores que estudavam a permeabilidade da bicamada lipídica já haviam levantado suspeitas sobre a existência de canais específicos para o transporte de água através da membrana, dada a grande velocidade com que esse fluido se difundia mas não tinham conseguido ainda purificar qualquer proteína que fizesse parte desses canais (Benga, 2012). Isso foi realizado pelo grupo de pesquisa do Professor Peter Agre da Johns Hopkins University em 1991, o que lhe valeu o prêmio Nobel em 2003. Inicialmente, seus estudos estavam focados na identificação molecular do antígeno Rh presente nas células sanguíneas. Ao realizar experimentos para isolar polipeptídeos de 32 kDa de eritrócitos, uma outra proteína de 28 kDa foi identificada na membrana desses glóbulos vermelhos. Investigando mais profundamente essa nova proteína, Agre descobriu sua abundância nessas células (em torno de 200.000 cópias) e seu comportamento como tetrâmero, sugerindo sua participação na formação de canais através da membrana. A partir daí, ela foi localizada também em néfrons (túbulos contorcidos distais e Alça de Henle), mas sem ter sua função totalmente esclarecida (Agre, 2004).

Com o auxílio de um colega, John Parker, que sugeriu a participação da proteína recém-descoberta em canais de água, Agre realizou testes em parceria com Greg Preston para confirmação da nova teoria proposta. O experimento consistia em utilizar ovos de *Xenopus laevis* conhecidos por apresentarem baixa permeabilidade à água e dividí-los em dois grupos: um controle e outro injetado previamente com a proteína de 28kDa. Quando esses ovócitos foram transferidos de um meio isotônico para um meio hipotônico, as células controle não se alteraram, mas as do segundo grupo se tornaram túrgidas e romperam-se rapidamente. Dessa forma, tornou-se claro que essa proteína conferia grande permeabilidade à água e estaria envolvida com canais de água. O nome de aquaporina foi sugerido durante uma apresentação sobre os estudos na Society American Clinical Investigation e oficialmente denominada AQP1 (Preston & Agre, 1991; Preston et al., 1992; Agre, 2004).

Nas duas últimas décadas, novas aquaporinas foram descobertas nas membranas plasmáticas de diversos tecidos de organismos unicelulares (bactérias e protozoários) e pluricelulares (como animais, plantas e ser humano). Em comum, possuem a função de permitir o movimento seletivo e bidirecional de água em resposta ao gradiente osmótico, sem gasto de energia (ATP) (Agre et al., 2002; Borgnia et al., 1999; Verkmann, 2005; Yang et al., 2008). Além disso, todas apresentam uma sequência de aminoácidos Asparagina-Prolina-Alanina (motivo NPA) altamente conservada e estrutura composta por seis domínios transmembrana hidrofóbicos com cinco alças de conexão, onde seus terminais amina e carboxila estão no citosol e apresentam características hidrofílicas (Benga, 2009; Ishibashi et al., 2009, Yool, 2007).

De acordo com Ishibashi e colaboradores (2009), a divisão das 13 aquaporinas em três classes obedeceu a sequência primária apresentada por cada uma. A partir de dados extraídos de ratos, camundongos e seres humanos, foi possível identificá-las nos tecidos nervoso e muscular, além dos sistemas digestório, respiratório, reprodutor, circulatório, urinário e imunitário (estômago, traquéia, ovários, coração, rins e leucócitos) (Benga, 2009; Ishibashi et al., 2009, Yool, 2007). A primeira classe contém as aquaporinas seletivas somente à água, como AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 e 8; no entanto, as AQP6 e 8 são exceções dentro do grupo por contribuírem para o transporte de ânions e radicais livres, respectivamente. A segunda classe é denominada de aquagliceroporinas e sua permeabilidade atinge pequenos solutos neutros e são formadas pelas AQP3, 7, 9 e 10. Por fim, a terceira classe é a das superaquaporinas, composta pelas AQP11 e 12, e há poucos estudos sobre elas até o momento devido a sua recente descoberta. Elas foram encontradas nos testículos e pâncreas, respectivamente, e possuem pequena homologia em comum, mas em nível maior do que entre as outras aquaporinas identificadas anteriormente (Tabela 1) (Ishibashi et al., 2009). A classificação adotada por Ishibashi e colaboradores (2008) foi contestada por Rojek e colaboradores (2008) que alterou o nome das superaquaporinas para aquaporinas não-ortodoxas e acrescentou as AQP6 e 8 nesta classe.

	AQP0	AQP1	AQP2	AQP3	AQP4	AQP5	AQP6	AQP7	AQP8	AQP9	AQP10	AQP11	AQP12
Cérebro	-	+	-	+	++	-	+	-	-	-	-	+	-
Olhos	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Gl. salivar	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Traquéia	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Pulmão	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Coração	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Fígado	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Pâncreas	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Baço	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Trato GI	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Rim	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
Testículo	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	-	++	-
Ovário	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
Músculo	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Leucócito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Eritrócito	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 1 – Tipos de aquaporinas presentes nos tecidos de mamíferos.

Trato GI=Trato Gastrointestinal. (++) Abundante (+) Presença e (-) Ausência.

Adaptado de Ishibashi e colaboradores (2009).

1.6 Aquaporina 4

Em 1994, Hasegawa e colaboradores, clonaram uma aquaporina presente nos pulmões (alvéolos) de ratos e insensível ao mercúrio. Mais tarde denominada de aquaporina 4, os resultados obtidos por esses pesquisadores relataram sua presença em vários outros tecidos como rins (parte ascendente da Alça de Henle), cérebro (células da superfície ventricular e em contato com o espaço subaracnóide e fluido cérebroespinal) e olhos (camada nuclear interna da retina e epitélio conjuntivo), sugerindo sua participação em processos fisiológicos do organismo (concentração da urina, reabsorção do fluido cérebro-espinal e resolução do edema alveolar).

No cérebro, a AQP4 está presente como duas isoformas (M1-AQP4 e M23-AQP4, com 34 kDa e 32 kDa, respectivamente) e regula o transporte rápido de água dentro dos pés terminais dos astrócitos perivascularares, sendo impermeável a ânions e glicerol. Localiza-se em astrócitos, onde estão em íntimo contato com vasos sanguíneos, células endoteliais do cérebro, células endimárias e da superfície pial (Jung et al., 1994; Lu et al., 1996; Nielsen et al., 1997; Nicchia et al., 2004; Yang et al., 1995) (Figura 4). Além disso, essa proteína está intimamente associada com a α -sintrofina, um componente pertencente ao complexo da distrofina que realiza a conexão entre o citoesqueleto do astrócito e a lâmina basal e pode ser encontrada próxima ao canal

retificador de potássio nestas células (Neely et al., 2001). A insensibilidade da AQP4 ao mercúrio difere dos outros canais de água que podem ter suas proteínas bloqueadas por este elemento, mas a presença de chumbo pode aumentar sua permeabilidade, evidenciada pela formação de edema em doentes intoxicados pelo mesmo (Romeiro et al., 2006).

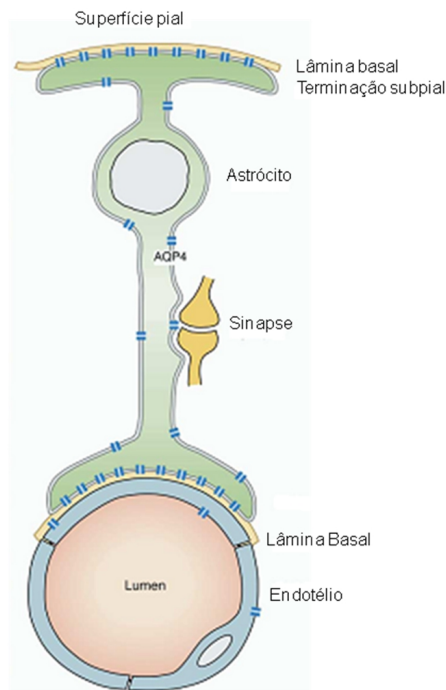


Figura 4 - Distribuição de AQP4 (em traços paralelos azuis) na célula.

Adaptado de Nagelhus et al., 2004.

Experimentos mostraram que a aquaporina 4 está intimamente relacionada com a formação e resolução do edema cerebral. Sua inibição ou ativação podem ser usadas para fins terapêuticos a fim de diminuir a presença de diferentes tipos de edemas, principalmente o citotóxico e vasogênico, onde sua participação foi comprovada em estudos recentes (Manley et al., 2000; Papadopoulos et al., 2004; Wang et al., 2006). O edema citotóxico é causado pelo aumento de água no interior das células, principalmente astrócitos, após algum tipo de injúria, como hipoxia ou isquemia cerebral, sem que haja quebra da BHE. Além disso, há um aumento da permeabilidade celular a sódio e potássio e captação de solutos ativos osmoticamente, fazendo com que o fluido que forma o edema seja composto basicamente de eletrólitos (Unterberg et al., 2009). A ausência ou inibição da AQP4 em animais que sofreram algum desses danos promoveu um inchaço astrocitário menor devido a

baixa quantidade de entrada de água no parênquima cerebral, assim como também aumentou a sobrevivência e diminuiu a perda neuronal quando comparados com animais controle (Manley et al., 2000; Papadopoulos et al., 2004). Esse tipo de edema também é encontrado em pacientes diagnosticados com meningite devido ao aumento da permeabilidade a água causada pela bactéria. A partir disso, experimentos que visavam inibir a AQP4 em animais previamente infectados se mostraram muito promissores ao reduzir a acumulação de fluido no cérebro, aumentar a sobrevivência dos animais tratados e diminuir a pressão intracraniana (Papadopoulos & Verkman, 2007). O edema vasogênico é causado por tumores e doenças vasculares devido a um aumento na quantidade de água no parênquima cerebral através da interrupção da BHE. Diferentemente do citotóxico, a entrada de água e conseqüente formação do edema independe da AQP4, já que não há mais uma barreira que impeça isso e um canal se torna desnecessário neste caso. O fluido resultante é formado de proteínas e não há inchaço celular (Unterberg et al., 2009). A alta regulação de AQP4 nesses casos promove a resolução desse edema ao mover o fluido do espaço extracelular para os astrócitos e destes para os vasos sanguíneos e células gliais do fluido cérebro-espinal (Papadopoulos et al., 2004; Wang et al., 2006) (Figura 5).

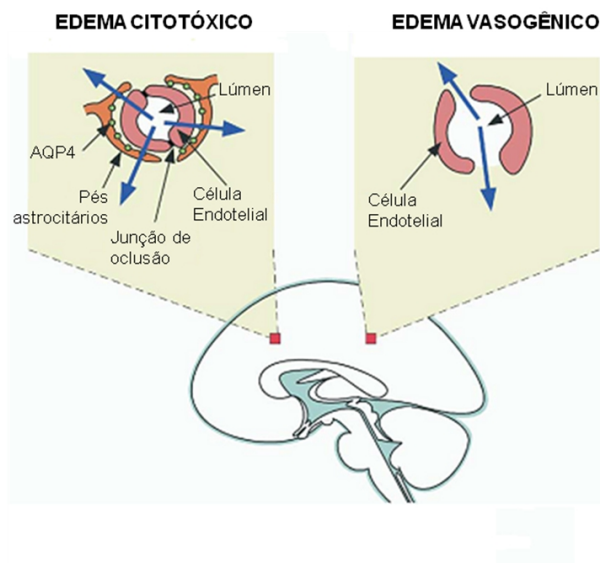


Figura 5 – Tipos de edema presentes no cérebro. O edema citotóxico é dependente de AQP4 para sua formação, ao contrário do edema vasogênico causado pela quebra da BHE. Adaptado de Papadopoulos et al., 2004.

Frigeri e colaboradores (1998) comprovaram a presença de AQP4 nos músculos esqueléticos de contração rápida, onde seria de grande importância para reestabelecer o equilíbrio osmótico através da entrada de água no sarcoplasma de fibras musculares que possuem grandes concentrações de lactato após exercícios intensos. Também foi descoberto que ativadores da proteína quinase C alteraram drasticamente a permeabilidade de tecidos à água na presença de AQP4, demonstrando que esta pode ser regulada, ao contrário do que sugeriam trabalhos anteriores (Han et al., 1998).

Estudos mostraram que há uma co-localização de AQP4 e do canal retificador interno de K^+ (Kir 4.1) nos astrócitos (face voltada à neurópila), demonstrando que essa associação poderia atuar na homeostase do K^+ e no fluxo de água através da membrana plasmática. A retirada/liberação de potássio através dos astrócitos ocorreria de forma concomitante com a captação de água, demonstrando que a AQP4 poderia servir como uma rota de saída para a água, além de favorecer a liberação de K^+ (Zanotto, 2011; Nagelhus et al., 2004).

Em 2008, Gunnarson e colaboradores demonstraram que o glutamato aumenta a permeabilidade do astrócito à água e que o alvo molecular do neurotransmissor é o resíduo serina 111 da AQP4, que encontra-se em posição estratégica para controlar a abertura do canal de água. O efeito do glutamato envolve a ativação do grupo I dos receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), liberação intracelular de Ca^{2+} e ativação da proteína quinase II dependente de cálcio/camodulina (CaMKII) e a óxido nítrico sintase (NOS). O impacto fisiológico desses resultados foi realçado pelo achado de que a ativação dos mGluR aumentava a taxa de distensão hipo-osmótica em fatias hipocámpais de ratos. A isquemia cerebral está associada com liberação excessiva de glutamato, e no edema pós-isquêmico, a remoção da AQP4 atenua o grau de dano cerebral. Estes dados identificam a AQP4 como um alvo importante para a atenuação do edema cerebral. Uma vez que o PNV interfere com liberação do glutamato, essa pode ser uma explicação para as alterações de permeabilidade causada na BHE pela ação do PNV com envolvimento dos astrócitos.

1.7 Cerebelo

O cerebelo é responsável pela coordenação motora e aprendizagem mas também está relacionado com cognição, emoção e comportamento (Timmann et al., 2010). Ele é composto por 4 camadas distintas denominadas substância branca, camadas granular, molecular e Purkinje. A substância branca é formada por astrócitos fibrosos que estabelecem contatos próximos com nós de Ranvier das fibras nervosas mielinizadas; já as outras camadas citadas são compostas por astrócitos protoplasmáticos (Wang & Bordey, 2008).

A camada granular possui muitas células granulares conhecidas por ser a classe mais abundante de neurônios presentes no SNC. Estas células irão dar origem aos axônios denominados de fibras paralelas que ascendem à camada molecular, além de fazerem sinapses com neurônios dos núcleos cerebelares profundos e fibras musgosas (axônios de núcleos pontinos e das demais aferências provenientes do tronco encefálico e medula espinhal) (Purve et al., 2010).

Na camada molecular estão presentes as fibras paralelas que promovem bifurcações e conduzem a informação até as sinapses excitatórias sobre os dendritos das células de Purkinje. Também fazem parte desta camada as células em cesto e estreladas que realizam aferências inibitórias nas células de Purkinje (Purve et al., 2010). Os astrócitos localizados nessa camada compõem a chamada glia de Bergmann, onde há vários receptores N-methyl-D-aspartato (NMDA) para glutamato e a liberação de glutamato pelas fibras paralelas leva à despolarização das células, aumenta o influxo de íons Ca^{2+} e afeta eventos transcricionais e translacionais. Há evidências de que, tanto no SNP como no SNC, o PNV leva a alterações de permeabilidade, como mostrado pelo marcante aumento (em extensão e em largura) dos nodos de Ranvier, pela dilatação dos pés astrocitários peri-vasculares e edema vasogênico após quebra da BHE (Cruz-Höfling et al., 2009). Uma vez que foi demonstrado que o veneno de *P. nigriventer* contém peptídeos neurotóxicos que bloqueiam os canais de Ca^{2+} e inibem a liberação de glutamato (Romano-Silva et al., 1993), é possível que no cerebelo, o edema vasogênico possa ter relação com distúrbios no funcionamento dos canais de Ca^{2+} e desse neurotransmissor.

A camada de Purkinje é composta pelas células de Purkinje cujos dendritos se estendem à camada molecular a partir dos seus corpos celulares neuronais. Elas recebem aferências de grande parte das fibras paralelas e trepadeiras, oriundas de outra camada. Além disso, as células de Purkinje são as únicas eferentes do córtex cerebelar, recebendo eferências inibitórias que modulam os padrões de descarga dos neurônios em resposta às aferências que recebem das fibras citadas acima (Purve et al., 2010) (Figura 6).

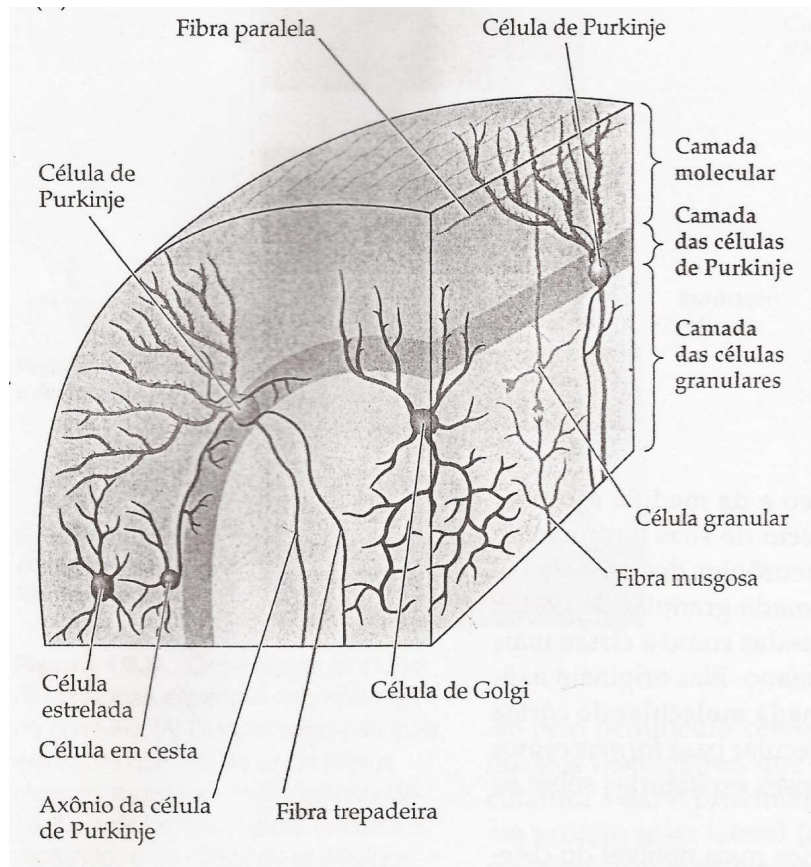


Figura 6 – Representação das camadas do cerebelo e seus constituintes. Adaptado de Purve et al., 2010.

1.8 Hipocampo

O hipocampo faz parte do sistema límbico e está relacionado com memória recente e aprendizagem. Ele é formado por duas regiões interligadas denominadas giro denteado (GD) e o hipocampo propriamente dito (“Corno de Amon”; CA). Essas regiões são compostas pelas células granulares do giro denteado e células piramidais do Corno de Amon (CA) divididas em camadas CA1, CA2 e CA3. Elas realizam sinapses com camadas subjacentes, sendo que a principal aferência para o hipocampo origina-se no córtex entorrinal (CE). As diversas fibras que ascendem nessas camadas formam o circuito CE-GD-CA3-CA1 ou via tri-sináptica e utiliza o glutamato como principal neurotransmissor (Silva, 2009) (Figura 7).

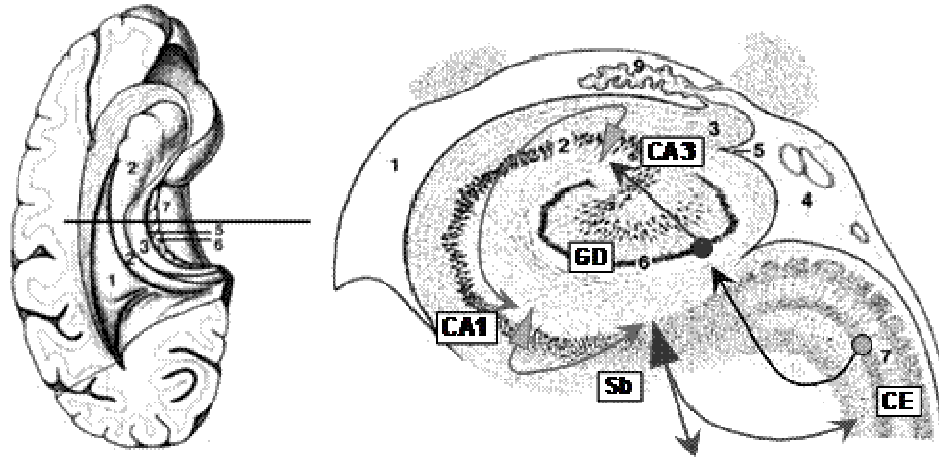


Figura 7 - Representação do hipocampo e suas camadas. 1-ventrículo lateral; 2-hipocampo ou corno de Amon (CA); 3-fímbria; 4-sulco hipocampal; 5-sulco fimbrio-dentado; 6-giro dentado (GD); 7-córtex entorrinal (CE); subículo (Sb). Retirado de http://www.lasse.med.br/mat_didatico/lasse1/textos/alexandre01.html.

2. HIPÓTESE

Estudos anteriores mostraram que a AQP4 forma canais de água e está localizada nos astrócitos, principalmente próxima da superfície pial e endotélio de vasos. Os astrócitos são parte fundamental da BHE e experimentos com PNV mostraram que o veneno promove a quebra dessa barreira e conseqüente formação de edemas. Diante disso, sugerimos que a AQP4 teria participação efetiva na formação dos edemas provenientes do rompimento da BHE após injeção intraperitoneal de PNV em ratos.

3. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho se propôs a aprofundar os conhecimentos relacionados aos mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). Para esse fim, o efeito vasogênico causado pelo veneno no cérebro foi investigado através da avaliação da expressão de AQP4 após 2, 5 e 24 horas de administração do veneno em animais jovens (14 dias) e adultos (8 semanas). A análise do cerebelo e hipocampo, duas regiões que apresentam grande permeabilidade ao PNV, foram utilizadas para o estudo.

4. OBJETIVOS

1. Relacionar temporalmente o aparecimento de edema perivascular em decorrência da administração do veneno de *P. nigriventer* à expressão de aquaporina 4.
2. Verificar os locais de co-localização de AQP4 nos astrócitos através da utilização do marcador astrocitário GFAP.
3. Avaliar diferenças de resposta entre ratos de oito semanas (adultos jovens) e ratos de 14 dias (ainda não desmamados) após 2h, 5h e 24h de envenenamento por PNV.
4. Verificar a ação do PNV no cerebelo e hipocampo e a expressão de AQP4 nesses locais.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais e veneno

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, de 4 semanas de idade, com peso entre 120 e 200 gramas, foram fornecidos pelo Centro Estudos Multidisciplinar para a Investigação Biológica - Unicamp (CEMIB) e alojados no biotério do Departamento de Farmacologia da Unicamp em grupos de 5 por caixa, a 24°C, com 12 horas de claro/escuro e acesso livre à comida e água até atingir 8 semanas de idade. No mínimo 24 horas antes do experimento, os animais foram transportados em gaiolas do lugar de origem até o laboratório para se habituarem. Ratos Wistar machos com 14 dias pós-natal (P14) e peso entre 20 e 30 gramas foram tirados diretamente do CEMIB para o laboratório e experimentos foram realizados no dia seguinte. O PNV foi fornecido liofilizado pelo Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil) e Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis (UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil) e armazenado a -20°C até o uso.

5.2 Exposição ao veneno da *Phoneutria nigriventer*

Uma dose sub-letal de veneno, 1,7 mg/kg (0,5 ml), foi administrada intraperitonealmente (i.p.) em ratos P14 e adultos, enquanto os controles receberam o mesmo volume de salina (0,9% de solução salina estéril) (Mendonça et al., 2012). Os animais foram sacrificados às 2h, 5h e 24h (n = 5/tempo) após o tratamento sob anestesia com 2 µg/mg de peso corporal de uma mistura 3:1 de cloridrato de ketamina (Dopalen®, 100 mg/Kg de peso corporal) e cloreto de xilazina (Anasedan®, 10 mg/kg de peso corporal) (ambos da Fortvale, Valinhos, SP, Brasil) para a Imunohistoquímica. Para o Western Blotting e PCR em tempo real, os ratos foram anestesiados através de inalação de dióxido de carbono (CO₂). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-Unicamp, sem protocolo. 2405-1), que segue as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

5.3 Imunohistoquímica (IHC)

Após a anestesia, os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo, com solução salina (150 ml) seguida de 250 ml de paraformaldeído 4% em 0,1 M de tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4. Os cerebelos e cérebros posteriores foram imediatamente removidos e pós-fixados no mesmo fixador durante a noite. Eles foram então desidratados através de uma série de grades de etanol ascendente, xilol e, por fim, embebidos em parafina (Paraplast®, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Secções de 5 µm de espessura foram postas em lâminas de vidro silanizadas e, após isso, passaram por um processo de desparafinagem através de banhos de xilol e etanol. A peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com 3% de peróxido de hidrogênio contendo PBS (20 min.) A recuperação de epítipo do antígeno foi feita por pré-tratamento das secções com 10 mM de tampão citrato, pH 6,0 a 95-99 °C durante 30 min. As secções foram imunocoradas com anticorpos primários Anti-Aquaporina-4 (1:1000, policlonal de coelho, Sigma-Aldrich) e GFAP (1:100, anticorpo policlonal de coelho, Dako Cytomation, CA, EUA) durante a noite (a 4°C numa câmara umidificada). No dia seguinte (após 16-18 horas de incubação), as lâminas foram lavadas em PBS 0,05 M, e, em seguida, incubadas por 30 min com o anticorpo secundário (EnVision™ ligação HRP, Dako Cytomation). Imunorreatividade foi visualizada através da cor marrom após coloração com diaminobenzidina (DAB) (Dako Cytomation). A contracoloração dos núcleos foi realizada com hematoxilina de Harris e depois de desidratados, os cortes nas lâminas foram protegidos por lamínulas através de montagem em bálsamo do Canadá. Para os controles negativos, o anticorpo primário foi substituído por 1% de PBS-albumina de soro bovino (BSA). Para diminuir as variáveis, todos os cerebelos e cérebros posteriores foram processados simultaneamente, assim como as imuno-histoquímicas de secções de tecido dos animais controle e tratado com PNV.

5.4 Western Blotting (WB)

Após injeção i.p. de solução salina ou PNV, os animais foram anestesiados com dióxido de carbono e os seus cérebros rapidamente removidos e separados em posterior e cerebelo, sendo imediatamente armazenados em nitrogênio líquido. Depois disso, foram descongelados e homogeneizados num Polytron com coquetel anti-protease (10 mM de EDTA, 2 mM de PMSF, 100 mM NaF, 10 mM de pirofosfato de sódio, 10 mM NaVO₄, 10 g de aprotinina/ml e 100 mM de Tris, pH 7,4), o conteúdo centrifugado 3000x g durante 10 min e o sobrenadante recolhido e

armazenado a -70°C . A concentração de proteína foi determinada por um kit de ensaio de proteína de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Bradford - BioRad, Ref 500-0006).

As proteínas foram aplicadas a géis de poliacrilamida a 12% e depois de SDS/PAGE foram colocadas em uma cuba para a realização de eletrotransferência, de modo a separá-las de acordo com o seu peso molecular (AQP4 – 34kDa). Depois, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e bloqueadas em TBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween20 com 5% de leite desnatado durante duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi colocada com o anticorpo primário anti-AQP4 (1:2000, Santa Cruz Biotechnology) diluído em 3% de leite desnatado a 4°C durante 18 horas. Após este período, ela foi lavada com uma solução basal e incubada em anticorpo anti-coelho secundário (1:4000, Santa Cruz Biotechnology), dissolvido em tampão contendo 1% de leite desnatado durante duas horas. A membrana resultante foi revelada em filmes de raios X (Sigma-Aldrich) utilizando um kit de quimioluminescência (Sinal Super, Pierce, Ref CAIS-34 080) durante 2 minutos. Os resultados foram confirmados em três conjuntos de experiências. O WB para β -actina (Sigma-Aldrich) também foi realizado em triplicata para controle interno.

5.5 PCR em tempo real

O RNA total do cerebelo e hipocampo foi extraído separadamente de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando o reagente Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD). O padrão de transcrição reversa do PCR foi realizado utilizando o RNA total como previamente descrito (Hirota & Moro, 2006) e a AQP4 foi medida em todos os grupos (2, 5 e 24h controle e PNV de ratos neonatos e adultos). Um primer específico para AQP4 (TaqManTM) foi obtido da Applied Biosystems e outro de gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) (Applied Biosystems) foi utilizado como controle. As concentrações ótimas de cDNA e primers, assim como a máxima eficiência de amplificação, foram obtidas por meio de cinco pontos com análise da curva de diluição por duas vezes para cada gene. Cada PCR continha 25 ng de RNA transcrito reversamente, 200 nM do primer de AQP4, Master Mix SAFE SYBR PCR e água livre de RNase para formar um volume final de 20 μl .

5.6 Análise das imagens

5.6.1 Imunohistoquímica

Fotomicrografias digitais de cada região do cerebelo (substância branca, camadas granular, molecular e Purkinje, n=3 cada) e hipocampo (CA1, CA2, CA3 e giro denteado, n=2 cada, exceto CA2 com n=1) foram tiradas de 5 ratos replicados por intervalo de tempo (um total de 15 e 10 campos por região de controle e PNV no cerebelo e hipocampo, respectivamente) usando a objetiva 20X sob uma configuração idêntica de iluminação. As imagens com uma ampliação final de 200X foram armazenadas usando um microscópio de luz BX51Olympus (Japan). A quantificação de AQP4 e imunomarcção GFAP foi medida usando o software GIMP 2.6.4-GNU Image Manipulation Program (CNET Networks, Inc. Austrália) que converte as imagens digitalizadas para tons de cinza (preto e branco), após a seleção de cor (Salomão, 2009). A análise quantitativa foi realizada por meio do cálculo da porcentagem de pixels das camadas anti-AQP4 e anti-GFAP em cada camada do cerebelo e hipocampo separadamente.

5.6.2 Western Blotting

Análises densitométricas foram realizadas usando o software de análise de imagem: J NIH Image 1.41 program (disponível em zippy.nimh.nih.gov/ ou <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>; desenvolvido por Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD), onde cada banda foi medida separadamente.

5.6.3. PCR em tempo real

A análise do PCR em tempo real da expressão gênica foi realizada por um sistema de detecção de sequência ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) e os dados resultantes foram avaliados usando o Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

5.7. Estatística

Todos os resultados numéricos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA) e expressos como a média \pm erro padrão (S.E.). As diferenças entre as médias de dados de grupos tratados com solução salina e com PNV foram determinadas pelo Teste T de Student não-pareado, com um valor de $p \leq 0,05$ indicando significância estatística. A análise de

variância Three-way foi utilizada quando apropriada para testar diferenças idade/tempo/tratamento na resposta ao efeito do veneno.

6. RESULTADOS

6.1 Cerebelo

6.1.1 Imunohistoquímica

A imunorreatividade dos astrócitos de AQP4 e GFAP foi co-localizada entre os corpos de neurônios das camadas granulares e de Purkinje e difundidas por toda a extensão da camada molecular, com a diferença de que os processos gliais apareceram mais bem definidos na reação anti-GFAP. A reação anti-AQP4, embora forte, foi mais difusa. Em animais injetados com PNV houve um gradual aumento tempo-dependente na intensidade da imunomarcção da substância branca e das camadas do córtex cerebelar, tanto para P14 quanto para adultos. As Figuras 7, 8 e 9 foram escolhidas para ilustrar o padrão de reação em três intervalos de tempo (2h, 5h e 24h) para os ratos de ambas as idades; as figuras também mostram o cálculo da densidade de pixels em relação à intensidade de imunorreação durante todo o período de observação.

6.1.1.1. *Substância branca*

Animais de ambas as idade tratados com veneno de P. nigriventer mostraram um aumento gradual na expressão de AQP4 e GFAP em astrócitos da substância branca.

Não há nenhuma diferença significativa na expressão fisiológica de AQP4 e GFAP na substância branca de ratos P14 e adultos nos diferentes tempos após a injeção de solução salina (Figs. 8C e 8F). Contudo, os ratos administrados com PNV mostraram aumento de 103,8% na expressão de AQP4 nos animais adultos (* $p \leq 0,05$) e 77,5% (** $p \leq 0,01$) nos animais neonatos depois de 24h (Figura 8C). O veneno também causou aumento de 57,3% na expressão de GFAP após 24h apenas nos astrócitos de animais P14 (* $p \leq 0,05$). Embora não significativa, a expressão de AQP4 era de 11% a 20% mais elevada em animais P14 tratados com PNV (variando de $16,48 \pm 1,06$ às 2h para $27,73 \pm 2,57$ às 24h, respectivamente) do que em adultos tratados com PNV (onde variaram de $13,68 \pm 2,03$ às 2h para $24,94 \pm 3,55$ às 24h, respectivamente). Em contraste, os valores para GFAP foram, em geral, mais elevados em adultos do que em animais P14.

A análise de variância do Three-way mostrou que o tempo decorrido entre o envenenamento e a eutanásia de animais interferiu na expressão de AQP4 e GFAP na substância branca dos neonatos e adultos (* $p \leq 0,05$).

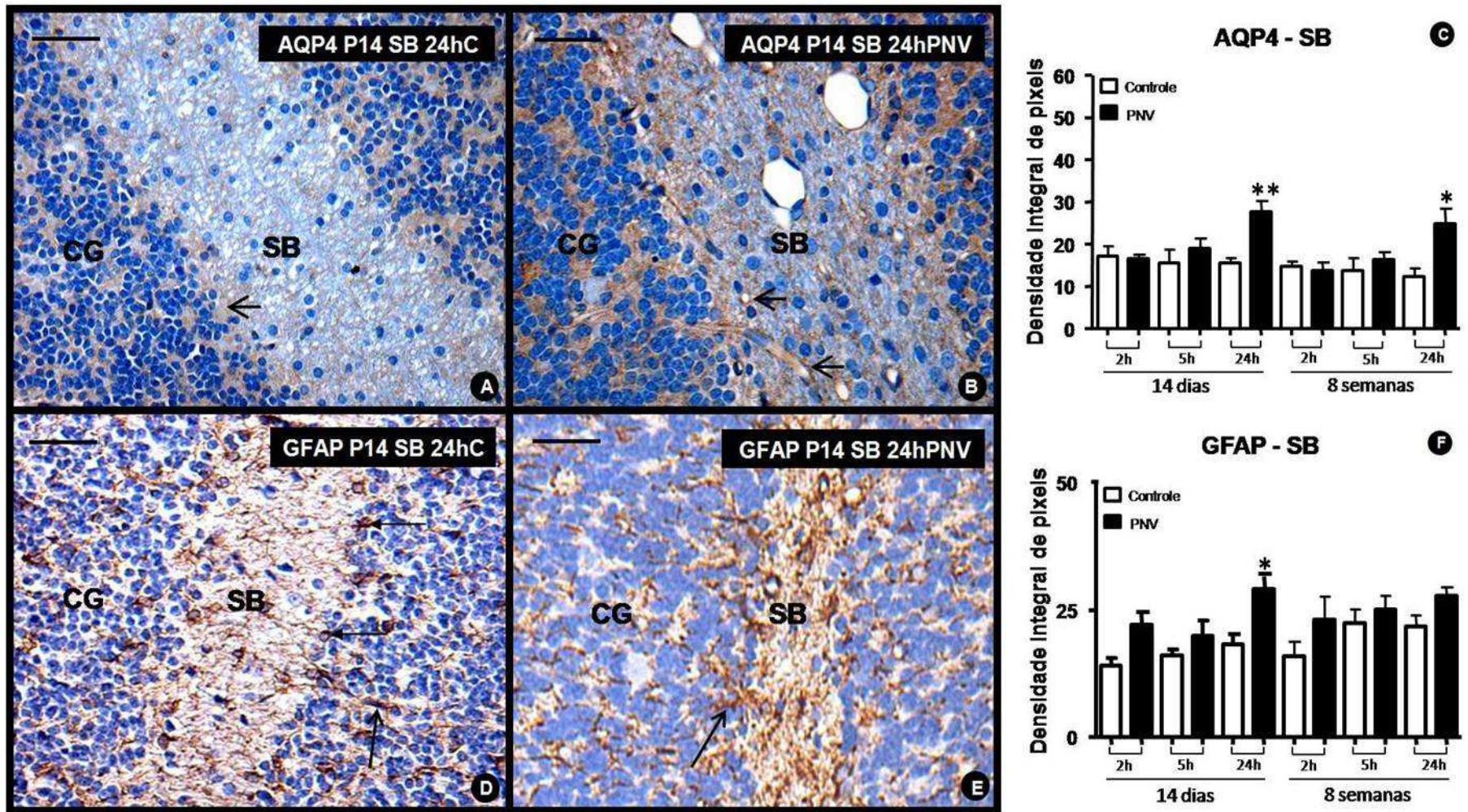


Figura 8 - Fotomicrografias do cerebelo mostrando a substância branca (SB) de ratos de 14 dias de idade 24 horas após a administração de solução salina (P14 SB 24hC) ou veneno de *P. nigriventer* (P14 SB 24hPNV). **A** e **B**: imagens que mostram a marcação anti-AQP4 (setas pequenas); **C**: histograma da densidade de pixels de locais imunorreativos de AQP4 após a segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4; **D** e **E**: imagens que mostram a expressão de GFAP. As setas grandes indicam corpos de astrócitos marcados; **F**: histograma da densidade de pixels de locais imunorreativos de GFAP após a segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4. Observe que em **C** e **F** houve um aumento de expressão concomitante de AQP4 (** $p \leq 0,01$) e GFAP (* $p \leq 0,05$) após 24 h de envenenamento em animais P14, enquanto em animais adultos um aumento significativo foi observado apenas para AQP4 no mesmo intervalo (* $p \leq 0,05$). Os valores são a média \pm S.E. de 15 imagens (três imagens de animal por SB, $n=5$ animais/tempo) capturadas ao acaso. Teste T de Student (não pareado) foi utilizado para comparar os valores de cada período nos animais controles e injetados com PNV (adultos e neonatos). Barra = 100 μ m.

6.1.1.2. Camada granular

O veneno de P. nigriventer resultou num aumento tempo-dependente na expressão de AQP4 em adultos e numa diminuição tempo-dependente de AQP4 em neonatos. A expressão de GFAP foi gradualmente diminuindo em P14 e adultos.

Não houve diferença significativa idade-dependente na expressão fisiológica de AQP4 e GFAP na camada granular dos ratos P14 e adultos para os diferentes períodos após a injeção de solução salina (Figura 9C e 9F). No entanto, ratos neonatos envenenados mostraram aumento de 83,1% na expressão da AQP4 em 2h (** $p \leq 0,01$), aumento de 58,8% em 5h (** $p \leq 0,01$) e 23,5% de aumento não significativo em 24h, indicando que após um aumento imediato da expressão de AQP4 houve uma tendência a diminuir a quantidade dessa proteína com o tempo. Por outro lado, em relação aos controles, os ratos adultos administrados com PNV mostraram aumento de 59,8% na expressão de AQP4 em 2h (* $p \leq 0,05$), 39,5% (não significativo) às 5h e 91,8% às 24h (* $p \leq 0,05$), indicando um efeito prolongado do PNV sobre a expressão da proteína (Fig. 9C). A expressão de GFAP não mostrou nenhuma mudança significativa na resposta ao PNV em animais P14; no entanto, em ratos adultos induziram aumento de 71,2% em 2h (***) $p \leq 0,001$) e 33,5% em 5h (* $p \leq 0,05$) e ficou próximo do controle em 24h (Fig. 9F).

A análise de Three-way não apresentou interação entre as variáveis (tratamento, idade e tempo).

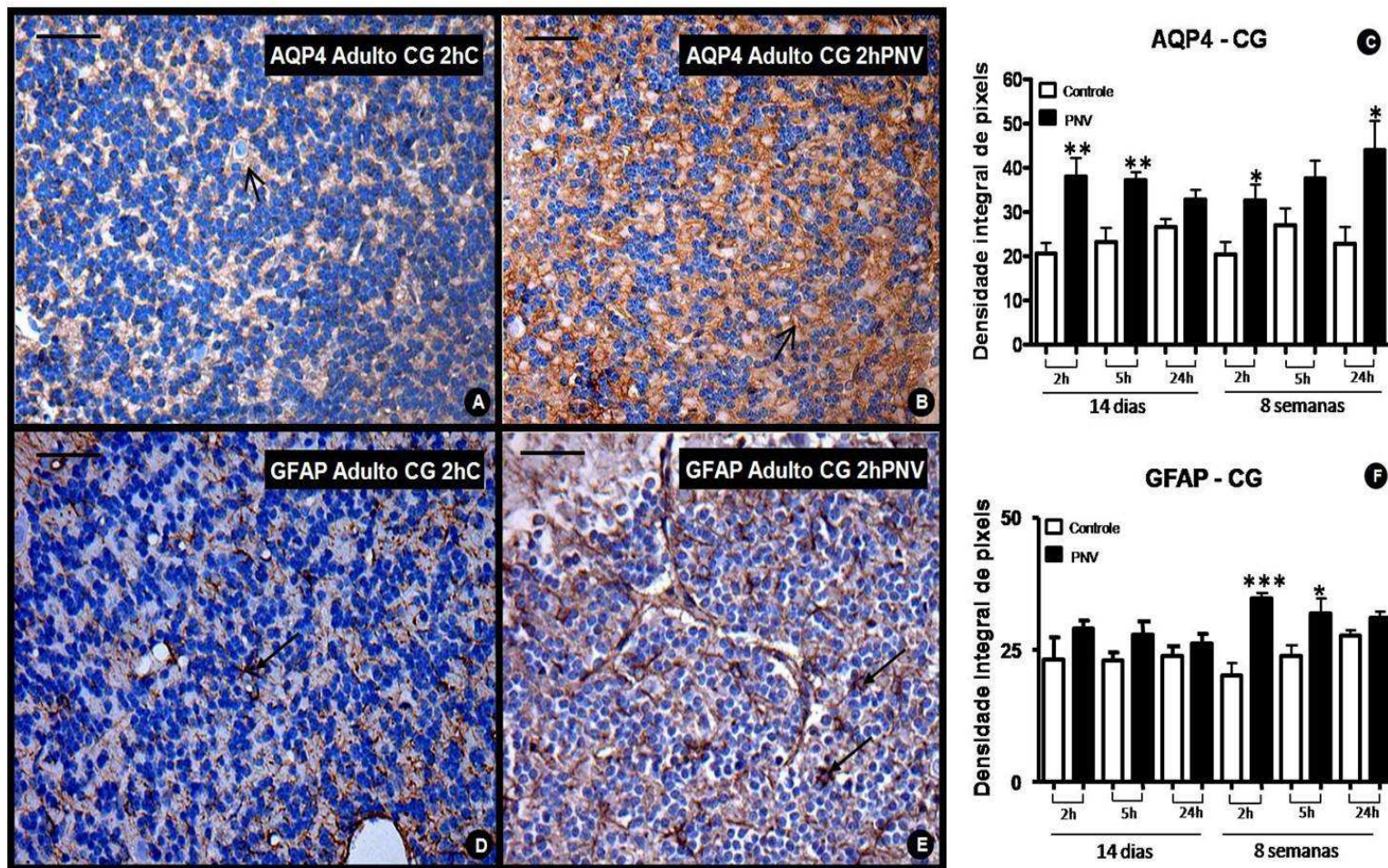


Figura 9 – Fotomicrografias do cerebelo mostrando a camada granular (CG) de ratos com 8 semanas de idade 2h após a administração de solução salina (adulto CG 2hC) ou veneno de *P. nigriventer* (adulto CG 2hPNV). **A** e **B**: imagens que mostram a marcação da proteína aquaporina-4 (AQP4) (setas pequenas); **C**: histograma mostrando a densidade de pixels de locais imunorreativos de AQP4 após segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4. O caráter sincício do arranjo espacial de astrócitos pode ser observado no painel B; **D** e **E**: imagens que mostram a marcação da proteína GFAP (setas grandes). Observe o edema formado ao redor do vaso; **F**: histograma mostrando a densidade de pixels de locais imunorreativos de GFAP após segmentação de cor pelo GIMP software 2.6.4. Observe que houve um aumento concomitante na expressão de AQP4 (* $p \leq 0,05$) e GFAP (*** $p \leq 0,001$) após 2h de envenenamento em animais adultos. Além disso, o PNV induziu um aumento de GFAP às 5h (* $p \leq 0,05$) nos animais adultos e um aumento de AQP4 após 2 e 5h (* $p \leq 0,05$) em P14. Os valores são a média \pm S.E. de 15 imagens (três imagens do animal por CG, $n=5$ animais/tempo) capturadas ao acaso. Teste T de Student (não pareado) foi utilizado para comparar os valores em cada período nos animais controles e injetados com PNV (adultos e neonatos). Barra = 100 μ m.

6.1.1.3. Camada molecular

O efeito do veneno de P. nigriventer na expressão de células da glia de Bergmann em AQP4 foi mais proeminente nos ratos neonatos do que em adultos, enquanto que a expressão de GFAP foi mais proeminente em adultos do que em neonatos.

O menor valor de AQP4 expresso em células da glia de Bergmann de ratos neonatos foi de $15,73 \pm 2,61$ e de $16,39 \pm 1,62$ para os adultos, enquanto que o valor mais elevado foi de $23,95 \pm 2,16$ para P14 e $22,96 \pm 3,45$ para os animais de 8 semanas (Fig. 10C). A expressão de GFAP foi mais elevada em animais P14 do que nos adultos, variando de $23,53 \pm 2,19$ para $29,31 \pm 2,16$ em P14 e $20,23 \pm 1,51$ para $23,83 \pm 2,46$ em adultos (Fig. 10F). O efeito do PNV na expressão da AQP4 foi significativo apenas após 24h, quando a expressão de 52% foi encontrada para glia de Bergmann de ratos de 8 semanas de idade (* $p \leq 0,05$) (Figura 10C). Em contraste, nos animais de 14 dias aumento inicial de 44,2% ocorreu em 2h (* $p \leq 0,05$), mas o seu nível não diferiu do controle de 5h, sendo que depois aumentou 101,6% em 24h (* $p \leq 0,05$) (Fig. 10C). A expressão de GFAP não revelou alteração em P14 mas houve aumento significativo em 66,34% em 2h (*** $p \leq 0,001$), 51,11% em 5h (** $p \leq 0,01$) e 58,59% em 24h (** $p \leq 0,01$) nos animais PNV adultos em relação aos seus controles (Fig. 10F).

A análise de variância do Three-way mostrou que o tratamento e a idade dos animais interferiu com a expressão de AQP4 e GFAP em adultos.

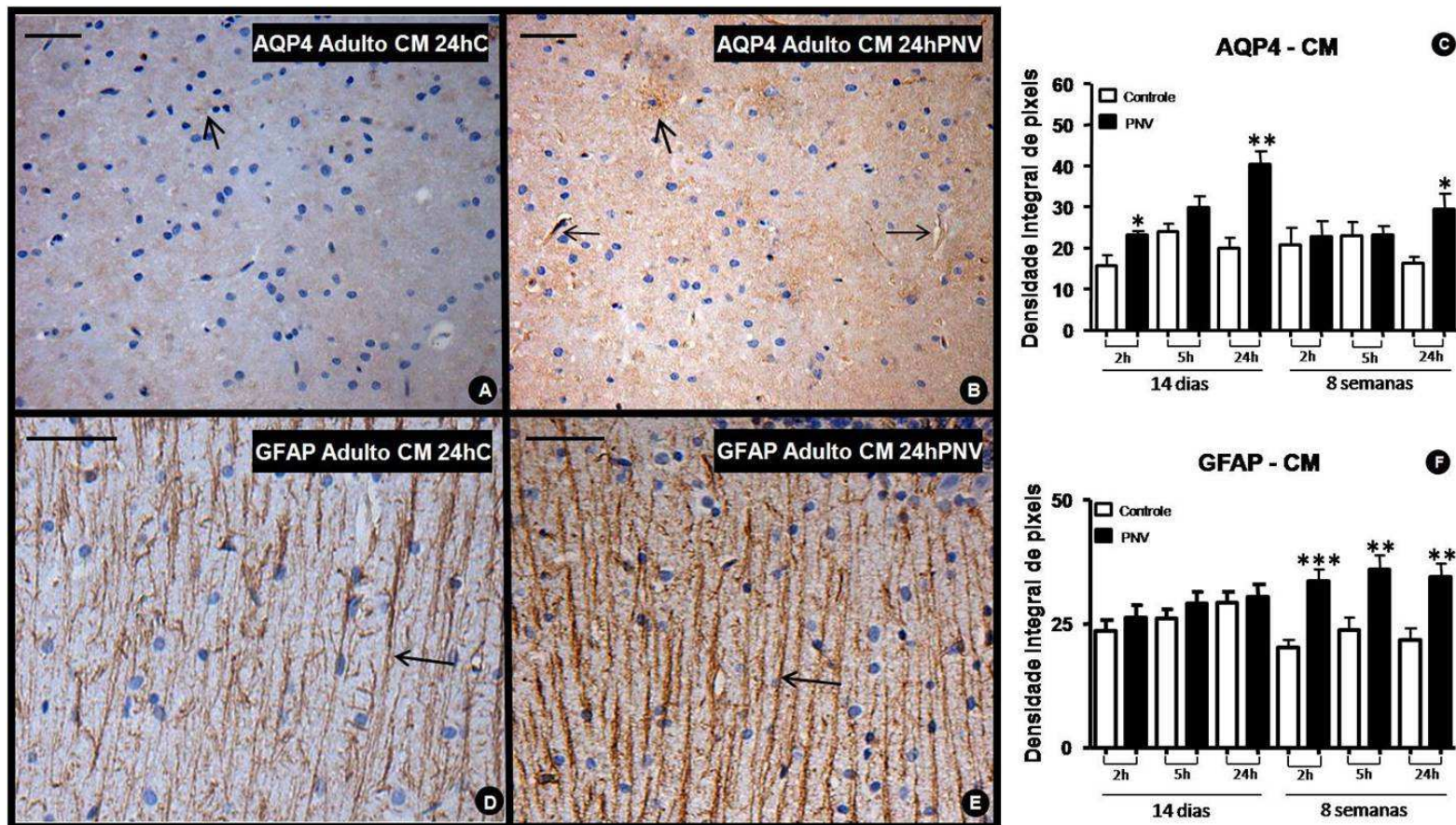


Figura 10 – Fotomicrografias de cerebelo mostrando a camada molecular (CM) de ratos com 8 semanas de idade 24h após a administração de solução salina (adulto CM 24hC) ou veneno de *P. nigriventer* (adulto CM 24hPNV). **A e B**: imagens que mostram a marcação de aquaporina 4 (AQP4) (cabeça de seta). Observe a presença de edema no animal PNV (seta pequena); **C**: histograma mostrando a densidade de pixels de locais imunorreativos de AQP4 após segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4; **D e E**: imagens que mostram a marcação de GFAP (setas grandes); **F**: histograma que mostra a densidade de pixels de locais imunorreativos de GFAP após a segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4. Observe que em C e F houve um aumento na expressão de AQP4 (* $p \leq 0,05$) e GFAP (** $p \leq 0,01$) 24h após o envenenamento em animais adultos. Por outro lado, o PNV promoveu um aumento de AQP4 às 2h (* $p \leq 0,05$) e 24h (** $p \leq 0,01$) após o envenenamento em animais P14 que não foi seguido pelo GFAP. Além disso, o PNV aumentou a expressão de GFAP em células da glia de Bergmann (astroglíose) em todos os três períodos examinados em animais adultos (* $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,01$). Os valores são a média \pm S.E. de 15 imagens (três imagens de animal por CM, $n=5$ animais/tempo) capturadas ao acaso. Teste T de Student (não pareado) foi utilizado para comparar os valores em cada período nos controles e animais injetados com PNV (adultos e neonatos). Barra = 100 μ m.

6.1.1.4 Camada de Purkinje

*O veneno de *Phoneutria nigriventer* não altera as expressões de AQP4 na camada de Purkinje em ambas as idades mas aumenta a de GFAP após 24h em neonatos.*

Embora não seja estatisticamente significativo, o PNV induziu uma tendência transitória a diminuição seguida por um aumento transitório na expressão de AQP4 na camada de Purkinje de ratos P14. Em contraste, o PNV induziu um aumento de 116,13% na expressão de GFAP em astrócitos localizados na camada de Purkinje (Fig. 11E).

A análise do Three-way não mostrou interação entre as variáveis (tratamento, idade e tempo).

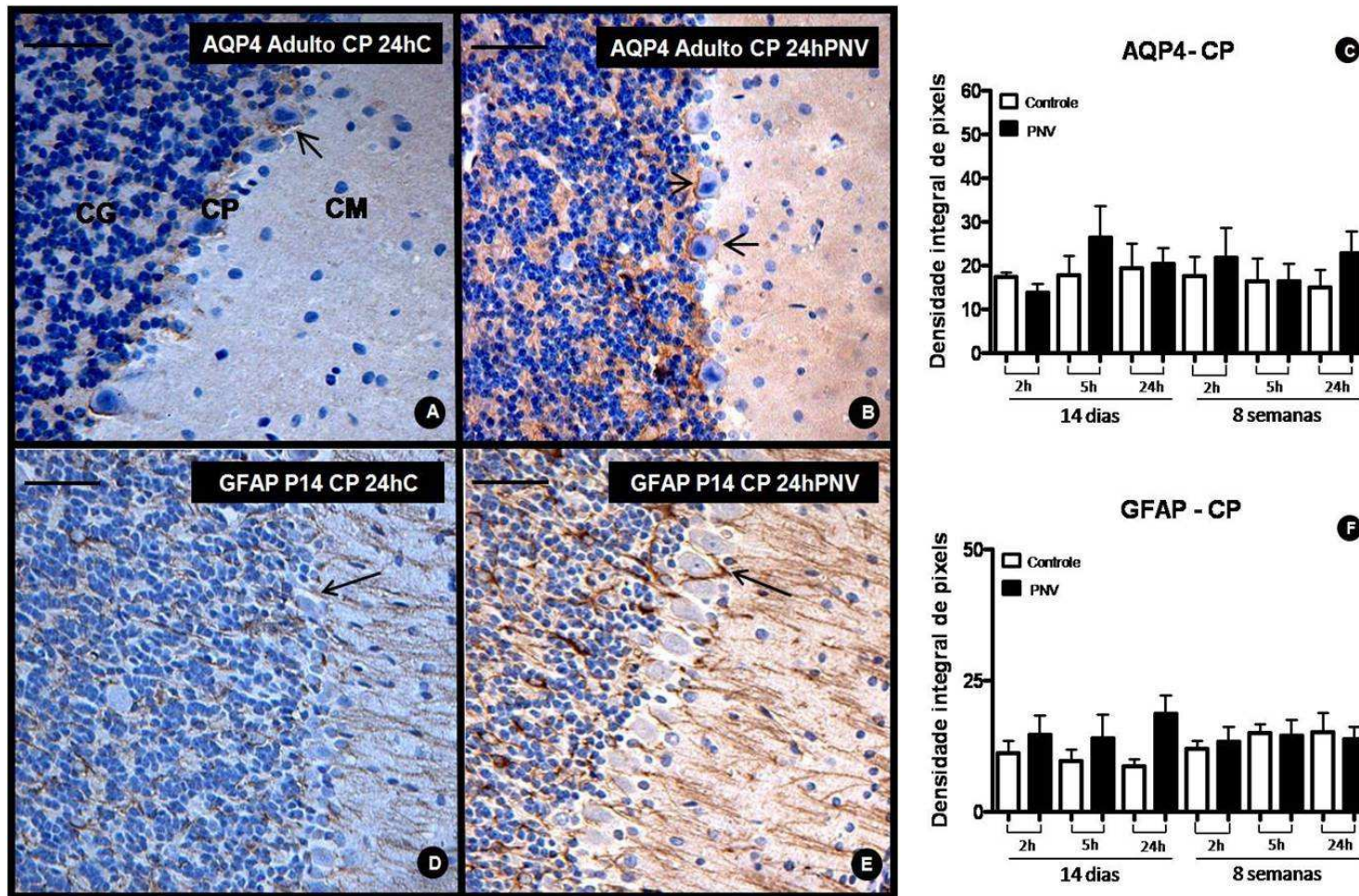


Figura 11 – Fotomicrografias do cerebelo mostrando a camada de Purkinje (CP) de ratos de 8 semanas e 14 dias de idade 24 horas após a administração de solução salina (adulto CP 24hC; P14 24hC) ou veneno de *P. nigriventer* (adulto CP 24hPNV; P14 24hC). **A** e **B**: imagens que mostram a marcação da proteína aquaporina-4 (AQP4) em ratos adultos (setas); **C**: histograma da densidade de pixels de locais imunorreativos de AQP4 após segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4; **D** e **E**: imagens que mostram a marcação da proteína GFAP em neonatos (setas); **F**: histograma da densidade de pixels de locais imunorreativos de GFAP após a segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4. Os valores são a média \pm S.E. de 15 imagens (três imagens de animal por CP, $n=5$ animais/tempo) capturadas ao acaso. Teste T de Student (não pareado) foi utilizado para comparar os valores em cada período nos controles e animais injetados com PNV (adultos e neonatos). Barra = 100 μ m.

6.1.2 Western Blotting (WB) e PCR em tempo real

Os imunoblots de AQP4 resultantes de homogenatos de cerebelos mostraram expressão aumentada em todos os períodos após a exposição ao PNV, tanto em animais P14 quanto adultos em relação aos valores dos respectivos controles. No entanto, a regulação positiva da proteína foi estatisticamente significativa às 2 horas para animais adultos e às 5 horas para neonatos após a administração do PNV, o que representou um aumento de 44,5% para adultos (** $p \leq 0,01$) e 77,6% em neonatos (* $p \leq 0,05$) (Fig. 12).

A comparação entre o nível da proteína em ratos P14 e adultos apresentou em seu total que animais adultos possuem uma maior quantidade de AQP4 do que neonatos (Fig. 12). Diferenças significativas foram encontradas às 24 h após a injeção de solução salina quando a expressão basal de AQP4 foi 91,4% superior em adultos em relação aos P14 (### $p \leq 0,001$). Em animais expostos ao PNV, a expressão de AQP4 foi 48,4% (# $p \leq 0,05$) e 38,5% (### $p \leq 0,001$) maior nos adultos às 2 h e 24 h, respectivamente, do que a medida em P14. A análise do Three way revelou que a variável idade influenciou a expressão da proteína 24 h após a exposição ao veneno (*** $p \leq 0,001$).

Em relação à expressão de RNAm de AQP4, o veneno de *P. nigriventer* mostrou uma tendência ao aumento, o que, contudo, não atingiu significância estatística nos intervalos examinados. A falta de significância foi devido as elevadas diferenças individuais entre os valores, uma característica particularmente exibida pelos ratos P14. Assim como para a proteína, a quantidade de RNAm de AQP4 foi maior nos neonatos do que em animais adultos. Valores do RNAm da proteína variou de $1,39 \pm 0,66$ às 2 h para $1,65 \pm 0,39$ às 24 h para P14 contra $1,41 \pm 0,48$ às 2 h para $2,20 \pm 0,54$ às 24 h para adultos (Fig.13). Comparações de períodos de produção de RNAm entre neonatos e adultos em resposta ao PNV ou exposição salina apresentaram-se sempre mais ágeis nos animais adultos, mas a variabilidade intra-individual do grupo não produziu dados significativos. A análise do Three way não mostrou interação entre variáveis tempo ou idade.

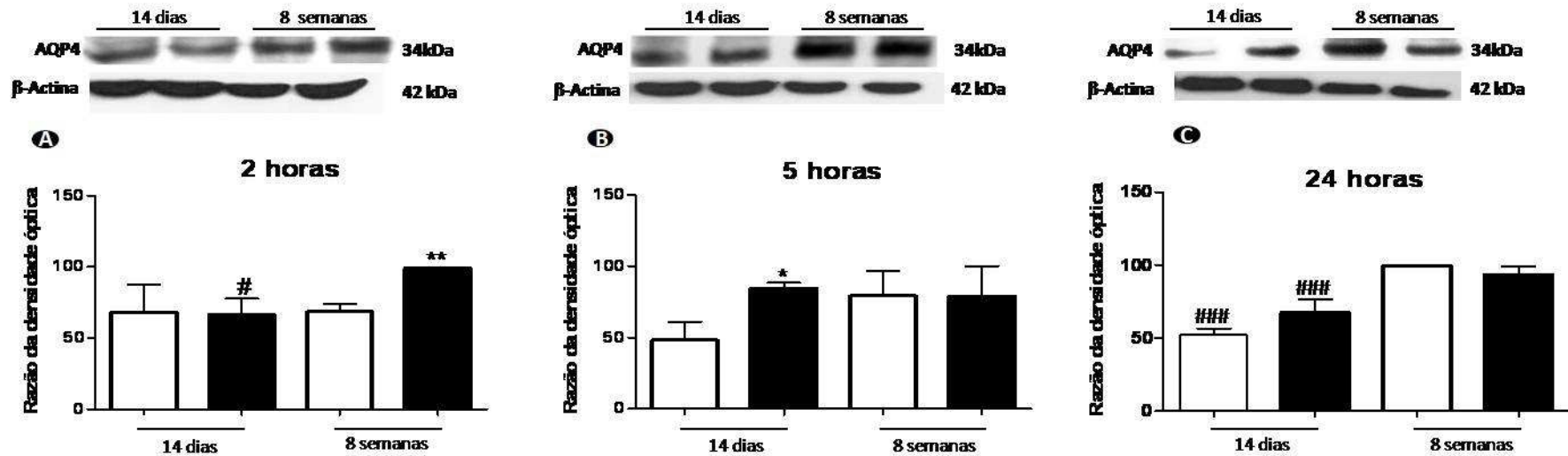


Figura 12 – Representação gráfica de imunoblots de AQP4 e da sua expressão no cerebelo de ratos neonatos (14 dias) e adultos (8 semanas de idade) 2, 5 e 24 h após injeção i.p. de solução salina (barras brancas) ou PNV (barras pretas) * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ em comparação com o respectivo controle., # $p \leq 0,05$ e ### $p \leq 0,001$ em comparação entre neonatos e adultos tratados com PNV às 2 horas e entre tratados com solução salina às 5 e 24 h, respectivamente. β -actina foi utilizada como controle interno. Os dados foram a média \pm S.E., teste t não pareado.

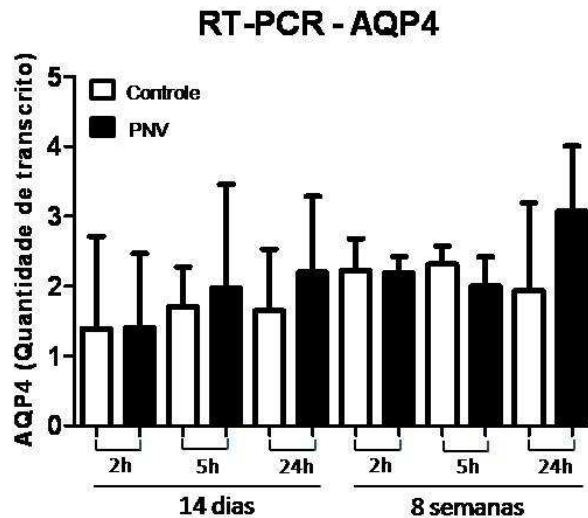


Figura 13 – Representação gráfica da expressão de RNAm de AQP4 no cerebelo de ratos P14 e adultos 2, 5 e 24 horas após injeção i.p. de solução salina ou PNV. A expressão do RNAm atingido o seu nível mais alto 24 h após envenenamento. GAPDH foi utilizada como proteína de controle interno.

6.2 Hipocampo

6.2.1 Imunohistoquímica

6.2.1.1. Camada CA1

A expressão fisiológica de AQP4 foi maior em ratos P14 do que em adultos e o pico para os animais de ambas as idades ocorreu às 5h após a injeção de solução salina. O PNV aumentou a expressão de maior magnitude para P14 (pico às 24h) do que para os adultos (pico às 2h). No entanto, não há nenhum resultado com significância estatística em relação aos seus respectivos controles. A expressão de GFAP nos astrócitos aumentou após o envenenamento por PNV, denotando gliose reativa.

A imunomarcagem de AQP4 foi intensamente perivascular. Além disso, a marcação anti-AQP4 foi distribuída ao longo dos finos processos astrocitários dispersos entre os corpos de neurônios piramidais no stratum pyramidale e processos neuronais em todo o stratum oriens e stratum radiatum do subcampo CA1 do hipocampo. A Figura 14 ilustra a imunocoloração de AQP4 em neonatos 24 horas após injeção intraperitoneal de salina (Fig. 14A) e PNV (Fig. 14B). O pico de aumento de AQP4 induzido pela exposição ao PNV e medido pela densidade integrada de pixels após segmentação de cor foi superior

em P14 (pico às 24h) quando comparado aos adultos (pico às 2h) (Fig. 14C).

A marcação de GFAP em ratos controle P14 mostrou corpos de astrócitos bem corados e processos espalhados por toda as camadas do subcampo CA1 (Fig. 14D). O PNV induziu maior expressão em torno das paredes de microvasos e o neurópilo indicou a indução de astrogliose reativa (Fig. 14E) com pico 24h após a exposição ao veneno para os animais de ambas as idades (Figura 14F). Vale a pena ressaltar que a ausência de corpos de astrócitos corados nas figuras 14A e 14B confirma a presença seletiva dos canais de água formados pela aquaporina 4 exclusivamente nos pés perivascularares e processos astrocitários perisinápticos.

A análise de variância Three-way indicou que a interação entre a idade e o tratamento dos animais influenciou a expressão de AQP4 24h após a administração de PNV mas não a expressão de GFAP.

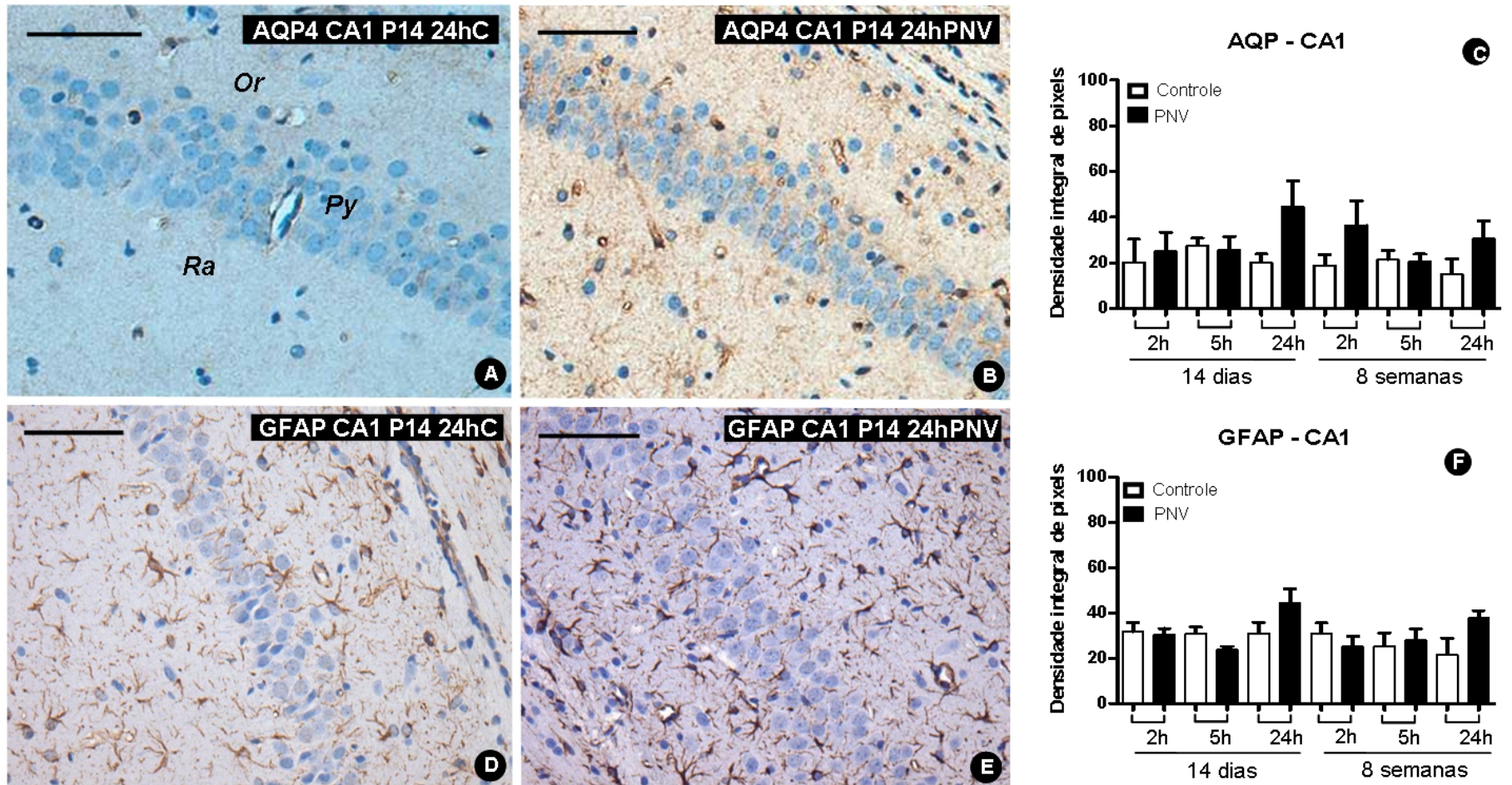


Figura 14 – Fotomicrografias do hipocampo mostrando o subcampo CA1 de ratos P14 24h após administração de solução salina ou veneno de *P. nigriventer*. A e B: imagens mostrando a marcação de aquaporina-4 (AQP4). O subcampo é dividido em: stratum oriens (Or), stratum pyramidale (Py) e stratum radiatum (Ra); C: histograma da densidade de pixels de locais imunorreativos de AQP4 após segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4; D e E: imagens mostrando a marcação de GFAP; F: histograma da densidade de pixels de locais imunorreativos de GFAP após segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4. Dados são expressos como média \pm S.E., Teste T de Student. Barra = 100 μ m.

6.2.1.2 Camada CA2

Em ratos P14, a expressão média de AQP4 nos controles era menos da metade da expressão nos adultos. O PNV aumentou fortemente a expressão de AQP4 em ratos neonatos.

Como em CA1, anti-AQP4 foi mais evidente em torno do microvasos das camadas do subcampo CA2 hipocampal de controles P14 enquanto em torno do neurópilo foi mais tênue (Fig. 15A). O veneno de aranha aumentou fortemente os locais imunorreativos (Fig. 15B). Ratos adultos mostraram um padrão de coloração idêntico em amostras de controle e de PNV (não mostrado). Além disso, o PNV causou imediata baixa expressão (2h) de AQP4 seguida de aumento moderado (5h) e depois menor expressão (24h), apesar de não ser estatisticamente significativo (Fig. 15C). As figuras 15D e 15E mostram o aspecto da reação anti-GFAP no subcampo CA2 dos ratos controles e tratados com PNV. O veneno induziu uma expressão reativa da proteína de citoesqueleto GFAP nos corpos celulares e processos astrocitários (Fig. 15D, E) com expressão aumentada significativamente em ratos adultos às 24h (* $p \leq 0,05$, fig. 15F).

A expressão basal de AQP4 foi 226%, 97% e 112% mais elevada em adultos às 2h (# $p \leq 0,05$), 5h e 24h, respectivamente, do que em neonatos. Em adultos tratados com PNV, a expressão da proteína foi menor, minimizando as diferenças relacionadas com a idade em relação aos P14 (Fig. 15C). Não houve diferença relacionada com a idade na expressão de GFAP.

A análise do Three-way não mostrou interação entre as variáveis.

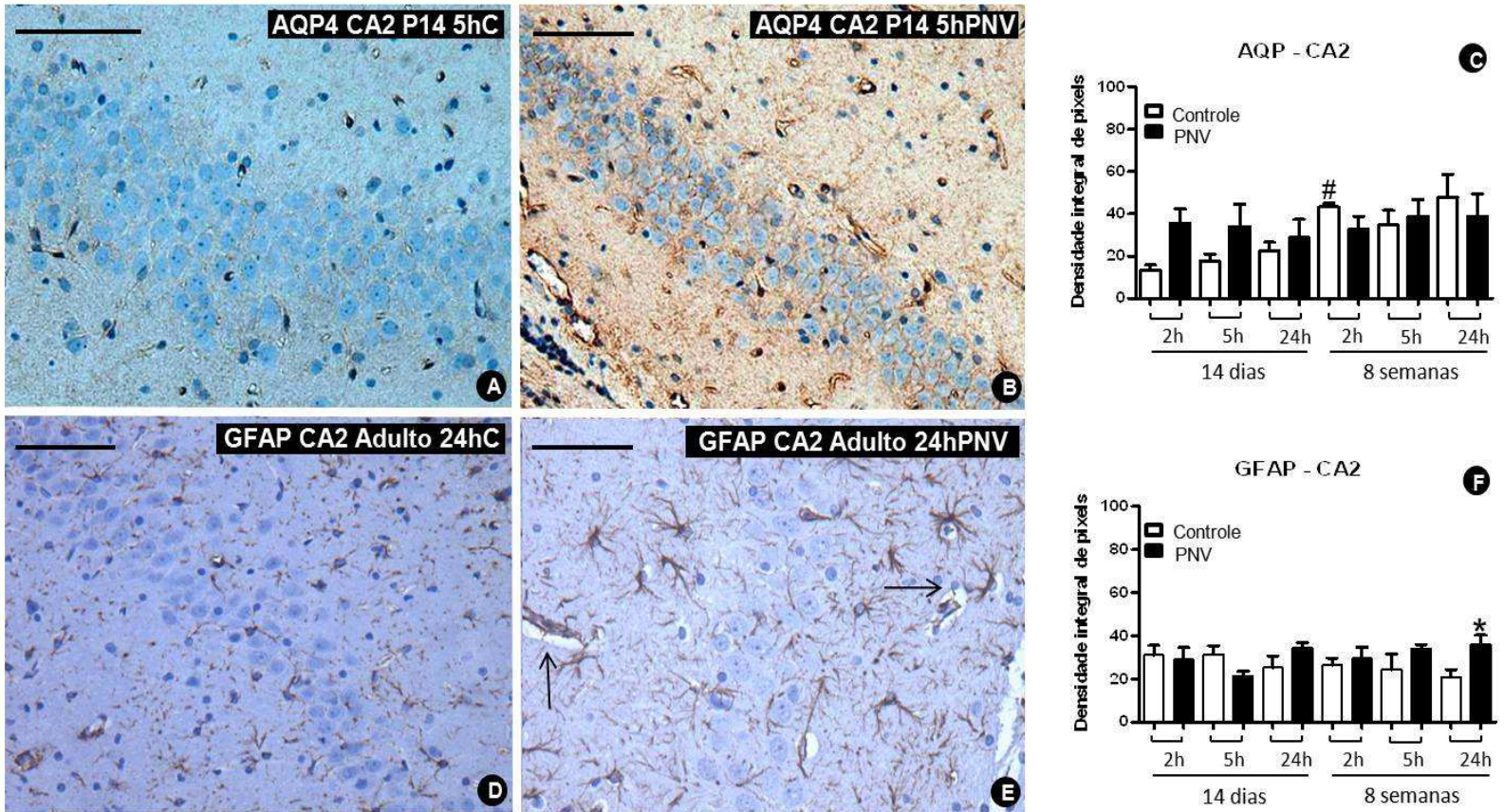


Figura 15 – Fotomicrografias do hipocampo mostrando o subcampo CA2 de ratos neonatos e adultos 5h e 24h, respectivamente, após administração de solução salina ou veneno de *P. nigriventer*. **A e B**: imagens mostrando a marcação de aquaporina-4 (AQP4). Observe a sutil marcação anti-AQP4 espalhada entre corpos de neurônios piramidais e processos no controle e o aumento da expressão nos animais tratados com PNV; **C**: histograma da densidade de pixels de locais imunorreativos de AQP4 após segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4. Após 2h, os animais controles P14 apresentaram diferença significativa em relação aos adultos (# $p \leq 0.05$); **D e E**: imagens mostrando a marcação de GFAP. Setas apontam edemas perivasculares; **F**: histograma da densidade de pixels de locais imunorreativos de GFAP após segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4. Dados são expressos como média \pm S.E., Teste T de Student. Barra = 100 μ m.

6.2.1.3. Camada CA3

Nesta camada, tanto a expressão basal de AQP4 como a sua expressão após administração de PNV foi maior em adultos às 2h e 24h em relação aos neonatos. O PNV induziu um aumento de 83,5% na expressão de AQP4 às 24 horas em P14.

Assim como em CA1 e CA2, a expressão de AQP4 no subcampo CA3 é preferencialmente delineando os microvasos dos animais de 14 dias (Fig. 16A) e adultos (não mostrado). A exposição ao PNV induziu um aumento na expressão de AQP4 de uma maneira dependente do tempo (pico às 24h com 83,5% de aumento), para neonatos (Figs. 16B e C). Em adultos, após imediata baixa expressão, o PNV induziu aumento às 5h e 24h após exposição ao veneno (Fig. 16C).

A comparação do nível de AQP4 entre P14 e adultos em cada período revelou que animais adultos, tanto os controles como os tratados com PNV, possuem maior nível de proteína do que os neonatos às 2 e 24 horas e menor nível às 5h, embora essas diferenças não tenham atingido significância estatística.

O subcampo CA3 não mostrou aumento visível de expressão de GFAP ao longo dos períodos examinados nos animais de ambas as idades administrados com PNV, mas os animais jovens apresentaram mais consistentemente expressão maior da proteína (Fig. 15D-F).

A análise do Three-way não mostrou interação entre as variáveis.

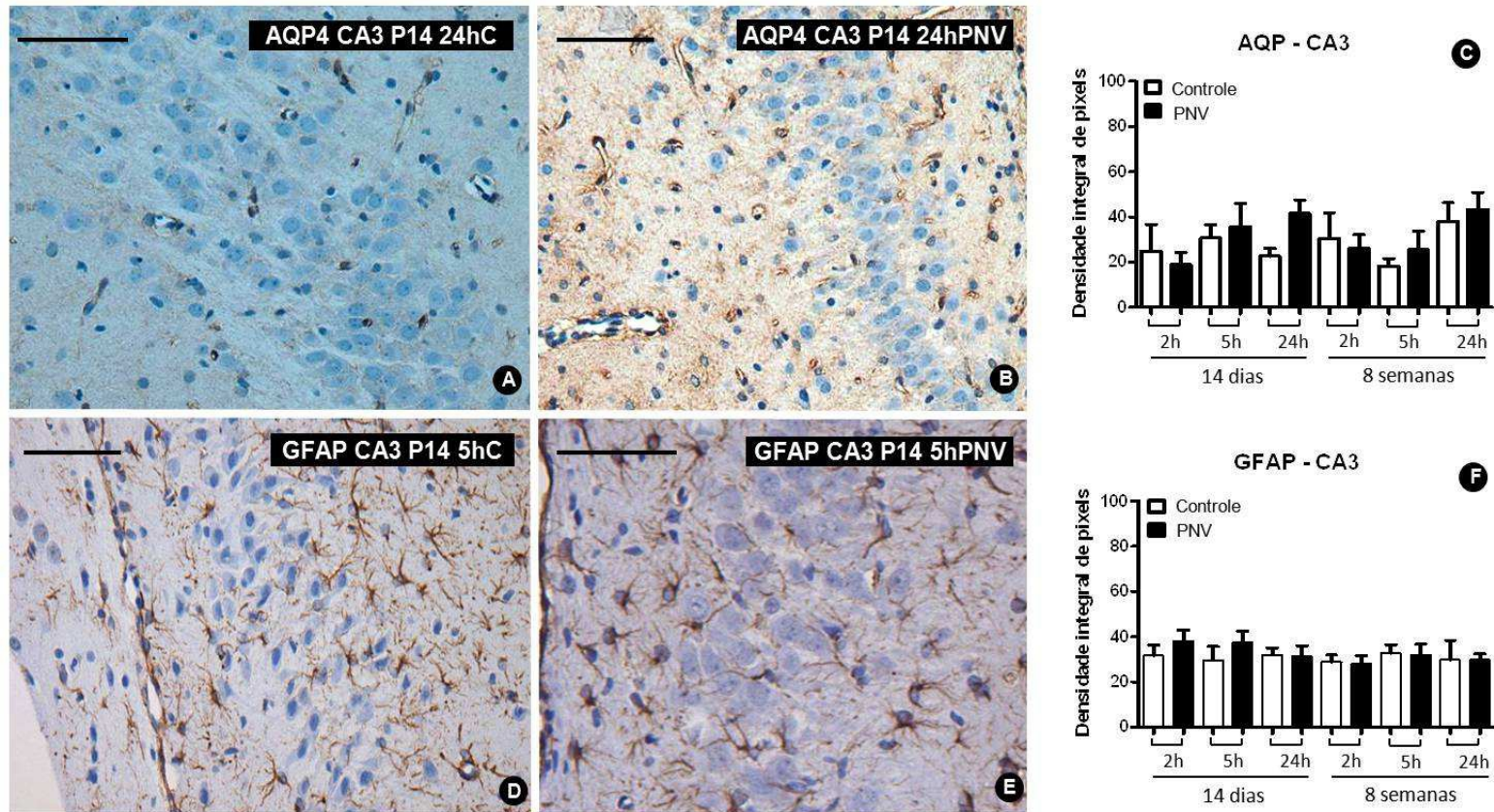


Figura 16 – Fotomicrografias do hipocampo mostrando o subcampo CA3 de ratos P14 5h e 24h após administração de solução salina ou veneno de *P. nigriventer*. **A e B**: imagens mostrando a marcação de aquaporina-4 (AQP4); **C**: histograma da densidade de pixels de locais imunorreativos de AQP4 após segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4. Após 24h de envenenamento, animais neonatos tiveram expressão significativa da proteína ($p \leq 0.05$); **D e E**: imagens mostrando a marcação de GFAP; **F**: histograma da densidade de pixels de locais imunorreativos de GFAP após segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4. Dados são expressos como média \pm S.E., Teste T de Student. Barra = 100 μ m.

6.2.1.4. Giro Denteado (GD)

O efeito do PNV na indução de AQP4 foi mais proeminente em P14 do que em animais adultos no giro denteado do hipocampo. O edema foi observado ao redor de vasos e em torno dos corpos de neurônios.

Houve aumento na marcação de anti-AQP4 no giro denteado (GD) de animais administrados com PNV de forma mais consistente em neonatos (Figs. 17A-C). O pico de expressão de AQP4 ocorreu às 2h (***) $p \leq 0,001$) e 5h (***) $p \leq 0,001$) e apresentou um aumento 119,4% maior em relação a seu respectivo controle. Além disso, edemas ao redor dos vasos e próximo de neurônios foi observado. A comparação do nível de AQP4 em cada tempo mostrou que o GD nos animais adultos continha maior nível fisiológico de AQP4 do que em neonatos (# $p \leq 0,05$ às 5 horas após exposição ao veneno). Em animais envenenados, o nível de AQP4 mostrou uma tendência a ser mais elevado às 5 e 24 horas, sendo que este apresentou diferença significativa (** $p \leq 0,01$) (Fig. 17C).

Não foi observado aumento significativo na expressão de GFAP em animais envenenados (Figs. 17D-F). A análise do Three-way não mostrou interação entre as variáveis.

No geral, os dados de imunohistoquímica indicaram para neonatos que o nível basal de AQP4 foi em CA3 > CA1 > CA2 > DG e o maior pico foi em CA3 > CA1 > CA2 > DG; para os adultos, o nível basal de expressão de AQP4 estava em CA2 > CA3 > DG > CA1 e o maior pico foi em CA2 > CA3 > DG > CA1.

Em relação aos neonatos envenenados, a expressão de AQP4 estava em CA1 > CA3 > CA2 > DG e o maior pico foi em CA1 > CA3 > CA2 > DG; para os adultos, a expressão de AQP4 estava em CA2 > CA3 > DG > CA1 e o maior pico foi em CA3 > CA2 > CA1 > DG.

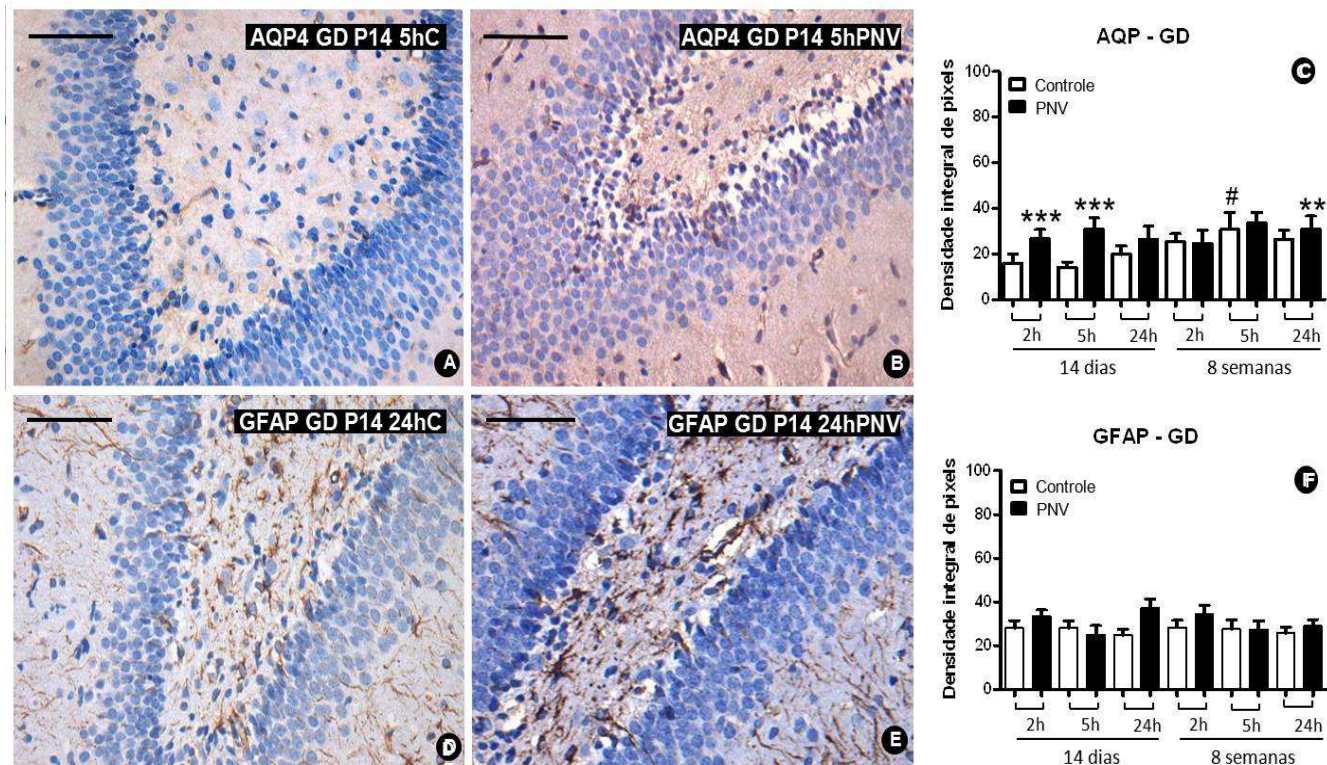


Figura 17 – Fotomicrografias do hipocampo mostrando o subcampo GD de ratos P14 5h e 24h após administração de solução salina ou veneno de *P. nigriventer*. **A e B**: imagens mostrando a marcação de aquaporina-4 (AQP4); **C**: histograma da densidade de pixels de locais imunorreativos de AQP4 após segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4. Após 2h e 5h de envenenamento, animais neonatos tiveram expressão significativa da proteína ($p \leq 0.001$) em relação aos seus respectivos controles. Animais adultos injetados com PNV também apresentaram dados significativos quando comparados ao seu controle mas apenas após 24h ($p \leq 0.01$). Note que há diferença significativa entre animais envenenados neonatos e adultos após 5h PNV ($p \leq 0.05$); **D e E**: imagens mostrando a marcação de GFAP; **F**: histograma da densidade de pixels de locais imunorreativos de GFAP após segmentação de cor pelo software GIMP 2.6.4. Dados são expressos como média \pm S.E., Teste T de Student. Barra = 100 μ m.

6.2.2 Western Blotting

Em neonatos, o PNV causou uma tendência inicial de diminuição na expressão de AQP4 seguido por um subsequente aumento. Em adultos, após uma tendência inicial a uma expressão maior de AQP4, esta foi mantida praticamente ao nível basal.

A expressão de AQP4 em animais controle e tratado foi maior em adultos quando comparados aos neonatos às 2 e 5 horas (Figs. 18A, C). Às 5h, a expressão basal da proteína foi 84% mais elevada em adultos em relação aos P14 (### $p \leq 0,001$) (Fig. 18B). Em ratos envenenados, a expressão da proteína foi 53,6% superior em adultos ($p \leq 0,05$) em relação aos neonatos. Às 24h, a expressão de AQP4 em P14 foi não significativamente maior quando comparada aos adultos.

A análise do Three-way mostrou que há diferença entre animais tratados P14 2hs em relação aos de 24h e nos de 5h em relação aos de 24h.

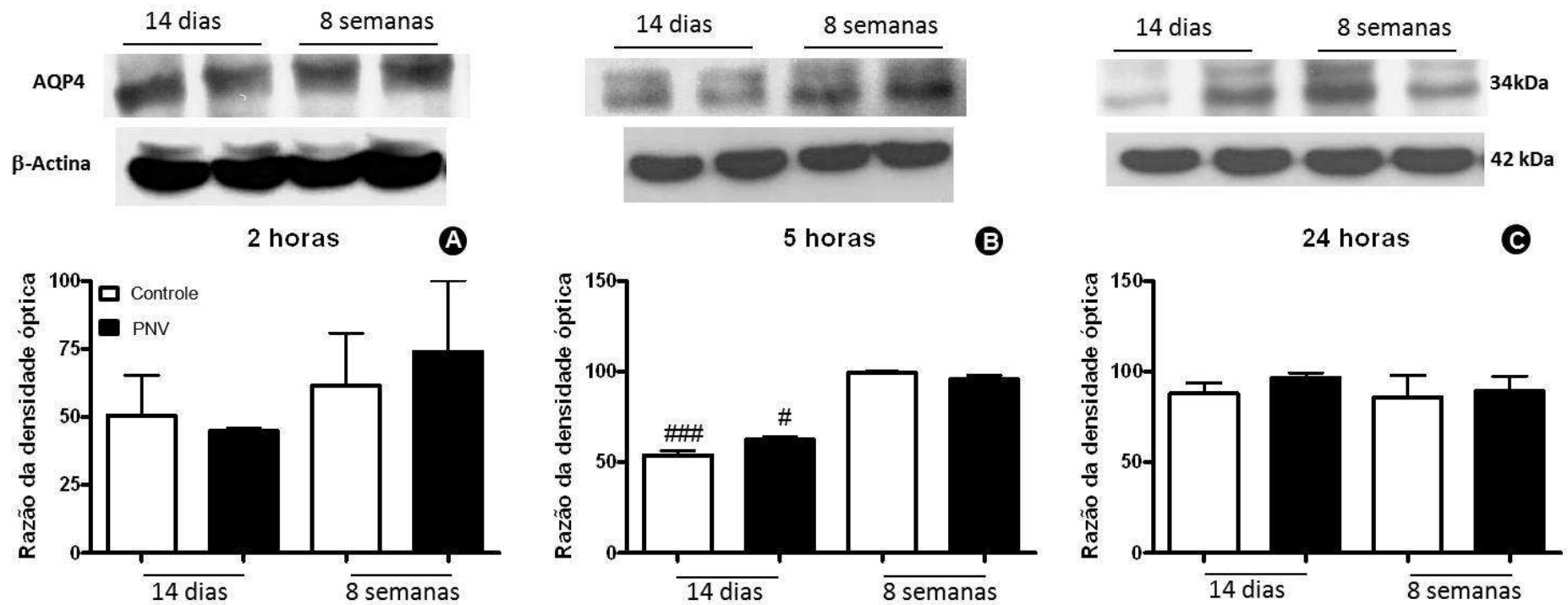


Figura 18 – A, B e C: Western blotting de AQP4 no hipocampo de ratos neonatos (14 dias) e adultos (8 semanas) às 2h, 5h and 24h, respectivamente. Em ratos P14, o PNV causou uma tendência inicial a diminuir a expressão de AQP4 seguido por um subsequente aumento não-significativo. Em adultos, após uma tendência inicial ao aumento, a expressão de AQP4 foi mantida praticamente igual aos controles. ### $p \leq 0.001$ e # $p \leq 0.05$ denota diferenças relacionadas a idade entre controles e PNV. Dados foram da média \pm S.E., Teste T (não pareado). A proteína β -actina foi usada como controle interno.

6.2.3 PCR em tempo real

O PNV induziu diminuição inicial do RNAm de AQP4 por um tempo maior em neonatos do que em adultos. Em animais P14 envenenados, a grande expressão de RNAm de AQP4 ocorreu mais tardiamente (às 24 horas) quando comparada a de adultos envenenados (5h), indicando uma alta capacidade de recuperação em ratos adultos.

Em animais P14, verificou-se diminuição imediata de 23,5% do RNAm às 2h e um decréscimo acentuado de 47,4% às 5 horas, seguida por um aumento de 17,2% em relação ao controle. Tais períodos não atingiram significância estatística porque houve uma variabilidade individual nos dados do RNAm (Fig.19).

Nos animais adultos, o PNV induziu um decréscimo de 42% no RNAm de AQP4 às 2h, o qual foi seguido por um aumento acentuado de 140% acima do respectivo controle (** $p \leq 0,01$). Após 24h, a transcrição da proteína foi aparentemente estabilizada, sendo que foi mantida praticamente a mesma desde 5 horas PNV.

A análise do Three-way demonstrou que houve interação entre as variáveis tratamento vs idade vs tempo, principalmente entre os animais tratados 5h P14 e adultos (# $p \leq 0,01$).

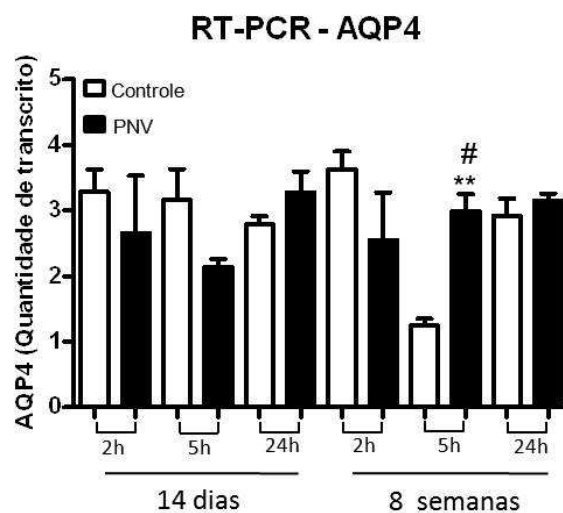


Figura 19 - PCR em tempo real de AQP4 do hipocampo de ratos neonatos e adultos após 2, 5 e 24h de administração de salina ou PNV. Note que o período de 5 horas PNV em adultos apresentou diferença significativa em relação ao controle (** $p \leq 0,01$), assim como seu tratado comparado ao dos animais P14 (# $p \leq 0,05$). Dados foram expressos como média \pm S.E. Teste T de Student. A proteína GAPDH foi usada como controle interno.

7. DISCUSSÃO

7.1 Cerebelo

7.1.1 Imunohistoquímica

Dentre as consequências do envenenamento experimental por *P. nigriventer* em ratos podemos citar o edema perivascular, inchaço dos pés astrocitários e extravasamento de traçador extracelular (Le Sueur et al., 2003; Rapôso et al., 2007) indicativos de quebra da barreira hematoencefálica. Os sinais excitotóxicos exibidos pelos animais, e indicativos de neurotoxicidade, estão associados ao aumento no transporte vesicular intracelular (Le Sueur et al., 2004) e deslocamento e fosforilação de proteínas juncionais de adesão e oclusão relacionadas à prevenção do transporte paracelular (Rapôso et al., 2012). Além disso, o veneno causa gliose astrocitária e aumento na expressão das proteínas GFAP, S100 e nNOS e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ em astrócitos do cerebelo e hipocampo de ratos, o que implica no envolvimento ativo destas células gliais no envenenamento e na quebra da BHE (Cruz-Höfling et al., 2009). Em cultura primária de astrócitos derivados do córtex, o veneno inibe a atividade da glicoproteína P (P-gp), uma proteína de resistência múltipla às drogas (MDR), pertencente à família de proteínas transportadoras de efluxo (ABCB1), que no cérebro tem função protetora ao tecido contra compostos com potenciais de risco (Bodo et al., 2003). Já em experimentos *in vivo*, o veneno aumenta de maneira transitória a expressão da P-gp (Rapôso et al., 2012). Neste trabalho, o PNV induziu aumento da expressão de AQP4 em astrócitos do cerebelo evidenciando um novo papel de neutralizar os efeitos do veneno eventualmente. Apesar de ser geralmente descrita nos pés dos prolongamentos astrogliais e associados a compartimentos contendo fluidos, incluindo a BHE, encontramos forte imunorreatividade da AQP4 também nos interstícios entre os neurônios das camadas granular e de Purkinje e também ao redor de microvasos. Na camada molecular, a expressão de AQP4 ocorreu em minúsculas ramificações da glia de Bergmann que se estendem por toda a extensão da camada molecular. Não houve expressão de AQP4 nos neurônios do córtex cerebelar corroborando a sugestão de que a homeostase da água, e, provavelmente, o

tamponamento de K^+ são eventos realizados seletivamente por astrócitos (Nico et al., 2002; Verkman et al., 2006).

Este trabalho mostrou que a expressão fisiológica de AQP4 tendeu ser mais elevada em animais P14 do que em adultos injetados com solução salina. Os resultados obtidos contrastam com estudos prévios onde a expressão pós-natal de AQP4 em ratos P14 foi 25% do observado em adultos (Wen et al., 1999). No entanto, no estudo de Wen e colaboradores os ratos adultos tinham 14 semanas de idade (56 dias), enquanto que no presente estudo os ratos tinham 8 semanas de idade (32 dias). Além disso, aqui a expressão da proteína foi avaliada por medição da densidade dos pixels da imunorreatividade de AQP4 em astrócitos das camadas granular (CG), molecular (CM) e Purkinje (CP) e da substância branca (SB) separadamente, enquanto no estudo de Wen e colaboradores (1999), a expressão de AQP4 foi avaliada por imunoblotting da fração da membrana de todo o cerebelo. Dessa forma, tais discrepâncias podem estar relacionadas às diferenças no desenho metodológico.

A exposição ao veneno de *P. nigriventer* causou expressão diferencial de AQP4 em astrócitos, dependendo da região considerada, do tempo após o envenenamento e da idade dos animais. Logo após 2h de PNV, a expressão de AQP4 aumentou em 83% na CG e 44% na CM de animais P14 e 60% na CG de adultos. Estes valores mudaram depois de 24h para um aumento de 77,5% em astrócitos da SB e 101,6% na CM de ratos P14 e 103% da SB, 52% da CM e 91,8% em astrócitos da CG em ratos de 8 semanas de idade.

Sob as condições experimentais presentes, a análise de variância Three-way confirmou que o tempo após o envenenamento influenciou fortemente a expressão da proteína induzida pela exposição ao PNV, o que parece lógico, uma vez que a concentração local do veneno provavelmente diminuiu devido à eliminação do mesmo do tecido. O veneno afetou mais intensamente a expressão de AQP4 na CM dos animais P14 do que em adultos, enquanto o oposto ocorreu para a SB, onde o efeito do veneno induziu uma maior expressão de AQP4 em adultos em relação aos P14. Além disso, o envenenamento aumentou a expressão da proteína na CG de adultos enquanto em neonatos permaneceu inalterada. Como mostrado, a despeito da preponderância de AQP4 em astrócitos da substância cinzenta sobre os da substância branca, os dados sugerem que a proteína pode estar mediando eventos distintos nos dois compartimentos,

ou seja, promovendo remoção de excesso de K^+ oriundo da transmissão sináptica no primeiro (substância cinzenta) e homeostase de fluidos no segundo (substância branca).

Nossos dados não permitem esclarecer o mecanismo por trás das diferenças regionais entre substâncias branca e cinzenta na expressão de AQP4 em animais P14 e adultos ao longo do tempo (2h até 24h). Os dois compartimentos possuem duas populações de astrócitos distintos em sua morfologia e características funcionais. Os astrócitos protoplasmáticos estão confinados dentro da substância cinzenta e possuem profusos prolongamentos citoplasmáticos ramificados e curtos que envolvem contatos sinápticos, o que sugere que AQP4 em tais astrócitos pode ter um papel fundamental na atividade neural. Os astrócitos fibrosos da substância branca têm poucos porém longos processos, embora menos ramificados, cujas terminações distais estabelecem contatos próximos com nós de Ranvier das fibras nervosas mielinizadas (Wang & Bordey, 2008). Na substância branca, a AQP4 seria sugestivamente, mas não exclusivamente, envolvida na regulação da bomba Na^+/K^+ responsável pela transmissão saltatória. Os pés terminais distais dos dois tipos de astrócitos estariam nos respectivos compartimentos também envolvidos com a microvasculatura da BHE e neste caso, o papel da AQP4 seria mais relacionado à homeostase da água no sistema nervoso (Nico et al., 2002). Embora seja razoável sugerir que as especificidades regionais, tanto em termos de tipos de populações de neurônios e de astrócitos, quanto as características neuroquímicas da substância branca e cinzenta fundamentariam as diferenças observadas na expressão da AQP4, os resultados atuais oferecem ferramentas limitadas para embasar tal hipótese.

O veneno de *Phoneutria nigriventer* contém potentes peptídeos neurotóxicos que interferem na fisiologia dos canais iônicos e, portanto, na captação/liberação de neurotransmissores e causa sinais excitatórios (Fontana & Vital Brasil, 1985; Love & Cruz-Höfling, 1986; Gomez et al., 2002; Pinheiro et al., 2006). Dados da literatura mostram que o veneno ativa e/ou atrasa a inativação dos canais de Na^+ sensíveis à TTX, bloqueia os canais de K^+ e Ca^{2+} e não só bloqueia a excitação do glutamato, como também inibe a sua captação (Prado et al., 1996; Vieira et al., 2003; Mafra et al., 1999). Além disso, o PNV ativa os neurônios que expressam as proteínas Fos após a ativação dos oncogenes de cFos (Cruz-Höfling et al., 2007) e causa neuroinflamação (Cruz-Höfling et al., 2009). Corroborando os dados acima, observaram-se mudanças na

atividade elétrica dos neurônios de ratos expostos ao PNV, inferindo que a ação de neurotoxinas sobre os canais de Ca^{2+} , K^+ e Na^+ (Gomez et al., 2002) geram distúrbios na neurotransmissão, os quais foram por eletroencefalográficos (EEG) em nosso laboratório (Ferrari et al., 2010). Todos estes efeitos são consistentes com alterações neuroquímicas e metabólicas no microambiente do cerebelo, afetando as células em cesta e estreladas e de interneurônios da CM, os neurônios de Purkinje da camada de Purkinje e os neurônios granulares e interneurônios de Golgi da CG. Do mesmo modo, infere-se que estas alterações afetam a chegada de informações para o córtex cerebelar através das fibras aferentes musgosas e trepadeiras que entram através da camada granular para fazer sinapse com as células de Purkinje e células granulares (ver Barlow, 2002). Em suma, os resultados do presente estudo fornecem evidências convincentes de que o PNV interfere na expressão de AQP4. A modulação regional da proteína dependeria da interação entre os astrócitos e as características neuroquímicas e estruturais do cerebelo em uma dada região.

Estudos anteriores provam que os astrócitos são fundamentais para a atividade neuronal (Kimelberg & Nedergaard, 2010). Eles estão envolvidos no controle da homeostase cerebral que envolve a recaptação de K^+ extracelular e de aminoácidos excitatórios após a atividade neuronal; atuam ainda no equilíbrio do cálcio, na produção de fator de crescimento neural, no desenvolvimento e manutenção da BHE, na permeabilidade dos vasos sanguíneos, no fluxo de sangue, no fornecimento de glicose, na formação de cicatriz após lesão cerebral, dentre outros. A agressão ao SNC promove uma resposta imediata de astrócitos reativos que migram para o local da lesão, aumentando a expressão de GFAP, uma resposta chamada astrogliose reativa e considerada neuroprotetora (Li et al., 2008). O presente estudo comprovou o aumento da expressão de AQP4 em paralelo ao aumento da expressão de GFAP com ambas as proteínas expressas em astrócitos. Os resultados deste trabalho mostraram aumentos sinérgicos na expressão de AQP4 e GFAP em algumas regiões, dependendo do tempo após o envenenamento. Verificou-se que a AQP4 e o GFAP aumentaram em paralelo na SB de animais P14 e na CM dos animais com 8 semanas 24h após o envenenamento (ver Figuras 8 e 10) e na CG de animais adultos tratados com PNV após 2h (Figura 9). Em outros períodos houve aumento não-paralelo de AQP4 ou GFAP. O PNV induziu um aumento de GFAP em astrócitos protoplasmáticos da CM (chamados de glia de

Bergmann) em todos os tempos e nos astrócitos protoplasmáticos da CG às 2 e 5h e em astrócitos da CP de animais P14 após 24h. Assim como para a AQP4, o aumento da expressão de GFAP foi confinada aos astrócitos protoplasmáticos da substância cinzenta, exceto nos presentes na CP dos animais adultos. Isto é interessante porque sabe-se que, enquanto apenas um ou dois prolongamentos de astrócitos protoplasmáticos tem contato com microvasos ou com a pia-mater, a grande maioria deles são perisinápticos, tanto em compartimentos pré quanto pós-sináptico, e, portanto, em contato estreito com a comunicação entre os neurônios da substância cinzenta. Revisões recentes relatam que tanto os pés terminais vasculares e os sinápticos dos astrócitos exibem segregação de proteínas integrais de membranas, criando *loci* autônomos que contêm diferentes transportadores, canais, receptores ou densidades diferentes deles (ver Wang & Bordey, 2008;. Kimelberg, 2010; Kimelberg & Nedergaard, 2010 para revisão). Este tipo de organização do domínio da membrana da glia permite dinâmicas diferenciais na transdução de sinais neurais, fluxo de sangue e homeostase de fluidos (Reichenbach et al., 2010). Se a modulação diferencial sofrida por AQP4 e GFAP estaria associada à especificidade funcional do compartimento (substância branca, camada molecular, granular ou de Purkinje) em relação a interações entre neurônios e astrócitos e/ou à heterogeneidade dos tipos de neurônios e astrócitos do córtex cerebelar (Matyash & Kettenmann, 2010) não está esclarecido ainda. No entanto, o complexo arranjo local/celular do cerebelo pode prever um cerebelo não homogêneo no que diz respeito ao tratamento de água, à transdução de sinais neurais e ao tamponamento de K^+ o que poderia explicar a expressão diferencial de AQP4 nos diferentes compartimentos em resposta ao PNV.

Este trabalho sugere que os componentes farmacologicamente ativos do PNV modificam a expressão funcional de AQP4 e GFAP de uma maneira distinta em diferentes compartimentos do cerebelo examinados. A expressão funcional diferencial teria por base as diferenças nas populações celulares locais e nas diferenças moleculares e características neuroanatômicas e neuroquímicas dos compartimentos em função do período pós-natal de desenvolvimento. Pode-se inferir também que mudanças na expressão de AQP4 podem ter impacto sobre a fisiologia da BHE por conta da ação do PNV.

Considerando-se que a gliose é um mecanismo para a neuroproteção (Li et al., 2008),

o aumento da expressão de AQP4 em ratos neonatos sem um aumento concomitante de GFAP pode ser um mecanismo compensatório para a proteção contra a toxicidade do PNV. No entanto, ainda não está claro a razão do aumento de GFAP em paralelo ao de AQP4 na SB de ratos P14 (24h), na CM de adultos (24h) e na CG de adultos (2h).

7.1.2 Western Blotting e PCR tempo real

O presente estudo demonstra um aumento no nível de AQP4 cerebelar em ratos neonatos e adultos 2 e 5 horas após a exposição ao PNV, que foi acompanhada por tendência de aumento correspondente na expressão de RNAm desta proteína em todos os períodos estudados. Aumentos na AQP4 e/ou na expressão de seu RNAm têm sido associados com edema cerebral e perda de fluidos e homeostase de íons/neurotransmissores em locais da BHE e perisinápticos, respectivamente. Uma menor expressão de AQP4 e formação de edema foram descritos na lesão cerebral traumática (Ke et al., 2001, Kiening et al., 2002), isquemia cerebral e hipóxia (Sato et al., 2000, Kaur et al., 2006). Por outro lado, grande expressão de AQP4 foi observada em tumores cerebrais (Saadoun et al., 2002) e em edema pós-isquêmico (Taniguchi et al., 2000). Os autores associam a baixa expressão de AQP4 e BHE intacta com edema citotóxico, que é aquele onde o fluido se acumula no interior dos astrócitos perivasculares. Contrariamente, a maior expressão de AQP4 foi associada com quebra da BHE e edema vasogênico, onde o fluido derivado do sangue é drenado para o espaço extracelular (Ke et al., 2001; Verkman et al., 2006).

Em estudos recentes, verificou-se que o edema citotóxico/intracelular ocorre no cerebelo nos primeiros 15 min a 5 h após o envenenamento (Rapôso et al., 2007), simultaneamente com a redistribuição e fosforilação das proteínas juncionais, diminuição da laminina e proteína transportadora de efluxo P-gp (Raposo et al., 2012). As maiores reduções de todas as proteínas ocorreram logo após 15 min de envenenamento com tendência a recuperação mais tardiamente. Todavia, não há evidência clara de edema vasogênico/extracelular em curtos períodos de tempo após a exposição ao veneno mas somente 3 dias após a injeção de PNV (Le Sueur et al., 2003). No entanto, aqui encontramos aumento significativo de AQP4 no cerebelo inicialmente às 2 horas e 5 horas após a administração do PNV. Além disso, Stávale e colaboradores (2013) relataram expressão significativa da AQP4 por PNV às 24 h na substância

branca de ratos neonatos e adultos, às 2 e 5 h em P14 e às 2 e 24 horas em adultos na camada granular, e entre 2 e 24 h em P14 e às 24 h em adultos na camada molecular. Essa aparente discrepância sugere que em diferentes regiões do cerebelo de ratos envenenados, ambos os tipos de edema podem estar presentes. De fato, a regulação positiva de AQP4 em algumas camadas do cerebelo e não em outras ao longo do tempo (Stávale et al., 2013) parece apoiar esta interpretação. Consistentemente com isto, na maioria das situações clínicas há uma combinação de tipos de edema durante o curso de tempo do estado patológico, principalmente quando existe neuroinflamação por ativação de citocinas inflamatórias (Rabinstein, 2010, Fukuda & Badaut, 2012), como é o caso do envenenamento experimental por PNV (Cruz-Höfling et al., 2009). O potencial de co-existência de dois tipos de edema implica que a BHE, bem como o complexo molecular dos processos astrocitários, não são afetados de forma homogênea através de todo parênquima cerebelar em ratos administrados com PNV. Isto está de acordo com o conceito de que a dinâmica de abertura da BHE pode mudar em uma mesma região do cérebro e em diferentes porções de um mesmo vaso cerebral (Saubaméa et al., 2012). Os autores sugerem que o comportamento da BHE não é uniforme em toda a região porque os mecanismos regulatórios modulam domínios restritos ao longo da BHE.

Domínios membranares restritos são uma característica de astrócitos. O astrócito, tal como sugerido pelo seu nome, possui longos processos ramificados que se espalham através da neurópila, possibilitando o contato com células heterogêneas ou diferentes domínios da mesma membrana plasmática (tal como partes da membrana plasmática endotelial, axolemas sináptico e extra-sináptico de neurônios, outras células da glia, pericitos e vasos sanguíneos). Tal diversidade de contatos confere a membrana plasmática de astrócitos *loci* verdadeiros ou pontilhados com receptores, transportadores ou canais de água e íons, sendo que o tipo ou a densidade deles está relacionado com a dinâmica do microambiente (ver Wang e Bordey et al., 2008; Kimelberg, 2010; Kimelberg & Nedergaard, 2010 para revisão). Isso cria domínios de membrana autônomos em um mesmo astrócito, cada domínio com uma dinâmica própria no controle do fluxo de sangue, transdução de sinal neural, tamponamento de K^+ e homeostase dos fluidos (Reichenbach et al., 2010). Tais achados reforçam a visão sobre a heterogeneidade do fenótipo BHE acoplado a heterogêneos domínios de membrana de astrócitos.

Como as mudanças na AQP4 estão relacionados a mudanças no funcionamento da BHE e o funcionamento da BHE varia inter e intra-regionalmente (Saubaméa et al., 2012), sugerimos que expressões da AQP4 variam através do parênquima cerebelar como confirmado anteriormente (Stávale et al., 2013). Esta interpretação está de acordo com Amiry-Moghaddam e colaboradores (2004), que afirmam que as diferenças na distribuição e densidade da membrana de AQP4 provavelmente refletem diferenças no curso do tempo de desenvolvimento de edema entre as regiões do cérebro. Os autores referem-se à concentração elevada de AQP4 no cerebelo com ênfase na sua presença acentuada na camada granular. Isto apóia as observações atuais e anteriores que mostraram maior imunomarcção anti-AQP4 nos astrócitos protoplasmáticos da camada granular, seguida por aqueles da camada molecular e substância branca (Stávale et al., 2013).

Agregados supramoleculares intramembranosos formam a AQP4 e são denominados arranjos ortogonais de partículas (AOPs) na membrana glial (Landis & Reese, 1974, Wolburg et al., 2011). A proteína do canal de potássio Kir 4.1 está co-localizada com a AQP4 no mesmo domínio da membrana glial, apresentando evidências consistentes sobre um provável acoplamento funcional entre o transporte de água e tamponamento de K^+ (Nielsen et al., 1997; Nagelhus et al., 1999). Tamponamento de potássio é um processo pelo qual canais retificadores de K^+ (Kir4.1) presentes nos pés astrocitários carregam a maior parte das correntes de K^+ liberadas por neurônios durante a neurotransmissão para vasos sanguíneos (Metea & Newman, 2007). Além disso, a AQP4 está co-localizada com o transportador de glutamato-1 (GLT-1) astrocitário, com a diferença de que este último está altamente concentrado sobre a membrana voltada para a neurópila. O GLT-1 controla rigidamente o nível de glutamato extracelular em locais perisinápticos para abaixo do nível neurotóxico a fim de prevenir excitotoxicidade e, eventualmente, danos neuronais. Tal como a AQP4, domínios de membrana astrocitários ricos em Kir 4.1 e GLT-1 estão dispostos juntos e contínuos a BHE e axolema perinodal, o que indica que as três proteínas têm papel chave na manutenção da homeostase do cérebro (Nielsen et al., 1997). Mais pesquisas são necessárias para esclarecer se a predominância de AQP4 na camada granular está associada à prevalência de interrupção da BHE, ativação neuronal e atividade excitotóxica na região, em resposta ao PNV.

Um estudo recente demonstrou que o PNV induz a ativação neuronal, onde o óxido nítrico (NO) derivado de nNOS atua como um mediador (Cruz-Höfling et al., 2007). É interessante notar que o poro central do canal de água da AQP4 é relatado por servir como um reservatório para o NO no interior da membrana de astrócitos e como condutor de óxido nítrico liberado (Wang & Tajkhorshid, 2010). Considerando-se que as toxinas contidas no PNV podem bloquear a captação de glutamato (Mafra et al., 1999), os astrócitos assumem um papel relevante no controle do nível neurotóxico deste aminoácido excitotóxico. Isto é particularmente relevante em termos de glia de Bergmann que expressa abundantes receptores de glutamato NMDA ao longo dos processos celulares. Estudos farmacológicos são agora necessários para revelar se a expressão de AQP4 está acoplada ao sistema NO/nNOS e GLT-1 no envenenamento por *Phoneutria*.

Comparações entre as idades em relação ao nível de AQP4 em animais P14 e adultos mostraram que a expressão basal de AQP4 e RNAm de AQP4 é maior em adultos do que em P14. Os dados estão de acordo com a literatura que indica que os animais jovens possuem um nível mais baixo de AQP4 do que os adultos (Wen et al., 1999). No entanto, isto contrasta com o nosso estudo anterior baseado na imunohistoquímica que indica que a expressão de AQP4 foi geralmente maior no cerebelo de P14 do que em ratos adultos (Stávale et al., 2013). Nesse estudo, a expressão da proteína foi determinada através de segmentação de cor que permite a captura seletiva dos locais imunorreativos de antígeno-anticorpo. A medição das densidades ópticas dos pixels de locais reativos de AQP4 foi avaliada separadamente da substância branca e camadas molecular, Purkinje e granular da substância cinzenta do cerebelo em 2, 5 e 24 h após a injeção de salina e PNV. Sugerimos que os aumentos ou diminuições da expressão AQP4 revelada por coloração com anti-AQP4 foram dissipadas quando a proteína total foi medida no homogenato de cerebelo. Isso explicaria os dados não correspondentes de expressão de AQP4 avaliadas por Western blotting e imunohistoquímica.

Nossos resultados também mostraram uma alta variabilidade inter-individual na expressão de AQP4 e RNAm. Ao refletir intrínsecas dinâmicas individuais da rede neuronal e neurotransmissão, a variabilidade individual também anula possíveis diferenças inter-grupos (tratamento e faixas etárias). Aqui, a variabilidade inter-

individual foi observada principalmente em ratos com 14 dias de vida pós-natal. O cérebro do rato Wistar neonato aumenta acentuadamente, primeiro através de neurogênese e, posteriormente, através de gliogênese e neurogênese resultando em mudanças marcantes durante a vida pós-natal (Bandeira et al., 2009). No cerebelo, o desenvolvimento pós-natal não é linear em diferentes compartimentos e o crescimento completo é atingido vários meses após o nascimento (Wang & Zoghbi, 2001). Além disso, os cérebros dos neonatos possuem diferenças marcantes no manuseio de água (Wen et al., 1999), ampliação dos espaços extracelulares (Lehmenkhuler et al., 1993), vasculogênese e desenvolvimento (imaturo) da BHE (Rodier, 1995). Por isso, os mecanismos regulatórios envolvidos no controle da expressão da proteína estão em progresso em animais P14 que ainda se encontram na idade de aleitamento. Sugerimos que o conjunto de alterações pós-natal e características do cerebelo é responsável pela variabilidade individual no metabolismo da água e expressão de AQP4 e RNAm. Sugerimos também que o edema acentuado em torno de células de Purkinje danificadas observados em animais P14 reflete a vulnerabilidade do cerebelo em neonatos em relação aos adultos.

7.2 Hipocampo

7.2.1 Imunohistoquímica

O hipocampo, juntamente com o córtex cingulado, a amígdala e o córtex olfativo, formam o sistema límbico localizado no córtex cerebral e compõe a base neural da emoção. Também está associado com a memória recente e aprendizagem, sendo a primeira estrutura afetada na doença de Alzheimer, além de estar relacionado com a esquizofrenia e epilepsia. A sua comunicação com outras partes do cérebro é através do córtex entorrinal (CE), onde as camadas superficiais do CE fornecem os elementos mais importantes para o hipocampo e as camadas profundas recebem as saídas mais proeminentes. Dentro do hipocampo, o fluxo de informação é unidirecional, em grande parte, aos sinais que se propagam através de várias camadas de células como giro denteado, camada CA3, camada CA1, subículo e, finalmente, para o CE. Cada uma

destas camadas contém também circuitos extensos e complexas conexões longitudinais intrínsecas (Szilágyi et al., 2011).

O veneno de *P. nigriventer* provoca redistribuição de proteínas juncionais dos contatos células endotelial-endotelial, altera a expressão da laminina da membrana basal, causa inchaço dos astrócitos perivasculares e extravasamento de fluido para o espaço extracelular, indicando a formação de edema e permeabilidade da BHE no cerebelo e no hipocampo (Le Sueur et al., 2003; Rapôso et al., 2007, 2012). O PNV também ativa neurônios e induz a expressão de GFAP, S100 e citocinas pró-inflamatórias em astrócitos do cerebelo e hipocampo com evidências de mediação do óxido nítrico (NO) derivado do nNOS (Cruz-Höfling et al., 2007, 2009). Por outro lado, a expressão de aquaporina 4 tem sido associada à abertura da BHE e formação e/ou resolução de edema, excitabilidade neuronal e neuroinflamação (Nico et al., 2002; Verkman et al., 2006; Li et al., 2011; Binder et al., 2012).

A AQP4 é uma proteína de membrana que forma os canais de água, envolvida no transporte de água e abundantemente presente no cérebro, principalmente ao longo dos pés astrocitários em contato com capilares, células ependimais e superfície pial (Nico et al., 2002). Diversas funções estão associados com esta proteína, incluindo a migração e transdução neuronal, a formação de edema citotóxico e resolução de edema vasogênico, balanço hídrico no cérebro, tamponamento de K^+ , entre outros (Nielsen et al., 1997, Papadopoulos et al., 2004). O seu envolvimento com edema foi bem descrito ao longo dos anos, mostrando que vários distúrbios neuronais, tais como isquemia e glioblastoma, estão associados a um aumento ou a inibição dessa proteína (Verkman et al., 2006, Manley et al., 2000). Estudos mostraram que a AQP4 presente nos astrócitos perivasculares tem sido correlacionada à abertura da BHE e poderia atuar como um marcador de integridade da mesma (Thomas-Camardiel et al., 2005).

Nossos estudos anteriores mostraram que a exposição de ratos adultos (8 semanas de idade) e neonatos (14 dias pós-natal) ao veneno de *Phoneutria nigriventer* aumenta a expressão de aquaporina 4 no cerebelo (Stávale et al., 2013). Quando a densitometria de pixels da imunorreatividade de AQP4 é medida compartimento por compartimento (substância branca e camadas molecular, Purkinje e granular da substância cinzenta), o nível basal da proteína mostra tendência para ser mais elevada em ratos P14. No entanto, se a quantificação é obtida através de análise de western blotting, a expressão

basal da proteína, bem como a produção de RNAm, é maior em adultos do que em neonatos, tanto em níveis fisiológicos como após envenenamento por PNV.

7.2.2 Western Blotting e PCR em tempo real

Diferenças na expressão basal de aquaporina 4 e RNAm entre os animais injetados com solução salina (Age-related differences)

Os resultados deste trabalho mostraram que na camada piramidal CA1 do hipocampo a expressão basal média de aquaporina 4 foi maior nos neonatos P14 do que nos adultos de 8 semanas. Entretanto, nas camadas piramidais CA2 e CA3 e no GD foi o contrário, isto é, a expressão basal de AQP4 foi maior nos adultos do que nos neonatos. Ao avaliarmos a expressão basal de AQP4 no cerebelo total, através de análise por western blotting, os dados confirmaram que os adultos apresentavam maior quantidade basal de AQP4 do que os neonatos. Esses dados podem indicar que nos animais de 8 semanas de idade a densidade de células astrocitárias é maior do que nos animais com 14 dias e portanto maior quantidade de proteína pode ser produzida em nível fisiológico. Não foi determinada a densidade das células gliais para verificação da validade da hipótese.

O papel dos astrócitos nas diferentes atividades do sistema nervoso central tem sido bem estudado e discutido. É sabido que os astrócitos desempenham funções importantes relacionadas à migração e maturação de neurônios, à plasticidade neural, produção de fatores neurotróficos, formação da bainha de mielina, regulação da concentração de íons e neurotransmissores na região perisináptica, metabolismo neuroquímico, suprimento de energia e resposta à injúria do microambiente. Os astrócitos, dentre as células gliais, são os que tem papel chave no desenvolvimento do sistema nervoso (Kimelberg, 2010; Kimelberg & Nedergaard, 2010). Maior quantidade de astrócitos pode estar associada a mecanismos moleculares neuroprotetores mais eficientes, tais como a regulação da homeostase da água, o tamponamento iônico e de neurotransmissores e a excitabilidade neural, dentre outros.

Com relação ao RNAm da AQP4, a expressão basal média foi 18.5% maior nos neonatos do que nos adultos, sendo que 5 horas após a injeção de salina houve um pico e a quantidade de RNAm nos neonatos estava 153% maior do que nos adultos. Esse

resultado não se correlaciona com os valores obtidos com o western blotting ou com a imunohistoquímica. Em muitos organismos procariotos e eucariotos, somente 50% ou menos na variação na concentração de proteína é explicada pelas variações nas concentrações de RNAm. Vários estudos apontam que a tentativa de correlacionar os valores translacionais aos valores transcricionais é uma tentativa de simplificação de um processo de alta complexidade. É comum encontrar-se em estudos proteômicos quantitativos o aumento da produção de determinada proteína em determinada situação patológica enquanto o gene codificador da mesma encontra-se em nível baixo. Isso ocorre porque os processos translacionais e transcricionais podem ser regulados por mecanismos divergentes, por exemplo, envolvendo proteínas que são fatores de transcrição e também pequenas moléculas de RNA não codificadoras tais como os RNA microarrays (miRNAs). Os miRNAs são essencialmente repressores translacionais; sua ausência em condições fisiológicas ou patológicas podem contribuir para aumentar o nível de proteína traduzida de um dado RNA alvo sem alterar a quantidade de RNA. Ou seja, cada gene tem várias características e fatores regulatórios que modulam a translação e degradação da proteína e essa extensa regulação pós-translacional leva geralmente à baixa correlação entre a quantidade de RNAm e de proteína (ver De Sousa Abreu et al., 2009; Schwanhäusser et al., 2011)

Diferenças na expressão de aquaporina 4 entre os animais neonatos e adultos injetados com PNV (Age-related differences)

A administração intraperitoneal do PNV induziu nas camadas do hipocampo alterações diferenciais da expressão da aquaporina 4. Por exemplo, na camada piramidal CA1, embora a expressão de AQP4 permanecesse maior nos neonatos do que nos adultos, a diferença na expressão média se alterou, passando de 22.6% maior nos neonatos em relação aos adultos injetados com salina para apenas 8.6% maior nos neonatos injetados com PNV em relação aos adultos injetados com PNV. Igualmente, nas camadas piramidais CA2, CA3 e GD dos animais injetados com PNV a expressão (média) da AQP4 continuou maior nos adultos em comparação ao P14. Entretanto, enquanto nos animais controle a média de expressão basal de AQP4 era 135% maior nos adultos (sendo que o pico foi às 2 horas quando o nível de AQP4 estava 226% maior nos adultos) do que nos P14, após a exposição ao PNV o nível da proteína nos

adultos estava apenas 12% maior que nos P14. A camada CA3 mostrou média de expressão basal 11% maior nos adultos controles do que nos neonatos enquanto nos animais envenenados o nível de AQP4 passou a ser equivalente. A camada GD (dentate gyrus= giro denteado) nos adultos expostos ao PNV mostrou que a expressão média de AQP4 era 5.8% maior nos adultos do que em neonatos, ao passo que a expressão média basal nos adultos controles era 65.8 % maior que nos neonatos (pico às 5h pós-envenenamento quando a expressão de AQP4 foi 118.8% nos adultos maior que nos P14).

Os dados do western blotting que, diferentemente da imunohistoquímica que avalia a expressão da proteína por camada, quantifica a produção no hipocampo como um todo confirmou que os ratos adultos apresentavam maior expressão da proteína que os P14. Contudo enquanto nos animais adultos controles a diferença era de 28.6% a mais que nos P14 (às 5 horas o pico da diferença foi da ordem de 84.13%), nos animais envenenados caiu para 26.9% (às 5 horas pós-PNV foi 53.6%). Dados recentes sugerem que existe uma grande heterogeneidade de tipos morfológicos de astrócitos em diferentes camadas que compõem o CA1 e GD (Wallraff et al., 2006), os quais também promovem expressões desiguais de AQP4 e GFAP nestas regiões do hipocampo. Stávale e colaboradores (2013) mostraram que as substâncias cinzenta e branca do cerebelo têm respostas diferentes depois de envenenamento por PNV e isso foi associado a vários tipos de astrócitos protoplasmáticos ou fibrosos presentes em cada região que podem influenciar este comportamento. Diferenças na expressão de AQP4 em animais jovens e adultos pode estar relacionada com o desenvolvimento cerebral de cada um. Hsu e colaboradores (2011) demonstraram que o período de desenvolvimento em camundongos (recém-nascidos a jovens adultos) tem uma grande expressão de AQP4 com níveis desiguais durante esse intervalo, o que poderia explicar os dados encontrados.

Os resultados mostram que houve atividade translacional diminuída com menor concentração da proteína do canal de água por parte dos astrócitos sob a ação do PNV. Observa-se também que há picos onde a diferença na expressão da proteína entre os animais de diferentes idades é maior. Com mais frequência o intervalo de 5 horas após o envenenamento é crítico, pois nesse intervalo de tempo é que os animais adultos exibiram maior diferença em relação aos neonatos. Estudos anteriores em nosso

laboratório indicam que 5 horas após o envenenamento há recobro por parte dos animais do quadro toxêmico e que 12 horas após estes já não evidenciam sinal de intoxicação. Entretanto, as alterações na expressão de algumas proteínas examinadas persistem (Le Sueur et al., 2003, 2004; Mendonça et al., 2012; Stávale et al., 2013). Com relação à atividade transcricional avaliada pela expressão do RNAm, enquanto os adultos controles exibiram 18.46% a mais que os P14 (às 5 h a diferença foi de 153 % a mais), os adultos tratados com PNV mostraram apenas 7.8 % maior expressão de RNAm que os P14.

Os resultados acima demonstram que a aquaporina 4 participa funcionalmente nas alterações provocadas pelo veneno de *P. nigriventer*, uma vez que há regulação da sua expressão fisiológica nos animais adultos e neonatos que receberam o veneno.

A dinâmica da regulação da aquaporina 4 em função do tempo e da idade dos animais.

Imunohistoquímica

Nossos resultados mostraram que o PNV induziu nos neonatos aumento na expressão de AQP4 em CA1 (40%), CA2 (84.5%), CA3 (22.8%) e no GD (69.2 %) em relação aos controles. Nos adultos, o PNV induziu aumento na expressão de AQP4 em CA1 (58%), CA3 (9.3%) e no GD (7.9%) e diminuição em CA2 de 13.8%. Portanto, quando se considerou a expressão da proteína camada por camada do hipocampo o impacto maior do PNV foi sobre os neonatos e nestes o impacto foi em CA2 > GD > CA1 > CA3. Nos adultos somente a camada CA1 mostrou regulação grande da AQP4, enquanto nas camadas CA3 e GD o aumento não chegou a 10% e na CA2 houve diminuição da expressão da aquaporina 4.

Western blotting

Com relação ao efeito do PNV na expressão total da AQP4 no hipocampo os resultados corroboraram os resultados da imunohistoquímica ao mostrar que o impacto do PNV foi maior nos neonatos que nos adultos (6.3% versus 4.9%).

RNA mensageiro

Os resultados do RT-PCR mostraram diminuição de 14.5% na expressão de RNAm nos neonatos, enquanto houve aumento da sua expressão em 11.5% (pico de 140 %, ** $p \leq 0.01$ às 5 horas) nos adultos.

Estudos com animais com deleção dos genes para aquaporina 4 e que identifiquem os mecanismos envolvidos na regulação da aquaporina 4 em animais em que foi administrado o veneno da aranha armadeira são necessários para a compreensão dos efeitos do envenamento em relação à disfunção da BHE e a formação de edema citotóxico e vasogênico.

Sievers e colaboradores (1992) mostraram que as diferentes camadas CA1 e GD são locais importantes na regulação de água e K^+ . Deficiência de AQP4 causa alterações neuronais devido a participação da proteína no tamponamento de K^+ (Tait et al., 2008). Estudos mostram que ratos knockout para AQP4 tinham dificuldades em remover o excesso de K^+ , que ocorre após a liberação de neurotransmissores em atividade sináptica no espaço extracelular (Binder et al., 2004). Além disso, esta proteína está intimamente associada com a α -sintrofina, pertencente a um componente do complexo distrofina que realiza a ligação entre o citoesqueleto e a lâmina basal e os astrócitos podem ser encontradas perto do canal de potássio retificador nestas células (Neely et al., 2001). Ratos knockouts para α -sintrofina tinham dificuldades em realizar o tamponamento de K^+ , demonstrando que a inibição do AQP4 pode causar problemas na atividade neuronal e se o seu envolvimento nestes processos é extremamente necessário (Amiry-Moghaddam et al., 2004).

8. CONCLUSÕES

- A AQP4, uma proteína de membrana envolvida na formação de canais de água, está presente no hipocampo e cerebelo nos pés astrocitários, incluindo na glia de Bergmann;
- A participação da AQP4 no envenenamento por *Phoneutria nigriventer* foi evidenciado. Nosso trabalho não permite afirmar se o envolvimento está restrito a formação do edema perivascular ou é causado por bloqueio de canais de K⁺ ou ativação da excitabilidade de neurônios sabidamente serem efeitos do PNV;
- Houve aumento na expressão de AQP4 em três regiões do cerebelo (granulosa > molecular > substância branca) e pouco evidenciada na camada de Purkinje. A regulação positiva da AQP4 variou de acordo com os períodos analisados, o que está de acordo com a plasticidade da BHE em processos patológicos. É possível que a regulação da AQP4 nos astrócitos também se modifique nas diferentes regiões;
- No hipocampo, a presença de AQP4 foi nítida em todas as camadas (GD>CA1>CA3>CA2), assim como a presença de edema perivascular. Houve variação cronológica e regional na expressão da AQP4 em resposta ao PNV;
- A alteração na expressão da AQP4 e de seu RNAm mostra o envolvimento das proteínas integrais da membrana dos astrócitos formadora de canais de água no envolvimento dos efeitos centrais do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*;
- Uma vez que o PNV provoca sinais excitotóxicos em ratos, a grande expressão de AQP4 em torno de neurônios do córtex cerebelar (granular) e hipocampal pode ser uma resposta reativa de astrócitos contra provável aumento de glutamato e K⁺ resultante de ativação neuronal por PNV (Cruz-Höfling et al., 2007) e mudanças na atividade elétrica dos neurônios (Ferrari et al., 2010).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease* 37: 13–25.

Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S (2002) Aquaporin water channels—From atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 542: 3–16.

Agre P (2004) The Nobel Prize Lectures 2003. Stockholm, Foundation Nobel. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2003/agre-autobio.html. Acesso em 15/12/2012.

Amiry-Moghadam MR, Frydenlund DS, Ottersen OP (2004) Anchoring of aquaporin-4 in brain: Molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience* 129: 997-1008.

Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S (2009). Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *PNAS* 106: 14108-14113.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 16: 1–13.

Barlow JS (2002) *The Cerebellum and Adaptive Control*. Cambridge University Press, New York.

Begley DJ (2004) Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol. Ther.* 104: 29-45.

Benga G (2009) Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present and future. *IUMB Life* 61(2): 112-133.

Benga G (2012) The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: molecular characteristics, functions and medical implications. *Mol. Aspects Med.* 33: 518-534.

Binder DK, Oshio K, Ma T, Verkman AS, Manley GT (2004) Increased seizure threshold in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Neuroreport* 15:259-262.

Binder DK, Nagelhus EA, Ottersen OP (2012) Aquaporin-4 and epilepsy. *Glia* 60(8):1203-14.

Bodo A, Bakos E, Szeri F, Varadi A, Sarkadi B (2003) The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. *Toxicol. Lett.* 140-141: 133-143.

Borgnia M, Nielsen S, Engel A, Agre P (1999) Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 425-458.

Brazil V, Vellard J (1925) Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. *Mem. Inst. Butantan.* Tomo II: 58-70.

Bucarechi F, Deus Reinaldo CR, Hyslop S, Madureira PR, De Capitani EM, Vieira RJ (2000) A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus *Phoneutria*. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo* 42: 17-21.

Cardoso FL, Brites D, Brito MA (2010) Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain research reviews* 64: 328-363.

Carvey PM, Hendey B, Monahan AJ (2009) The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *J. Neurochem.* 111: 291-314.

Cruz-Höfling MA, Love S, Brook G, Duchon LW (1985) Effects of *Phoneutria nigriventer* spider venom on mouse peripheral nerve. *Q. J. Exp. Physiol.* 70: 623-640.

Cruz-Höfling MA, Zago GM, Melo LL, Rapôso C (2007) c-FOS and n-NOS reactive neurons in response to circulating *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Brain Res. Bull.* 1-3: 114-126.

Cruz-Höfling MA; Rapôso C, Verinaud L, Zago GM (2009) Neuroinflammation and astrocytic reaction in the course of *Phoneutria nigriventer* (armed-spider) blood-brain barrier (BBB) opening. *Neurotoxicology* 30: 636-46.

De Lima ME, Figueiredo SG, Pimenta AM, Santos DM, Borges MH, Cordeiro MN, Richardson M, Oliveira LC, Stankiewicz M, Pelhate M (2007) Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 46: 264-279.

De Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte E, Vogel C (2009) Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.* 5: 1512-1526.

Diniz CR (1963) Separation of proteins and characterization of active substances in the venom of Brazilian spiders. *Anais da Acad. Bras. Cien.* 35: 283-291.

Ferrari R, Costa EJX, Cruz-Höfling MA (2010) EEG profile produced by *Phoneutria nigriventer* spider venom in rats using a non-invasive system. In: 10th Meeting of the Pan American Section on Toxinology, San Jose, Costa Rica. Abstract pp. 223.

Figueiredo SG, Garcia ME, Valentim AC, Cordeiro MN, Diniz CR, Richardson M (1995) Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4 (6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* 33: 83-93.

Figueiredo SG, Perez-Garcia MEL, Cordeiro MN, Diniz CR, Patten D, Halliwell RF, Gilroy J, Richardson M (2001) Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurons. *Toxicon* 39: 309-317.

Fontana MD, Vital Brazil O (1985) Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 18: 557-565.

Frigeri A, Nicchia GP, Verbavatz JM, Valenti G, Svelto M (1998) Expression of Aquaporin-4 in Fast-Twitch Fibers of Mammalian Skeletal Muscle. *J. Clin. Invest.* 102: 695–703.

Fukuda AM, Badaut J (2012) Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 9: 279-285.

Gee JR, Keller JN (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 1145–1150.

Gloor SM, Wachtel M, Bolliger MF, Ishihara H, Landmann R, Frei K (2001) Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res. Rev.* 36(2-3): 258-64.

Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MA (2002) *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol. Neurobiol.* 22: 579-88.

Gunnarson E, Zelenina M, Axehult G, Song Y, Bondar A, Krieger P, Brismar H, Zelenin S, Aperia A (2008) Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. *Glia* 56: 587-596.

Han Z, Wax MB, Patil RV (1998) Regulation of Aquaporin-4 Water Channels by Phorbol Ester-dependent Protein Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 273: 6001–6004.

Hasegawa H, Ma I, Skacho W, Matthay MA, Verkmann A (1994) Molecular Cloning of a Mercurial-insensitive Water Channel Expressed in Selected Water-transporting Tissues. *The journal of biomol. chemistry* 269(8): 5497-5500.

Hirota M, Moro O (2006) MIP-1 β , a novel biomarker for *in vitro* sensitization test using human monocytic cell line. *Toxicology in vitro* 20: 736-742.

Hsu MS, Seldin M, Lee DJ, Seifert G, Steinhauser C, Binder DK (2011) Laminar-specific and developmental expression of aquaporin-4 in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 178:21–32.

Huber JD, Egleton RD, Davis TP (2001) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 24: 719-725.

Ishibashi K, Hara S, Kondo S (2009) Aquaporin water channels in mammals. *Clin. Exp. Nephrol.* 13: 107-117.

Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P (1994) Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 13052–13056.

Kaur C, Sivakumar V, Zhang Y, Ling EA (2006). Hypoxia-induced astrocytic reaction and increased vascular permeability in the rat cerebellum. *Glia* 54: 826-839.

Ke C, Poon WS, Ng HK, Pang JC, Chan Y (2001) Heterogeneous responses of aquaporin 4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neurosci. Lett.* 301: 21-24.

Kiening KL, van Landeghem FK, Schreiber S, Thomale UW, von Deimling A, Unterberg AW, Stover JF (2002) Decreased hemispheric aquaporin-4 is linked to evolving brain edema following controlled cortical impact injury in rats. *Neurosci. Lett.* 324: 105-108.

Kimelberg HK (2010) Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist* 16: 79-106.

Kimelberg HK, Nedergaard M (2010) Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7: 338-353.

Landis DM, Reese TS (1974). Differences in membrane structure between excitatory and inhibitory synapses in the cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* 155: 93-125.

Le Sueur L, Kalapothakis E, Cruz-Höfling MA (2003) Breakdown of the blood-brain barrier and neuropathological changes induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Acta Neuropathol.* 2: 125-134.

Le Sueur LP, Collares-Buzato CB, Cruz-Höfling MA (2004) Mechanisms involved in the blood-brain barrier increased permeability induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom in rats. *Brain Res.* 1027: 38-47.

Lehmenkühler A, Syková E, Svoboda J, Zilles K, Nicholson C (1993) Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience* 55: 339-51.

Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Ståhlberg A, Aprico K, Larsson K, Yabe T, Moons L, Fotheringham A, Davies I, Carmeliet P, Schwartz JP, Pekna M, Kubista M, Blomstrand F, Maragakis N, Nilsson M, Pekny M (2008) Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28: 468-481.

Li L, Zhang H, Varrin-Doyer M, Zamvil SS, Verkman AS (2011) Proinflammatory role of aquaporin-4 in autoimmune neuroinflammation. *The FASEB Journal* 25(5): 1556-1566.

Love S, Cruz-Höfling MA (1986) Acute swelling of nodes of Ranvier caused by venoms which slow inactivation of sodium channels. *Acta Neuropathol.* 70: 1-9.

Love S, Cruz-Höfling MA, Duchen LW (1986) Phoneutria venom and their prevention by tetrodotoxin. *Q. J. Exp. Physiol.* 71: 115-122.

Lu M, Lee MD, Smith BL, Jung JS, Agre P, Verdijk MA, Merx G, Deen PM (1996) The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10908–10912.

Lucas S (1988) Spiders in Brazil. *Toxicon* 26: 759-72.

Mafra RA, Figueiredo SG, Diniz CR, Cordeiro MN, Cruz JD, De Lima ME (1999) PhTx4, a new class of toxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom, inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes. *Brain Research*. 831: 297-300.

Matyash V, Kettenmann H (2010) Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res. Rev.* 63: 2-10.

Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nature medicine* 6 (2): 159-163.

Mendonça MC, Soares ES, Stávale LM, Irazusta SP, Cruz-Höfling MA (2012) Upregulation of the vascular endothelial growth factor, Flt-1, in rat hippocampal neurons after envenoming by *Phoneutria nigriventer*; age-related modulation. *Toxicon* 60: 656-664.

Metaa MR, Kofuji P, Newman EA (2007) Neurovascular coupling is not mediated by potassium siphoning from glial cells. *Journal of Neuroscience* 27: 2468-2471.

Miranda DM, Romano-Silva MA, Kalapothakis E, Diniz CR, Cordeiro MN, Moraes-Santos T, Prado MA, Gomez MV (1998) *Phoneutria nigriventer* toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes. *NeuroReport*. 9: 371-1373.

Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP (1999) Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water

transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domain. *Glia* 26: 47-54.

Nagelhus EA, Mathiisen TM, Ottersen OP (2004) Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129(4): 905-913.

Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME (2001) Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98(24): 14108–14113.

Nicchia GP, Nico B, Camassa LM, Mola MG, Loh N, Dermietzel R, Spray DC, Svelto M, Frigeri A (2004) The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models. *Neuroscience* 129: 935–945.

Nico B, Ribatti D, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Svelto M, Roncali L (2002) Aquaporin-4 expression during development of the cerebellum. *Cerebellum* 1: 207–212.

Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP (1997) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17: 171–180.

Nishioku T, Dohgu S, Takata F, Eto T, Ishikawa N, Kodama KB, Nakagawa S, Yamauchi A, Kataoka Y (2009) Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood–brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Cell Mol. Neurobiol.* 29: 309–316.

Nunes KP, Costa-Gonçalves A, Lanza LF, Cortes SF, Cordeiro MN, Richardson M, Pimenta AM, Webb RC, Leite R, De Lima ME (2008) Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. *Toxicon* 51: 1197-1206.

Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS (2004) Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *The FASEB Journal* 18: 1291–1293.

Papadopoulos MC, Verkman AS (2007) Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr. Nephrol.* 22: 778–84.

Pinheiro AC, Gomez RS, Massensini AR, Cordeiro MN, Richardson M, Romano-Silva MA, Prado MA, De Marco L, Gomez MV (2006) Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Neurochem. Int.* 49: 543-547.

Platnick NI (2012) The world spider catalogue version 13.0 American Museum of Natural History. <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/>. Acesso em 10/12/2012.

Prado MA, Guatimosin C, Gómez MV, DinizCR, Cordeiro MN, Romano-Silva MA (1996) A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochemistry* 314: 145-150.

Preston GM, Agre P (1991) Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (24): 11110-11114.

Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256: 385-387.

Purves D (2010) Neuroscience. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 912 p.

Rabinstein AA (2010). Treatment of brain edema in acute liver failure. *Curr. Treat. Options Neurol.* 12: 129-141.

Rapôso C, Zago GM, Silva GH, Cruz-Höfling MA (2007) Acute blood-brain barrier permeabilization in rats after systemic *Phoneutria nigriventer* venom. *Brain Res.* 1149: 18-29.

Rapôso C, Odorissi PA, Oliveira AL, Aoyama H, Ferreira CV, Verinaud L, Fontana K, Ruela-de-Sousa RR, Cruz-Höfling MA (2012) Effect of *Phoneutria nigriventer* venom on the expression of junctional protein and P-gp efflux pump function in the blood-brain barrier. *Neurochem. Res.* 37: 1967-1981.

Reichenbach A, Derouiche A, Kirchhoff F (2010) Morphology and dynamic of perisynaptic glia. *Brain Res. Rev.* 63: 11-25.

Rezende L, Cordeiro MN, Oliveira EB, Diniz CR (1991) Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* 29: 1225-1233.

Rodier PM (1995) Developing brain as a target of toxicity. *Environmental Health Perspectives* 103: S73–S76.

Rojek A, Praetorius J, Frøkiaer J, Nielsen S, Fenton RA (2008) A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu. Rev. Physiol.* 70:301–327.

Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos MA, Ribeiro AM, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Brammer MJ (1993) Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX₂ and potassium depolarization. *Biochem. J.* 296: 313-319.

Romeiro RR, Teixeira AL, Romano-Silva MA, De Marco LA, Correa H (2006) O papel da aquaporina-4 no edema cerebral. *Rev. Neurociências* 14(4): 220-224.

Rubin LL, Staddon JM (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 11-28.

Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, Bell BA (2002) Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 72: 262-265.

Sato S, Umenishi F, Inamasu G, Sato M, Ishikawa M, Nishizawa M, Oizumi T (2000) Expression of water channel mRNA following cerebral ischemia. *Acta Neurochir.* 76 (Suppl.): 239-241.

Saubaméa B, Cochois-Guégan V, Cisternino S, Scherrmann JM (2012). Heterogeneity in the rat brain vasculature revealed by quantitative confocal analysis of endothelial barrier antigen and P-glycoprotein expression. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32: 81-92.

Schenberg S, Pereira Lima FA (1971) *Phoneutria nigriventer* venom In: Bücherl, W., Buckley, E.E. (Eds), *Venomous Animals and their Venom*, Academic Press, New York 3: 279-285.

Schroeter ML, Müller S, Lindenau J, Wiesner B, Hanisch UK, Wolf G, Blasig IE (2001) Astrocytes induce manganese superoxide dismutase in brain capillary endothelial cells. *NeuroReport* 8:2513–2517.

Schwabhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., Selbach, M. (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337-342.

Simó M, Brescovit AD (2001) Revision and cladistic analysis of the Neotropical spider genus *Phoneutria* Perty, 1833 (Araneae, Ctenidae), with notes on related Ctenidae. *Bull. Br. Arachnol. Soc.* 12: 67–82.

Sievers J, Hartmann D, Pehlemann FW, Berry M (1992) Development of astroglial cells in the proliferative matrices, the granule cell layer, and the hippocampal fissure of the hamster dentate gyrus. *J Comp Neurol* 320:1–32.

Silva AL (2009) O hipocampo normal e patológico. Retirado de http://www.lasse.med.br/mat_didatico/lasse1/textos/alexandre01.html. Acesso em 14/01/2013.

SINAN/SVS, Ministério da Saúde do Brasil. Retirado de: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>. Acesso em 10/02/12.

Sofroniew M, Vinters HV (2009) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7-35.

Stávale LM, Soares ES, Mendonça MPC, Irazusta SP, Cruz-Höfling MA (2013) Temporal relationship between aquaporin-4 and glial fibrillary acidic protein in cerebellum of neonate and adult rats administered a BBB disrupting spider venom. *Toxicon* 66: 37-46.

Szilágyi T, Orbán-Kis K, Horváth E, Metz J, Pap Z, Pávai Z (2011) Morphological identification of neuron types in the rat hippocampus. *Rom J Morphol Embryol*. 52(1):15-20.

Tait M J, Saadoun S, Bell BA Papadopoulos M C (2008) Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci* 31: 37-43.

Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, Yokawa T, Maruno M, Kato A, Ohnishi T, Kohmura E, Tohyama M, Yoshimine T (2000) Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res. Mol*. 78: 131-137.

Timmann D, Drepper J, Frings M, Maschke M, Richter S, Gerwig M (2010). The human cerebellum contributes to motor, emotional and cognitive associative learning. A review. *Cortex* 46: 845–857.

Tomás-Camardiel M, Venero JL, Herrera AJ, De Pablos RM, Pintor-Toro JA, Machado A, Cano J (2005) Blood-brain barrier disruption highly induces aquaporin-4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes: Protective effect by estradiol treatment in ovariectomized animals. *Journal of Neuroscience Research* 80: 235-246.

Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL (2004) Edema and brain trauma. *Neuroscience* 129: 1021–1029.

Verkman AS (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci.* 118(15): 3225-32.

Verkman AS, Binder DK, Bloch O, Auguste K, Papadopoulos MC (2006) Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1758: 1085-1093.

Vieira LB, Kushmerick C, Reis HJ, Diniz CR, Cordeiro MN, Prado MA, Kalapothakis E, Romano-Silva MA, Gomez MV (2003) PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K⁺-evoked increase in [Ca²⁺]_i and Ca²⁺-dependent glutamate release in synaptosomes. *Neurochem. Int.*, 42: 277-82.

Wallraff A, Kohling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhauser C (2006) The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci.* 26:5438–5447.

Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology* 86: 342-367.

Wang X, Lou N, Xu Q, Tian GF, Peng WG, Han X, Kang J, Takano T, Nedergaard M (2006) Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci.* 9: 816-823.

Wang Y, Tajkhorshid E (2010) Nitric oxide conduction by the brain aquaporin AQP4. *Proteins* 78: 661-670.

Wang VY, Zoghbi HY (2001) Genetic regulation of cerebellar development. *Nat Rev Neurosci.* 2(7): 484-91.

Wen H, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Agre P, Ottersen OP, Nielsen S (1999) Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal expression of the aquaporin-4 water channel. *Eur. J. Neurosci.* 11: 935-945.

Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF (2011). Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 287: 1-41.

Yang B, Zador Z, Verkman AS (2008) Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J. Biol. Chem.* 283: 15280–15286.



Yang B, Ma T, Verkman AS (1995) cDNA cloning, gene organization, and chromosomal localization of a human mercurial insensitive water channel: evidence for distinct transcriptional units. *J. Biol. Chem.* 270: 22907–22913.

Yool A (2007) Aquaporins: multiple roles in the central nervous system. *The neuroscientist* 13(5): 470-485.

Zanotto C (2011) Ontogenia das proteínas aquaporina-4 e Kir 4.1 e o efeito de inibidores dessas proteínas sobre a secreção de S100B em fatias hipocâmpais de rato. Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Departamento de Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

10. ANEXOS

10.1 Certificado CEUA/Unicamp


Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

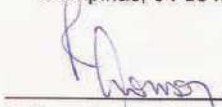
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Envolvimento da Aquaporina 4 no Envenenamento por *Phoneutria nigriventer*" (protocolo nº 2405-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling / Leila Miguel Stavale, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de maio de 2011.

Campinas, 04 de maio de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



Temporal relationship between aquaporin-4 and glial fibrillary acidic protein in cerebellum of neonate and adult rats administered a BBB disrupting spider venom



Leila Miguel Stavale^a, Edilene Siqueira Soares^a, Monique C.P. Mendonça^{a,b},
Silvia P. Irazusta^{a,c}, Maria Alice da Cruz Höfling^{a,*}

^a Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Campinas (Unicamp), 13 083-970 Campinas, SP, Brazil

^b Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), 13 083-970 Campinas, SP, Brazil

^c Faculdade de Tecnologia de Sorocaba, Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza (CEETPS), 18013-280 Sorocaba, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2012

Received in revised form 16 January 2013

Accepted 30 January 2013

Available online 16 February 2013

Keywords:

Blood–brain barrier

GIMP

Image processing

Perivascular edema

Phoneutria nigriventer

Water channel

ABSTRACT

Two astrocyte markers, the glial water channel aquaporin-4 (AQP4) and the glial fibrillary acidic protein (GFAP), have been implicated in several physiological and pathological conditions in the central nervous system (CNS) as well as in blood–brain barrier breakdown (BBBb). By color segmentation the immunoreactivity of both proteins, we demonstrate that the expression of AQP4 and GFAP was increased in the cerebellum of neonate (14-day-old, P14) and adult (8-week-old) rats administered *Phoneutria nigriventer* spider venom (PNV) known to cause perivascular edema, BBBb and convulsion. In the cerebellum's gray matter, PNV produced a major response, especially in the granular layer. Parallel increases in AQP4 and GFAP expression occurred 24 h after envenomation in the white matter of P14 and in the molecular layer of adults, as well as in the granular layer 2 h after envenomation. In the Purkinje layer there was a tendency of increased AQP4, for both, neonates (5 h), and adults (2 and 24 h). Moreover, PNV also provoked nonparallel upregulation of both markers with prevalence of upregulation of AQP 4 for P14 rats, and GFAP for adults. The major expression of both proteins was in the gray matter. The data indicates a venom effect in water/electrolyte balance in the cerebellum and the participation of AQP4 in these effects. Age-related and time-related regional differences probably reflect specificity in AQP4 distribution in different astrocytic membrane domains as well as its participation in K⁺ buffering and neural activity. This study is the first to associate astrocytic AQP4 expression and reactive gliosis in a model of BBB permeability promoted by *P. nigriventer* venom. Our data provide compelling evidence that AQP4 expression was increased in the cerebellum of rats administered PNV.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The *Phoneutria nigriventer* spider, popularly known as the wandering armed spider or banana spider accounts for most notified cases of accidents in Brazil. The majority of accidents only cause local edema and pain; less than 1% is considered

severe (Bucaretychi et al., 2000). Patients severely envenomed show tachycardia, hypertension, priapism, agitation, blurred vision, convulsion, and in some cases pulmonary edema and death. *P. nigriventer* venom (PNV) contains a notable amount of biologically active peptides, most of which are Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ channel-acting neuropeptides which affect neurotransmitter release (Fontana and Vital Brazil, 1985; Love and Cruz-Höfling, 1986; Gomez et al., 2002). In rats, the venom induces excitatory effects such as intense salivation, lachrymation, piloerection, priapism,

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 6224; fax: +55 19 3289 3124.
E-mail address: hofling@unicamp.br (M.A. da Cruz Höfling).

tonic convulsion and spastic and flaccid paralysis of the hindlimbs (Diniz, 1963; Schenberg and Pereira Lima, 1971; Le Sueur et al., 2003; Rapôso et al., 2007; Mendonça et al., 2012). Transmission electron microscopy has shown that the venom can cause BBB, evidenced by extravasation of extracellular tracer from brain microvessels and the presence of perivascular edema and edematous electron lucent endfeet of the perivascular astrocyte population (Le Sueur et al., 2003, 2004; Rapôso et al., 2007). Swelling of astrocytic endfeet that follows BBB impairment may result from osmotic imbalance and accumulation of fluid into the brain provoking edema. The regulation of water permeability across the BBB is fundamental to maintain brain homeostasis. Aquaporins (AQPs) are integral transmembrane proteins whose arrangement form water-conducting pores and play key roles in the water balance, thus being important in clinical medicine (for review see Nico et al., 2002; Verkman et al., 2006). The AQP4 isoform is greatly expressed in the brain and is particularly abundant in the endfeet of astroglial processes, where it occupies a polarized position facing the endothelium of the BBB (Nicchia et al., 2004; Nielsen et al., 1997; Xu et al., 2010). AQP4 occurs throughout the brain especially at sites of fluid transport such as along the pial surface at the glia limitans, both outer and inner, and ependymal cells (Verkman et al., 2006). In the cerebellum, AQP4 was detected in the distal processes of the Bergmann glia and in astrocytes around Purkinje and granular neurons (Nico et al., 2001). The cerebellum, one of the targets of PNV, coordinates motor activity and contributes to cognitive and memory activities (see Strick et al., 2009 for review).

Astrocytes play a seminal role in the induction, development and maintenance of the BBB integrity (Janzer and Raff, 1987; Risau, 1992; Tao-Cheng et al., 1987), thus guaranteeing a proper brain environment for neuronal function. Moreover, production of neural growth factors, metabolic and nutritional supply, protection and elimination of xenobiotics and maintenance of adequate fluid and ionic concentration are some of the multitude of functions exhibited by astrocytes to provide proper neuronal activity. The intimate contact of the perivascular endfeet and brain capillary endothelia and the existence of dynamic astrocyte-neuron bi-directional communication, established through calcium signaling pathways (Araque et al., 2001), give an idea of the strategic position that astrocytes occupy in brain events.

In this study our goal was to gain additional insights into the mechanisms involved in the neurotoxicity induced by *P. nigriventer* spider venom in the cerebellum. We tested the hypothesis that the PNV induced BBB permeabilization and the resulting perivascular edema may be associated with modulation of astrocytic AQP4 expression and reactive gliosis. The expression of two astrocyte markers, AQP4 and GFAP, was investigated in the cerebellum of neonate (14 days) and adult rats (8 weeks) administered *P. nigriventer* venom.

2. Materials and methods

2.1. Animals and venom

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*, 4-week-old) were obtained from the University's Multidisciplinary Center for

Biological Investigation (CEMIB – Unicamp) and housed under standard animal colony conditions, 5/cage at 24 °C on a 12 h light/dark cycle with lights on at 6 a.m. and with free access to food and water until reaching 8 weeks old. At least 24 h before the experiment, the animals were transported in their home cages from the animal colony to the laboratory and allowed to habituate. Male Wistar rats on post-natal day 14 (P14) were taken directly from CEMIB to the laboratory and experiments were carried out the next day. *P. nigriventer* spider venom (PNV) was supplied by the Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brazil) in the lyophilized state and stored at –20 °C until use.

2.2. Exposure to *P. nigriventer* spider venom

A sub-lethal 1.7 mg/kg venom concentration (0.5 ml) was administered intra-peritoneally (i.p.) to P14 and adult rats while control rats were given the same volume of vehicle (0.9% sterile saline) (Mendonça et al., 2012). Animals were anesthetized with 2 µg/mg body weight of a 3:1 mixture of ketamine chloride (100 mg/kg body weight, Dopalen®) and xylazine chloride (10 mg/kg body weight, Anasedan®) (both from Fortvale, Valinhos, SP, Brazil) and euthanized at 2 h, 5 h and 24 h ($n = 5$ /time interval) after. This study was approved by the institution's Committee for Ethics in Animal Use (CEUA-Unicamp, protocol no. 2405-1) which follows the Brazilian Society for Laboratory Animal Science (SBCAL) guidelines.

2.3. Immunohistochemistry

After anesthesia, the animals were perfused through the left ventricle with physiological saline (150 ml) followed by 250 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. Then cerebella were immediately removed and post-fixed in the same fixative overnight. They were then dehydrated through an ascending ethanol series, cleared in xylene and embedded in paraffin (Paraplast®, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Sections (5 µm thick) were mounted onto subbed glass slides followed by a process of dewaxing using xylene and ethanol baths. Endogenous peroxidase was blocked by incubation with 3% hydrogen peroxide-containing PBS (20 min). Antigen epitope retrieval was performed by pre-treating the sections with 10 mM citrate buffer, pH 6.0 at 95–99 °C for 30 min. Sections were immunostained using primary antibodies against Aquaporin-4 (1:1000, rabbit polyclonal, Sigma-Aldrich) and GFAP (1:100, rabbit polyclonal, Dako Cytomation, CA, USA) overnight at 4 °C in a humidified chamber. The next day (after 16–18 h incubation), slides were washed in 0.05 M PBS, and then incubated for 30 min with the secondary antibody (EnVision™ HRP link, Dako Cytomation). Immunoreactivity was visualized as a brown color after staining with diaminobenzidine (DAB) (Dako Cytomation). Nuclei counterstaining was carried out with Harris's hematoxylin; after dehydration the slides were mounted in Canada balsam. For negative controls the primary antibody was replaced with 1% PBS-bovine serum albumin (BSA). To minimize rat-to-rat variability, all cerebella were processed simultaneously as were the immunohistochemistry of tissue sections of controls and PNV-treated animals.

2.4. Image analysis

Fifteen digital photomicrographs of the white matter, granular, molecular and Purkinje layers ($n = 3/\text{region}$) were taken from control and PNV-treated animals per time interval ($n = 5/\text{time interval}$) using the 20 \times objective under an identical illumination setting. Images with a 200 \times final magnification were stored using a BX51Olympus light microscope (Japan). The quantification of AQP4 and GFAP immunolabeling was measured using the GIMP 2.6.4-GNU Image Manipulation Program software (CNET Networks, Inc. Australia) that converts the digitized images to grayscale images (black and white) after color selection (Solomon, 2009). Fig. 1A and B illustrates the color segmentation which allows the selective capture of the immunoreactive sites against the desired antibody and measures their pixel densities. Quantitative analysis was accomplished by calculating the percentage of pixels of the anti-AQP4 and anti-GFAP in the white matter and granular, Purkinje and molecular layers of the cerebellar cortex separately.

2.5. Statistics

All numerical results were analyzed using the GraphPad Prism software package (San Diego, CA, USA) and expressed as the mean \pm standard error (S.E.). Differences between data means of saline-treated and PNV-treated groups were determined by the unpaired Student *t*-test with a *p* value ≤ 0.05 indicating statistical significance. Two-way analysis of variance was used when appropriate to test age/temporal differences in the response to venom effect.

3. Results

The AQP4 and GFAP immunoreactivity of astrocytes was co-localized among the neuron bodies of the granular and Purkinje layers and widespread throughout the width of the molecular layer with the difference that the glial processes appeared well-defined in the anti-GFAP reaction. The anti-AQP4 reaction, although strong, was more diffuse. In animals injected with PNV, there was gradual time-dependent increase in the intensity of the immunolabeling in the

white matter and layers of the cerebellar cortex for both P14 and adults. Figs. 2–4 were chosen to illustrate the reaction pattern at two time intervals (2 h and 24 h) for either P14 rats or adults; the figures also display the calculation of the density of pixels relative to the immunoreaction intensity throughout the period of observation.

3.1. White matter

3.1.1. Animals of both ages administered *P. nigriventer* venom showed a gradual increase of AQP4 and GFAP expression in astrocytes of the white matter

There is no significant difference in the physiological expression of AQP4 and GFAP in the white matter of adult and P14 rats at the different time-points after saline solution injection (Fig. 2C and F). However, rats administered PNV showed a 103.8% increase of AQP4 expression in adult animals ($*p \leq 0.05$) and a 77.5% ($**p \leq 0.01$) in neonate animals after 24 h (Fig. 2C). The venom also caused a 57.3% increase in the GFAP expression after 24 h only in the astrocytes of P14 animals ($*p \leq 0.05$). Although not significantly, AQP4 expression was 11%–20% higher in P14 PNV-treated animals (ranging from 16.48 ± 1.06 at 2 h to 27.73 ± 2.57 at 24 h, respectively) than in adult PNV-treated ones (where it ranged from 13.68 ± 2.03 at 2 h to 24.94 ± 3.55 at 24 h, respectively). In contrast, the values for GFAP were in general slightly higher for adults than for P14 animals.

The two-way analysis of variance showed that the time elapsed between envenomation and animal euthanasia interfered with the expression of AQP4 and GFAP in the white matter of neonates and adults ($*p \leq 0.05$). Also, there was interference of the age variable in the expression of AQP4 and GFAP at 24 h only.

3.2. Granular layer

3.2.1. *P. nigriventer* venom resulted in a time-dependent increase in AQP4 upregulation for adults and a time-dependent decrease in AQP4 upregulation for neonates. GFAP upregulation gradually slowed down for P14 and adults

There is no significant age-dependent difference in the physiological expression of AQP4 and GFAP in the

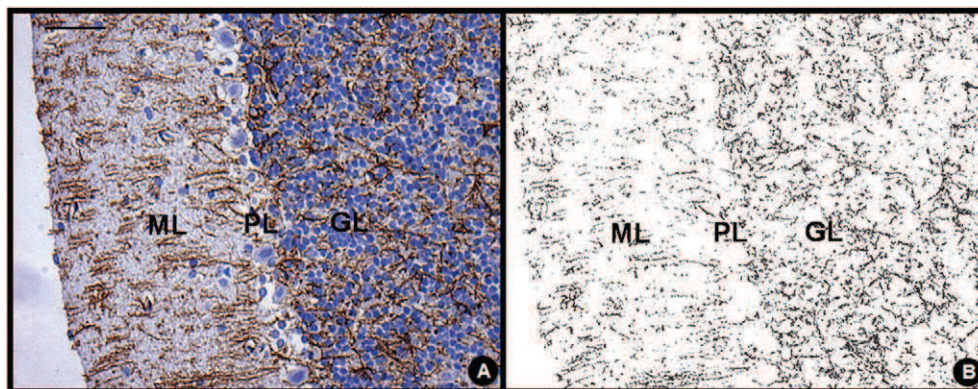


Fig. 1. Photomicrograph of the molecular layer (ML), Purkinje layer (PL) and granular layer (GL) of the cerebellar cortex of 8-week-old rats 24 h after intraperitoneal injection of *Phoneutria nigriventer* venom. A. Immunohistochemistry of anti-GFAP in astrocytes shaded in brown; B. The same section was computer-treated in order to segment by color the immunoreactive sites of the protein by using GIMP 2.6.4. software. Bar = 100 μm .

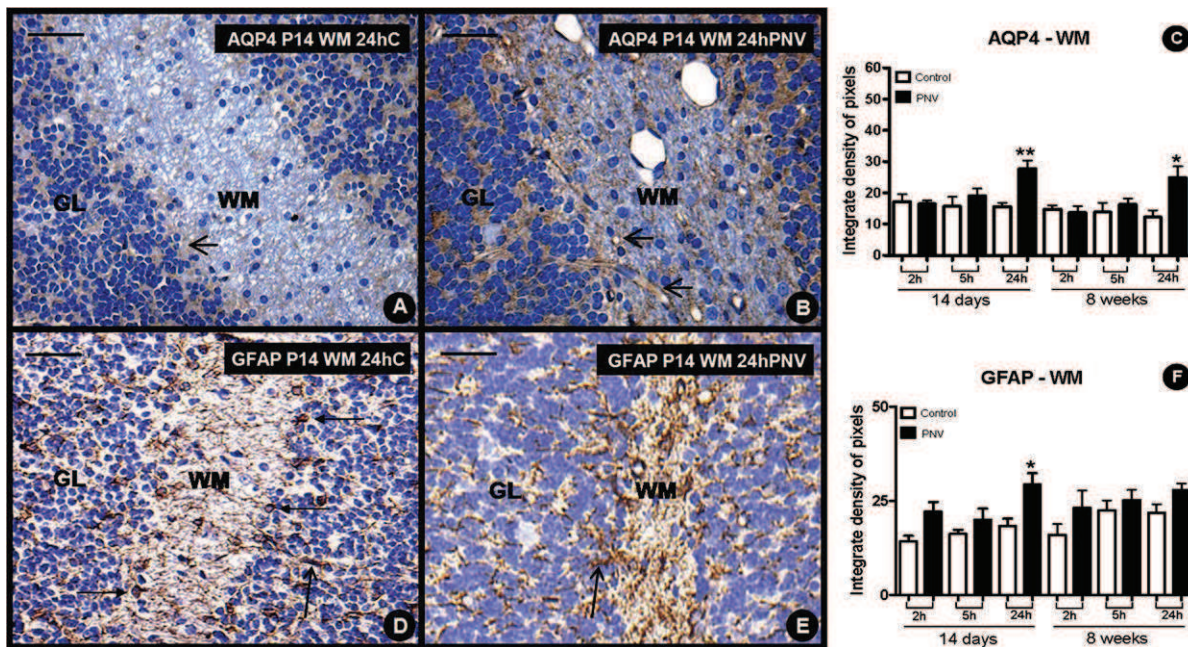


Fig. 2. Aquaporin-4 and GFAP expression in the cerebellum showing the white matter (WM) of rats aged 8 weeks and 14 days 2 h, 5 h and 24 h after saline or venom administration. A and B: illustrative light micrographs showing anti-AQP4 labeling in neonate control (P14 WM 24 h C) and neonate PNV-treated rats (P14 WM 24 h PNV) after 24 h; C: histogram showing the density of pixels of AQP4 immunoreactive sites after color segmentation by the software GIMP 2.6.4. Arrows point that AQP4 immunoreactivity is strongest in the white matter-granular layer interface (panel A) and around capillaries (panel B). D and E: illustrative sections showing GFAP labeling; F: histogram showing the density of pixels of GFAP immunoreactive sites after color segmentation by the software GIMP 2.6.4. Horizontal arrows point GFAP positive astrocyte cell bodies and vertical arrows point cell processes. Observe in C and F that there was a concomitant increase of AQP4 (** $p \leq 0.01$) and GFAP (* $p \leq 0.05$) expression after 24 h of envenomation in P14 animals whereas in adults a significant increase was seen only for AQP4 at the same interval (* $p \leq 0.05$). Values are the mean \pm S.E. of 15 images (three images of the WM per animal, $n = 5$ animals/time-course) captured at random. Student's *t*-test (unpaired) was used to compare the values at each time point in controls and PNV-injected animals (adults and neonates). Bar = 100 μ m.

granular layer of P14 and adult rats for the different time-points after saline solution injection (Fig. 2C and F). However, envenomed neonate rats showed a 83.1% increase in the water channel AQP4 expression at 2 h (** $p \leq 0.01$), a 58.8% increase at 5 h (** $p \leq 0.01$) and a 23.5% non-significant increase at 24 h indicating that after an immediate rise the expression of AQP4 declined with time toward baseline. On the other hand, relative to controls PNV-administered adult rats showed a 59.8% increase of AQP4 expression at 2 h (* $p \leq 0.05$), 39.5% (not significant) at 5 h and 91.8% at 24 h (* $p \leq 0.05$) indicating a prolonged effect of PNV on the expression of the protein (Fig. 3C). GFAP expression showed no significant change in response to PNV in P14 animals; however, in adult rats it induced a 71.2% increase at 2 h (** $p \leq 0.001$) and 33.5% at 5 h (* $p \leq 0.05$) and was close to baseline at 24 h (Fig. 3F).

The two-way analysis of variance showed that with regard to the granular layer the variable time after injection interfered in the expression of AQP4 (** $p \leq 0.001$) and GFAP (** $p \leq 0.05$) in neonates and AQP4 and GFAP (** $p \leq 0.001$) in adults. Also, there was interaction between the age variable and PNV treatment in the expression of AQP4 at 2 h (** $p \leq 0.001$), 5 h (** $p \leq 0.01$) and 24 h (** $p \leq 0.01$) and GFAP at all time intervals (** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$; * $p \leq 0.05$, respectively).

3.3. Molecular layer

3.3.1. The effect of *P. nigriventer* venom on the expression of AQP4 in Bergmann glia cells was more prominent in neonate rats than in adults whereas the expression of GFAP was more prominent in adults than in neonates

The smallest value of AQP4 expression in Bergmann glia cells for neonate was 15.73 ± 2.61 and for adult rats was 16.39 ± 1.62 , whereas the highest value was 23.95 ± 2.16 for neonates and 22.96 ± 3.45 for adults (Fig. 4C). The expression of GFAP was slightly higher in P14 animals than in the adults ranging from 23.53 ± 2.19 to 29.31 ± 2.16 in P14 and 20.23 ± 1.51 to 23.83 ± 2.46 in adults (Fig. 4F). The effect of PNV on AQP4 expression was significant only after 24 h when a 52% upregulation was found for Bergmann glia of 8-week-old rats (* $p \leq 0.05$) (Fig. 4C). In contrast, in 14-day-old rats a 44.2% increase occurred earlier at 2 h (* $p \leq 0.05$), but its level did not differ from the control at 5 h and then increased 101.6% at 24 h (* $p \leq 0.01$) relative to the baseline (Fig. 4C). GFAP expression showed no alteration in P14, whereas it rose significantly by 66.34% at 2 h (** $p \leq 0.001$), 51.11% at 5 h (** $p \leq 0.01$) and 58.59% at 24 h (** $p \leq 0.01$) above baseline counterparts (Fig. 4F).

The two-way analysis of variance showed that the time elapsed between envenomation and animal euthanasia interfered with the expression of AQP4 in P14 (** $p \leq 0.001$)

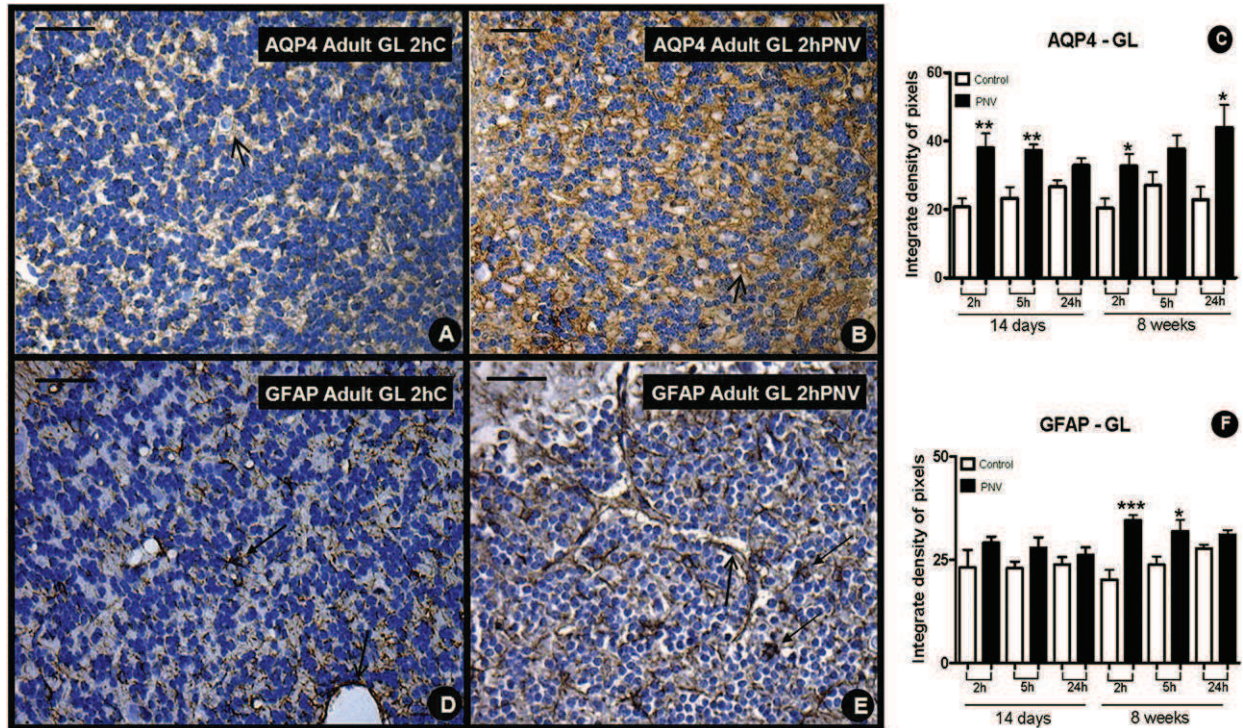


Fig. 3. Aquaporin-4 and GFAP expression in the cerebellum showing the granular layer (GL) of rats aged 8 weeks and 14 days 2 h, 5 h and 24 h after saline or venom administration. A and B: illustrative light micrographs showing anti-aquaporin-4 (AQP4) labeling (arrows) in adult control (adult GL 2 h C) and adult PNV-treated rats (adult GL 2 h PNV) after 2 h; C: histogram showing the density of pixels of AQP4 immunoreactive sites after color segmentation by the software GIMP 2.6.4. D and E: illustrative section showing GFAP labeling in cell bodies (panels D and E) and around microvessel wall (panel E); F: histogram showing the density of pixels of GFAP immunoreactive sites after color segmentation by the software GIMP 2.6.4. Observe that in C and F that there were increases in AQP4 ($*p \leq 0.05$) and GFAP ($**p \leq 0.01$) expression 24 h after envenomation in adult animals. On the other hand, PNV promoted increases of AQP4 at 2 ($*p \leq 0.05$) and 24 h ($**p \leq 0.01$) after envenomation in P14 animals which was not followed by GFAP increment. Moreover, PNV increased GFAP expression in Bergmann glia cells (astrogliosis) at all three time points examined in adult animals ($*p \leq 0.001$; $**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.01$). Values are the mean \pm S.E. of 15 images (three images of the GL per animal, $n = 5$ animals/time-course) captured at random. Student's *t*-test (unpaired) was used to compare the values at each time point in controls and PNV-injected animals (adults and neonates). Bar = 100 μ m.

and GFAP in adults ($*p \leq 0.05$). Also, the age variable interacted with PNV treatment relative to AQP4 expression at 24 h ($***p \leq 0.001$) and GFAP expression at 2 h ($**p \leq 0.01$).

3.4. Purkinje layer

3.4.1. *P. nigriventer* venom did not alter the expression of AQP4 in the Purkinje layer both in adults and neonates, but increased GFAP at 24 h in neonates

Fig. 5 shows that comparison of aquaporin-4 expression between control and PNV group, although no statistical significance was found, there was a tendency of increased AQP4 expression, for both, neonates (5 h), and adults (2 and 24 h). Because of that, when comparing envenomed neonates and envenomed adult rats there was a tendency in decreasing the water channel protein expression only at 5 h. In contrast, PNV induced a 116.13% increase ($*p \leq 0.05$) in GFAP expression in astrocytes located in the Purkinje layer (Fig. 5C).

The two-way analysis of variance showed that the age variable of the animals interacts with the treatment affecting the expression of GFAP after 24 h of envenomation.

4. Discussion

One consequence of *P. nigriventer* experimental envenomation in rats is perivascular edema, swollen astrocyte endfeet and extravasation of extracellular tracer (Le Sueur et al., 2003; Rapôso et al., 2007). The conspicuous excitotoxic signs exhibited by animals and indicative of neurotoxicity course with enhanced vesicular transcellular transport (Le Sueur et al., 2004) and displacement and phosphorylation of tight and adhesion junctional proteins engaged in the prevention of the paracellular transport (Rapôso et al., 2012). Other consequences of PNV effects in rats include astrogliosis, upregulation of GFAP, S100, and nNOS proteins and TNF- α and IFN- γ pro-inflammatory cytokines in hippocampus and cerebellum implying reactive involvement of these glial cells in the envenomation effects and evidence of BBB violation (Cruz-Höfling et al., 2009). In addition, PNV causes *in vivo* upregulation of the Polyglycoprotein (P-gp), which though transient, is followed by upregulation (Rapôso et al., 2012). In primary culture of cortical-derived astrocytes, the venom was shown to inhibit the activity of the P-gp, a protein belonging to the multidrug resistance (MDR) efflux transporter protein

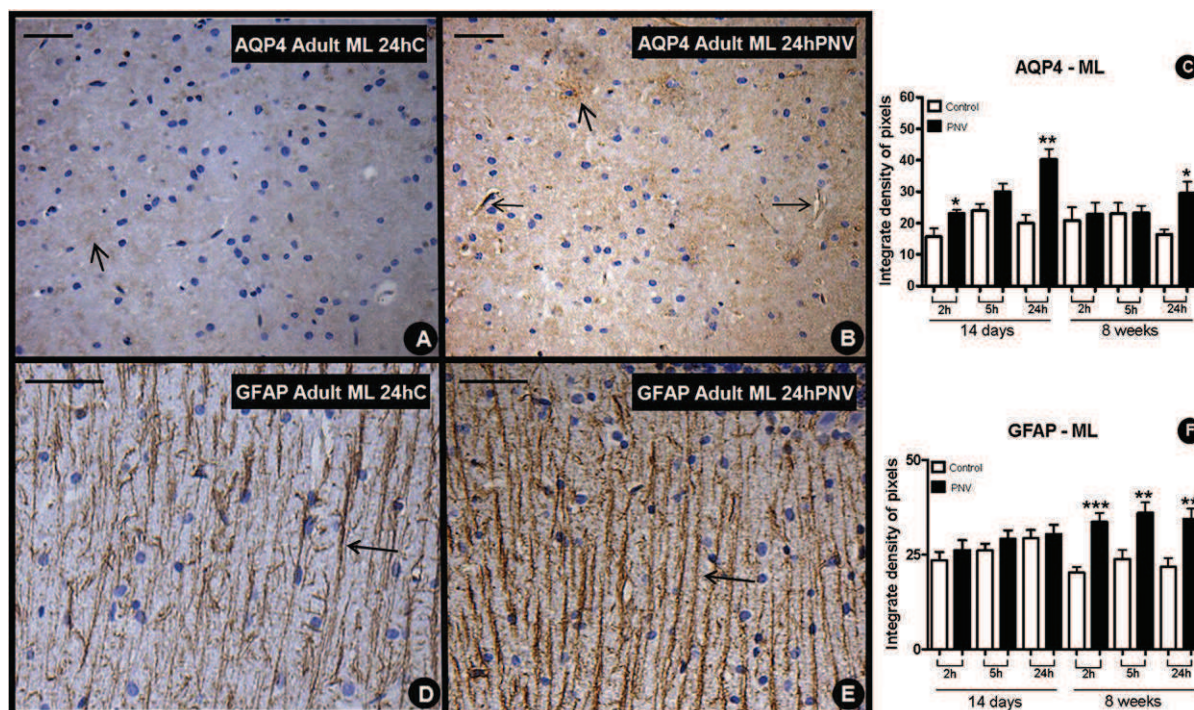


Fig. 4. Aquaporin-4 and GFAP expression in the cerebellum showing the molecular layer (ML) of rats aged 8 weeks and 14 days 2 h, 5 h and 24 h after saline or venom administration. A and B: illustrative light micrographs showing anti-water channel protein aquaporin-4 (AQP4) labeling (arrows) in adult control (adult ML 24 h C) and adult PNV-treated rats (adult ML 24 h PNV) after 24 h; C: histogram showing the density of pixels of AQP4 immunoreactive sites after color segmentation by the software GIMP 2.6.4. D and E: illustrative sections showing GFAP labeling in the processes of Bergmann glia organized in palisade (arrows); F: histogram showing the density of pixels of GFAP immunoreactive sites after color segmentation by the software GIMP 2.6.4. Observe that there was a concomitant increase of AQP4 ($*p \leq 0.05$) and GFAP ($***p \leq 0.001$) expression after 2 h of envenomation in adult animals. Moreover, PNV induced an increase of GFAP at 5 h ($*p \leq 0.05$) in adult animals and an increase of AQP4 after 2 and 5 h ($*p \leq 0.05$) in P14. Values are the mean \pm S.E. of 15 images (three images of the ML per animal, $n = 5$ animals/time-course) captured at random. Student's *t*-test (unpaired) was used to compare the values at each time point in controls and PNV-injected animals (adults and neonates). Bar = 100 μ m.

family (ABCB1) which in the brain works to protect tissue against potential risky compounds (Bodo et al., 2003; Fromm, 2003). Herein, the *P. nigriventer* venom (PNV) induced increased expression of AQP4 in astrocytes of the cerebellum evidencing a novel role of the water channel protein to counteract venom effects. Although generally described as present in the astroglial foot processes facing fluid compartments, including the BBB, we found strong AQP4 immunoreactivity in the interstices among the neurons of the granular and Purkinje layers in addition to its expression around microvessels. In the ML, the AQP4 expression appeared in tiny Bergman glia ramifications across the layer width. There was no AQP4 expression by neurons of the cerebellum cortex corroborating the view that water homeostasis, and probably K^+ siphoning are events selectively performed by astrocytes (Nico et al., 2002; Verkman et al., 2006).

We found that the physiological AQP4 expression showed a tendency to be higher in P14 animals than in adults injected with saline. Our results contrast with a previous study reporting that AQP4 expression in P14 post-natal rats is 25% of the adult level (Wen et al., 1999). However, in the study by Wen and collaborators the adult rats were 14 weeks old (56 days), whereas in the current

study they were 8 weeks old (32 days). In addition, here the expression of the protein was assessed by measuring the density of pixels of AQP4 immunoreactivity in astrocytes of the WM, GL, PL and ML in separate, whereas in the study by Wen and co-workers (1999) AQP4 expression was evaluated by immunoblotting of the membrane fraction of the whole cerebellum. We attribute such discrepancies to differences in the methodological design.

The *P. nigriventer* venom exposure caused differential upregulation of the AQP4 in astrocytes, depending on the region considered, the time after envenoming and the age of animals. Soon after 2 h of envenomation AQP4 expression increased by 83% in the GL and 44% in ML of P14 animals and 60% in GL of adults. These figures changed after 24 h to a 77.5% increase in astrocytes of the WM and 101.6% in the ML of P14 rats and 103% in WM, 52% in ML and 91.8% in the GL of 8-week-old rats. Under present experimental condition, the two-way analysis of variance confirmed that the time after envenomation influenced strongly the upregulation of the protein induced by PNV exposure, which seems logical since the local venom concentration probably decreased due to venom clearance from tissue.

The two-way analysis of variance also demonstrated that animal age also influenced the region-related differences

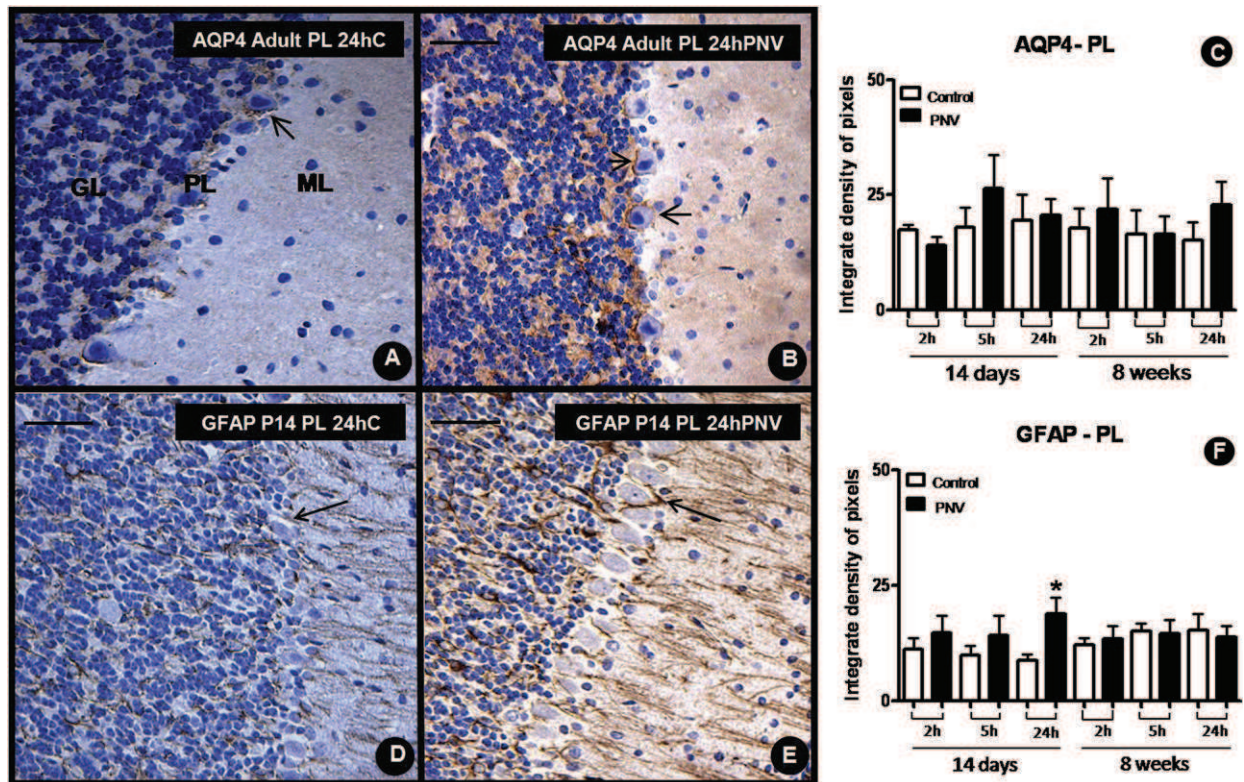


Fig. 5. Aquaporin-4 and GFAP expression in the cerebellum showing the Purkinje layer (PL) of rats aged 8 weeks and 14 days 2 h, 5 h and 24 h after saline or venom administration. A and B: illustrative light micrographs showing anti-water channel protein aquaporin-4 (AQP4) labeling in adult control (adult PL 24 h C) and adult PNV-treated rats (adult PL 24 h PNV) after 24 h (arrows); C: histogram showing the density of pixels of AQP4 immunoreactive sites after color segmentation by the software GIMP 2.6.4. D and E: P14 24 h C and P14 24 h C, respectively illustrates anti-GFAP labeling (arrows) in neonates controls and venom-treated after 24 h; F: histogram showing the density of pixels of GFAP immunoreactive sites after color segmentation by the software GIMP 2.6.4. Bar = 100 μ m.

observed in the expression of AQP4 in the cerebellum in response to PNV. We found that the PNV affected more intensely AQP4 expression in the ML of P14 than in adults, whereas the opposite occurred for the WM where the PNV effect induced a stronger upregulation of AQP4 in adults relative to P14. As shown, despite the preponderance of increased AQP4 in astrocytes of the gray matter over those of the white matter, the data suggest that the protein may be mediating distinct events in the two compartments promoting mainly K^+ buffering in the former and fluid homeostasis in the latter.

A plausible explanation for the regional differences between white and gray matter in the expression of AQP4 in adult and P14 animals over time is to date unclear. The white matter and gray matter contain two gross populations of astrocytes which are distinct in their morphology and functional characteristics. Protoplasmic astrocytes confined within the gray matter have profuse and short branched processes which encase synaptic contacts, which suggest that AQP4 in such astrocytes could have a key role in neural activity. Fibrous astrocytes of the white matter have fewer but lengthier, although less ramified, processes whose distal endings establish close contact with nodes of Ranvier of myelinated nerve fibers

(Wang and Bordey, 2008). In this case, the AQP4 would be suggestively, but not exclusively, engaged in Na^+/K^+ pump regulation. The distal endfeet of both types of astrocytes shield the microvasculature of the BBB, hence the role of AQP4 would be involved mainly in water balance (Nico et al., 2002). Although it is reasonable to suggest that regional specificities, both in terms of types of neuron/astrocyte populations and neurochemical characteristics, would underlie such regional differences, the fact is that the present findings offer limited tools to substantiate such a hypothesis.

The venom of *P. nigriventris* contains potent neurotoxic peptides that interfere in the physiology of ion channels and hence in the neurotransmitter uptake/release and causes excitatory signals (Fontana and Vital Brazil, 1985; Love and Cruz-Höfling, 1986; Gomez et al., 2002; Pinheiro et al., 2006); PNV toxicity activates and delays the inactivation of the TTX-sensitive voltage-gated Na^+ channel, blocks K^+ and Ca^{2+} channels and blocks glutamate exocytosis but also inhibits glutamate uptake (Prado et al., 1996; Mafra et al., 1999; Reis et al., 2000; Vieira et al., 2003). Moreover, PNV causes neuroinflammation (Cruz-Höfling et al., 2009) and activates neurons which express the protein Fos after activation of the oncogene cFos (Cruz-Höfling

et al., 2007). Corroborating this view, we found changes in the neuron electric activity of rats exposed to PNV and inferred that Ca^{2+} -, K^{+} - and Na^{+} -acting neuropeptides present in the venom (Gomez et al., 2002) generated neurotransmission disturbances which were registered in the EEG recordings (Ferrari et al., 2010). All these effects are consistent with neurochemical and metabolic changes in the cerebellum microenvironment, so affecting basket cells and stellate interneurons of the ML, Purkinje neurons of the PL and granule neurons and Golgi interneurons of the GL. Likewise, these changes would affect the inputs of afferent fibers to the cerebellar cortex, i.e. the climbing and mossy fibers which enter across the granular layer to synapse to Purkinje cells and granule cells (see Barlow, 2002). Altogether, the findings of the present study provide compelling evidence that PNV affects AQP4 expression. The regional modulation would depend on the interaction between astrocytes and the neurochemical and structural characteristic of the cerebellum at a given region.

A remarkable body of investigation has proven astrocytes as fundamental for neuronal activity (Kimelberg and Nedergaard, 2010). Astrocytes are involved in the control of brain homeostasis which involves reuptake of extracellular K^{+} and excitatory amino acids after neuronal activity, calcium balance, neural growth factor production, development and maintenance of the BBB, blood vessel permeability, blood flow, glucose supply and scar formation after brain injury, and others. Aggression against the CNS promotes an immediate reaction of astrocytes which may proliferate and migrate to the injury site concomitant with increased expression of the cytoskeletal GFAP protein. These events named reactive astrogliosis can be considered either neuroprotective (Li et al., 2008) or hazardous (Nair et al., 2008) depending on whether the injury is transitory and of low severity or is chronic and severe, respectively. In the present study we found that increases in AQP4 expression paralleled with increases in GFAP expression, with both proteins being expressed by astrocytes. Our findings show synergistic increases in the expression of GFAP and AQP4 in some regions depending on the time course after envenomation. It was found that GFAP and AQP4 increased in parallel in the WM of P14 animals and in the ML of 8-week-old animals 24 h after envenoming (see Figs. 2 and 3) and in the GL of 8-week-old PNV-treated animals after 2 h (Fig. 4). At other time points there was a nonparallel upregulation of either AQP4 or GFAP. PNV induced upregulation of GFAP in protoplasmic astrocytes of ML (named Bergmann glia) at all time-points and in the velate protoplasmic astrocytes of GL at 2 and 5 h and in astrocytes of PL of P14 rats at 24 h. As per AQP4, the increase in GFAP expression was confined to protoplasmic astrocytes of the gray matter, except within the PL, in adults. Considering that PNV effects are transient, do not cause neuronal death and demyelination (Le Sueur et al., 2003, 2004), we suggest that increases in GFAP expression here observed is a mechanism for neuroprotection (Li et al., 2008). In this particular, the increased expression of AQP4 in neonate rats without a concomitant increase in that of GFAP could be a compensatory mechanism for protection against PNV transient toxicity. Nevertheless, it remains unclear why upregulation of GFAP paralleled with

upregulation of AQP4 in the WM of neonates (24 h), in the ML of adults (24 h) and in the GL of adults (2 h).

However, such findings are interesting, because it is known that while only one or two processes of protoplasmic astrocytes have contact with microvessels or pia, the vast majority of them are peri-synaptic, both in pre- and post-synaptic compartments, and hence in close contact with neuronal communication in the gray matter. Recent reviews report that vascular and synaptic endfeet of astrocytes exhibit segregation of intramembranous proteins, creating autonomous *loci* which contain different transporters, channels, receptors, or different densities of them (see Wang and Bordey, 2008; Kimelberg, 2010; Kimelberg and Nedergaard, 2010 for review). This type of domain organization of the glia membrane allows differential dynamics in neural signal transduction, blood flow and fluid homeostasis (Reichenbach et al., 2010). Whether the differential modulation undergone by AQP4 and GFAP throughout the cerebellar parenchyma here seen would be associated with the compartment's functional specificity in relation to astrocyte:neural interactions and heterogeneity of the types of neurons and astrocytes (Matyash and Kettenmann, 2010) is unknown. Nevertheless, the complex zonal/cellular arrangement of the cerebellum can predict a nonhomogeneous cerebellum functionality with regard to water handling, neural signal transduction and K^{+} siphoning which could also explain the differential expression of AQP4 throughout the white and gray matter in response to PNV. We suggest that pharmacologically active components of PNV modify the functional expression of AQP4 and GFAP in a distinct manner in the different cerebellum compartments examined based on the molecular, cellular, neuroanatomical and neurochemical characteristics of each at a given period of post-natal life development.

5. Conclusions

Aquaporin-4 belongs to a family of integral channel proteins that promote the transmembrane diffusion of water through the cell membrane and which is particularly concentrated in the endfeet of astrocytes. AQP4 is also concentrated in astrocyte membrane contacting synaptic sites where promotes potassium siphoning and normal neuronal signal transduction. By removing K^{+} excess from the extracellular peri-synaptic sites, AQP4 acts as a buffer thus avoiding excitotoxic activity of neurons. Astrocytes are part of the glio-neural-vascular unit and hence function as intermediaries between neurons and endothelial cells at the BBB. Picomolar changes in the content of ions inside and/or outside astrocytes are enough to induce important changes in the neuronal activity. On the other hand, such changes lead astrocytes to release neurotransmitters which also affect neuronal activity. We suggest that the upregulation of AQP4 is probably an intrinsic protective mechanism triggered to mediate transcellular water movement out of cerebellum in order to counteract perivascular edema and swelling of astrocyte endfeet caused by *P. nigriventer* venom. The simultaneous reinforcement of astrocyte cytoskeleton promoted by upregulation of GFAP would be in line with protective mechanism to restore BBB

functionality impaired by PNV. Moreover, since PNV causes excitotoxic signals in rats, AQP4 intense upregulation around neurons of the cerebellar cortex may be a reactive response of astrocytes against a probable increase in glutamate and K^+ (Prado et al., 1996; Mafra et al., 1999; Reis et al., 2000; Vieira et al., 2003) resulting from neuronal activation by PNV (Cruz-Höfling et al., 2007) and changes in the electric activity of neurons (Ferrari et al., 2010). Taken together, the findings allow us to speculate that the upregulation of AQP4 in response to PNV may represent the involvement of this protein in neural signal transduction, particularly in neurotransmitter and K^+ siphoning and edema resolving thus with impact on the physiology of BBB impairment caused by PNV.

Acknowledgments

The authors thank Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brazil) for donation of venom, Ms. Stephanie Souto Maior for technical assistance and Mr. Miguel Silva for excellent animal care. The authors are indebted to Professor L. Sodek for revising the language. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp # 2008/55748-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, # 302206/2008-6 and 481316/2008-6). L.M.S. was supported by a MSc studentship from CNPq and M.A.C.H. is an 1A researcher fellow of CNPq.

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., 2001. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Ann. Rev. Physiol.* 63, 795–813.
- Barlow, J.S., 2002. *The Cerebellum and Adaptive Control*. Cambridge University Press, New York.
- Bodo, A., Bakos, E., Szeri, F., Varadi, A., Sarkadi, B., 2003. The role of multidrug transporter in drug availability, metabolism and toxicity. *Toxicol. Lett.* 140, 133–143.
- Bucarechi, F., Deus Reinaldo, C.R., Hyslop, S., Madureira, P.R., De Capitani, E.M., Vieira, R.J., 2000. A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus *Phoneutria*. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo* 42, 17–21.
- Cruz-Höfling, M.A., Zago, G.M., Melo, L.L., Rapôso, C., 2007. c-FOS and n-NOS reactive neurons in response to circulating *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Brain Res. Bull.* 73, 114–126.
- Cruz-Höfling, M.A., Rapôso, C., Verinaud, L., Zago, G.M., 2009. Neuroinflammation and astrocytic reaction in the course of *Phoneutria nigriventer* (armed-spider) blood–brain barrier (BBB) opening. *Neurotoxicology* 30, 636–646.
- Diniz, C.R., 1963. Separation of proteins and characterization of active substances in the venom of Brazilian spiders. *Anais Acad. Bras. Cien.* 35, 283–291.
- Ferrari, R., Costa, E.J.X., Cruz-Höfling, M.A., 2010. EEG profile produced by *Phoneutria nigriventer* spider venom in rats using a non-invasive system. In: 10th Meeting of the Pan American Section on Toxicology, San Jose, Costa Rica, p. 223 (Abstract).
- Fontana, M.D., Vital Brazil, O., 1985. Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve–diaphragm of the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 18, 557–565.
- Fromm, M.F., 2003. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* 33 (Suppl. 2), 6–9.
- Gomez, M.V., Kalapothakis, E., Guatimosim, C., Prado, M.A., 2002. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 579–588.
- Janzer, R.C., Raff, M., 1987. Astrocytes induce blood–brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253–257.
- Kimelberg, H.K., 2010. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist* 16, 79–106.
- Kimelberg, H.K., Nedergaard, M., 2010. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7, 338–353.
- Le Sueur, L., Kalapothakis, E., Cruz-Höfling, M.A., 2003. Breakdown of the blood–brain barrier and neuropathological changes induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Acta Neuropathol.* 2, 125–134.
- Le Sueur, L.P., Collares-Buzato, C.B., Cruz-Höfling, M.A., 2004. Mechanisms involved in the blood–brain barrier increased permeability induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom in rats. *Brain Res.* 1027, 38–47.
- Li, L., Lundkvist, A., Andersson, D., Wilhelmsson, U., Nagai, N., Pardo, A.C., Nodin, C., Ståhlberg, A., Aprico, K., Larsson, K., Yabe, T., Moons, L., Fotheringham, A., Davies, I., Carmeliet, P., Schwartz, J.P., Pekna, M., Kubista, M., Blomstrand, F., Maragakis, N., Nilsson, M., Pekny, M., 2008. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 468–481.
- Love, S., Cruz-Höfling, M.A., 1986. Acute swelling of nodes of Ranvier caused by venoms which slow inactivation of sodium channels. *Acta Neuropathol.* 70, 1–9.
- Mafra, R.A., Figueiredo, S.G., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Cruz, J.D., De Lima, M.E., 1999. PhTx4, a new class of toxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes. *Brain Res.* 831, 297–300.
- Matyash, V., Kettenmann, H., 2010. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res. Rev.* 63, 2–10.
- Mendonça, M.C., Soares, E.S., Stávale, L.M., Irazusta, S.P., da Cruz-Höfling, M.A., 2012. Upregulation of the vascular endothelial growth factor, Flt-1, in rat hippocampal neurons after envenoming by *Phoneutria nigriventer*; age-related modulation. *Toxicol* 60, 656–664.
- Nair, A., Frederick, T.J., Miller, S.D., 2008. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment. *Cell. Mol. Life* 65, 2702–2720.
- Nicchia, G.P., Nico, B., Camassa, L.M., Mola, M.G., Loh, N., Dermietzel, R., Spray, D.C., Svelto, M., Frigeri, A., 2004. The role of aquaporin-4 in the blood–brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models. *Neuroscience* 129, 935–945.
- Nico, B., Frigeri, A., Nicchia, G.P., Quondamatteo, F., Herken, R., Errede, M., Ribatti, D., Svelto, M., Roncali, L., 2001. Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood–brain barrier. *J. Cell. Sci.* 114, 1297–1307.
- Nico, B., Ribatti, D., Frigeri, A., Nicchia, G.P., Corsi, P., Svelto, M., Roncali, L., 2002. Aquaporin-4 expression during development of the cerebellum. *Cerebellum* 1, 207–212.
- Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., Ottersen, O.P., 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J. Neurosci.* 17, 171–180.
- Pinheiro, A.C., Gomez, R.S., Massensini, A.R., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Romano-Silva, M.A., Prado, M.A., De Marco, L., Gomez, M.V., 2006. Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Neurochem. Int.* 49, 543–547.
- Prado, M.A., Guatimosim, C., Gomez, M.V., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Romano-Silva, M.A., 1996. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem. J.* 314 (Pt 1), 145–150.
- Rapôso, C., Zago, G.M., da Silva, G.H., Cruz-Höfling, M.A., 2007. Acute blood–brain barrier permeabilization in rats after systemic *Phoneutria nigriventer* venom. *Brain Res.* 1149, 18–29.
- Rapôso, C., Odorissi, P.A., Oliveira, A.L., Aoyama, H., Ferreira, C.V., Verinaud, L., Fontana, K., Ruela-de-Sousa, R.R., da Cruz-Höfling, M.A., 2012. Effect of *Phoneutria nigriventer* venom on the expression of junctional protein and P-gp efflux pump function in the blood–brain barrier. *Neurochem. Res.* 37, 1967–1981.
- Reichenbach, A., Derouiche, A., Kirchhoff, F., 2010. Morphology and dynamic of perisynaptic glia. *Brain Res. Rev.* 63, 11–25.
- Reis, H.J., Gomez, M.V., Kalapothakis, E., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Prado, M.A., Romano-Silva, M.A., 2000. Inhibition of glutamate uptake by Tx3-4 is dependent on the redox state of cysteine residues. *Neuroreport* 11, 2191–2194.
- Risau, W., 1992. Induction of blood–brain barrier endothelial cell differentiation. *Ann. N.Y. Acad. Sci. U.S.A.* 633, 405–419.
- Schenberg, S., Pereira Lima, F.A., 1971. *Phoneutria nigriventer* venom. In: Bücherl, W., Buckley, E.E. (Eds.), *Venomous Animals and their Venoms*. Academic Press, New York, pp. 279–285.
- Solomon, R.W., 2009. Free and open source software for manipulation of digital images. *AJR Am. J. Roentgenol* 192, W330–W334.

- Strick, P.L., Dum, R.P., Fiez, J.A., 2009. Cerebellum and non-motor function. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 413–434.
- Tao-Cheng, J.H., Nagy, Z., Brightman, M.W., 1987. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J. Neurosci.* 7, 3293–3299.
- Verkman, A.S., Binder, D.K., Bloch, O., Auguste, K., Papadopoulos, M.C., 2006. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1085–1093.
- Vieira, L.B., Kushmerick, C., Reis, H.J., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Prado, M.A., Kalapothakis, E., Romano-Silva, M.A., Gomez, M.V., 2003. PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K⁺-evoked increase in [Ca²⁺]_i and Ca²⁺-dependent glutamate release in synaptosomes. *Neurochem. Int.* 42, 277–282.
- Wang, D.D., Bordey, A., 2008. The astrocyte odyssey. *Prog. Neurobiol.* 86, 342–367.
- Wen, H., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Agre, P., Ottersen, O.P., Nielsen, S., 1999. Ontogeny of water transport in rat brain: post-natal expression of the aquaporin-4 water channel. *Eur. J. Neurosci.* 11, 935–945.
- Xu, M., Su, W., Xu, Q.-P., 2010. Aquaporin-4 and traumatic brain edema. *Chin. J. Traumatol.* 13, 103–110.

Aquaporin-4 expression in the cerebellum of adult and neonate rats in a model of blood-brain barrier impairment by spider venom

Leila Miguel Stávale ^a, Edilene Siqueira Soares ^a, Monique C. P. Mendonça ^{a,b},
Evanguedes Kalapothakis ^d and Maria Alice da Cruz-Höfling ^{a*}

^aDepartment of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Campinas (Unicamp), Zip Code 13 083-970, Campinas, SP, Brazil

^bDepartment of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), Zip code 13 083-970, Campinas, SP, Brazil

^dDepartment of General Biology, ICB, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Zip code 31 270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

**Corresponding author: Tel. (55)(19) 3521 6224; Fax (55)(19) 3289 3124*

E-mail address: hofling@unicamp.br (Maria Alice da Cruz Höfling)

Abstract

Edematous perivascular astrocytic end-feet and extravasation of extracellular tracer at the blood-brain barrier (BBB) were shown coursing with neurotoxic signs in rats administered *Phoneutria nigriventer* spider venom (PNV). Aquaporin-4 (AQP4) is a water channel transmembrane protein densely expressed in the astrocyte endfeet which is involved in edema formation and resolution, neuron signal transduction and K⁺ siphoning. Recent immunohistochemistry-based findings showed increase in AQP4 labeling in all the cerebellar layers of neonate (P14) and young adult rats administered PNV. Herein, we confirmed by western blotting and reverse transcription polymerase chain reaction that there was increase in the protein content in the cerebellum at 2 and 5 hours after envenoming in parallel with a tendency for increased mRNA. Strong edema formation was concentrated around spots of damaged Purkinje neurons in neonates. Adult control and envenomed rats showed higher expression of AQP4 than neonates. The data suggest that AQP4 can be one of the molecular mechanisms underlying the BBB opening and perivascular edema formation induced by PNV which course with excitotoxic signs in envenomed rats. The time- and age-dependent dynamics of AQP4 expression reflect differences in the BBB functionality. The study provides complementary views of the current understanding of the neurotoxic effects provoked by *Phoneutria* envenomation.

Keys words: edema; water channels; spider venom

1. Introduction

The venom of the armed spider *Phoneutria nigriventer* has been one of the most studied by biochemists, pharmacologists and cellular biologists in Brazil given the abundance of compounds with potential for biotechnological development of new drugs (Rates et al., 2011). The species appears together with *Loxosceles* at the top of the list of venomous spiders that most causes human accidents in Brazil according to the Information System for Notifiable Disease in the Ministry of Health (SINAN). Venom-containing toxins block Ca^{2+} and K^{+} channels, activate or delay inactivation of Na^{+} channels and inhibit glutamate release and uptake (Romano-Silva et al., 1993; Mafra et al., 1999). Severe envenomation (less than 0.5 %) causes excitotoxic manifestations, cardiovascular alterations, pulmonary anguish, priapism, convulsion and rarely death (Bucarechi et al., 2000). Animals injected with PNV exhibit manifestation of central, peripheral and autonomic dysfunction such as intense salivation, piloerection, tremors, lachrymation, priapism, spastic and flaccid paralysis, respiratory distress and convulsion (Diniz, 1963; Schenberg & Pereira Lima, 1971; Le Sueur et al., 2003; Rapôso et al., 2007, Mendonça et al., 2012).

One important characteristic of the venom is to promote neurovascular changes such as relaxation of corpus cavernosum (Nunes et al., 2012) and blood-brain barrier (BBB) permeabilization (Le Sueur et al., 2003, 2004; Rapôso et al., 2012). Rats administered *Phoneutria nigriventer* venom (PNV) show either cytotoxic edema characterized by swelling of perivascular astrocytic end-feet (Rapôso et al., 2007) or vasogenic edema caused by fluid leakage from the bloodstream into the brain extracellular spaces (Le Sueur et al., 2004). The BBB breakdown may occur either by enhanced microtubule-mediated transendothelial vesicular transport (Le Sueur et al., 2004) or by disruption and phosphorylation of tight junctional and adhesion junctional proteins (Rapôso et al., 2012). The BBB breakdown is not uniform throughout brain regions indicating that the dynamics of BBB-associated proteins is variable across the brain regions and time-dependent, and also depending on the age of the animal (Cruz-Höfling et al., 2009, Mendonça et al., 2012, Rapôso et al., 2012 Stávale et al., 2013). Studies aimed at better understanding the venom molecular effects in the brain is therefore of interest.

A recent preliminary immunohistochemistry-based study showed that aquaporin-4 (AQP4) could be a plausible co-participant in the perivascular edema following BBB permeation induced by PNV (Stávale et al., 2013). The data showed that AQP4 and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressions were upregulated in astrocytes of the cerebellum of neonate (14-day-old, P14) and adult (8-week-old) rats administered PNV. Aquaporins (AQPs) are water channel integral membrane proteins classically described as involved in water metabolism and edema formation and resolution (Agre et al., 2002). They are abundantly expressed in the brain including the cerebellum (Frigeri et al., 1995). They are specific astrocyte markers highly concentrated in endfeet adluminal plasma membrane of astrocytes but are also localized at distal ends of astrocyte processes facing nodes of Ranvier of both central and peripheral synapses. To further investigate whether AQP4 content is altered in the cerebellum of rats administered *P. nigriventer* venom we used the same rat model and experimental design used previously (Stávale et al., 2013). Reverse transcription polymerase chain reaction, western blotting and immunohistochemistry were carried out.

2. Material and methods

2.1. Animals and spider venom

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with 14 days of postnatal life (P14) and 8 weeks old (adult) were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation in Laboratory Animals Science (CEMIB) at Unicamp, Campinas, SP, Brazil. The animals were kept in a controlled temperature room with day/night cycles of 12 h and supplied with food and water *ad libitum*. The venom of *P. nigriventer*, harvested from different spiders maintained in captivity, was lyophilized and kept at a temperature of -20°C.

2.2. Phoneutria nigriventer spider venom administration

The rats were given an intraperitoneal sublethal dose (1.7 mg/Kg in 0.5 ml of 0.9% sterile saline) of PNV (Mendonça et al., 2012). The control group received the same

volume of 0.9% saline solution. After 2, 5 and 24 h (n=5/time interval), the animals were anesthetized with ketamine chloride (Dopalen®, 100 mg/kg body weight) and xylazine chloride (Anasedan®, 10 mg/kg body weight) for the subsequent tissue procedures. This study was approved by the institution's Committee for Ethics in Animal Use (CEUA-Unicamp, protocol n° 2405-1) and the experiments were conducted in accordance with the Brazilian Society for Laboratory Animal Science (SBCAL) guidelines.

2.3. Western Blotting

After i.p. injection of saline or PNV, animals were anesthetized by carbon dioxide and their brains rapidly removed. After separating the hindbrain, the cerebellum was immediately stored in liquid nitrogen. Subsequently, they were thawed and homogenized in a Polytron with an anti-protease cocktail (10 mM EDTA, 2 mM PMSF, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM NaVO₄, 10 g of aprotinin/ml and 100 mM Tris, pH 7.4). The homogenate was centrifuged at 3,000 x g for 10 min and the supernatant collected and stored at -70°C. The protein concentration was quantified by the Bradford protein assay kit (Bio-Rad Protein Assay Bradford - BioRad, Ref 500-0006). The proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE) using 12% gels to separate them according to their molecular weight (AQP4 is 34 kDa). They were then electroblotted to a nitrocellulose membrane and blocked in TBS, pH 7.4, containing 0.05% Tween 20 with 5% non-fat milk for two hours at room temperature. The membrane was then incubated with primary antibody anti-AQP4 (1:2000, Santa Cruz Biotechnology) diluted in Tris-buffered saline (TBS) containing 3% non-fat milk for 18 hours at 4°C. Finally, the membranes were washed three times with TBS and incubated with anti-rabbit secondary antibody (1:4000, Santa Cruz Biotechnology) diluted in TBS containing 1% non-fat milk for two hours at room temperature. The labeled protein blots were detected using X-ray film (Sigma-Aldrich) following treatment with a chemiluminescence kit (Super Signal, Pierce, Ref PIER-34 080) for 2 min. Densitometric blot quantification was performed using the image analysis software: NIH Image J program 1:41 (available zippy.nimh.nih.gov or <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>, developed by Wayne Rasband,

NIH, Bethesda, MD). The results were confirmed in three sets of experiments. Immunoblot for β -actin (Sigma-Aldrich) was done in triplicate, as an internal control.

2.4. Real Time-PCR

Total RNA of cerebellum of 64 rats (four animals/period/treatment, totaling 32 neonate rats and 32 adult rats) was extracted according to the manufacturer's recommendations using Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD), 2, 5 and 24 h after the injection of saline or PNV in P14 and 8-week-old rats. Standard reverse-transcription PCR was performed using total RNA as described previously (Hirota and Moro, 2006). Intron-skipping primers (TaqMan™) were obtained from Applied Biosystems: primer. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase primers (GAPDH) (Applied Biosystems) were used as controls. Real-time PCR analysis of AQP4 gene expression was performed in an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems). The optimal concentrations of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, were obtained through five-point, two-fold dilution curve analysis for the gene. Each PCR contained 25 ng of reverse-transcribed RNA, 200 nM of each specific primer, SYBR SAFE PCR master mix, and RNase-free water to a final volume of 20 μ l. Real-time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

2.5. Anti-AQP4 immunohistochemistry

Anesthetized animals of control and envenomed groups were intra-cardially perfused through the left ventricle at 2, 5 and 24 h after saline or PNV i.p. administration with physiological saline (150 ml) followed by 250 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The immunohistochemistry for AQP4 was assessed as described elsewhere (Stávale et al., 2013).

2.6. Statistics

All numerical results were analyzed using the Graphpad Prism software package and expressed as the mean \pm standard error. The statistical significance among control and PNV-treated groups was determined by the unpaired Student *t*-test considering $p \leq 0.05$. To verify a possible influence of animal age or time of venom exposure the three-way analysis of variance was also used.

3. Results

Rats injected with saline solution were active in the cage whereas animals injected with the *P. nigriventer* venom showed the signs of intoxication described in the Introduction section. The signs of intoxication were more prominent in neonate rats compared to adults.

3.1. Western Blotting (WB) and quantitative real time PCR

AQP4 immunoblots resulting from cerebella homogenates showed increased expression of the protein which was statistically significant at 2 h for adult animals and at 5 h for neonate rats after PNV administration which represented a 45% increase for adults ($**p \leq 0.01$) and a 78% for neonates ($*p \leq 0.05$) (Fig. 1).

The comparison between the level of the protein in P14 and young adult rats showed that adult animals in general possess a larger amount of AQP4 than neonates (Fig. 1). Significant differences were found at 24 h after saline injection when AQP4 basal level was 90% higher in adults relative to P14 ($###p \leq 0.001$). In PNV-exposed animals, AQP4 expression was 48% ($#p \leq 0.05$) and 39% ($###p \leq 0.001$) higher in adults at 2 h and 24 h, respectively, than the measured in P14. The three-way analysis of variance showed that the variable age influenced the expression of the protein at 24 h post venom exposure ($***p \leq 0.001$).

In relation to AQP4 mRNA expression (Fig. 2) the differences observed did not achieve statistical significance at the intervals examined. The lack of significance was due to high individual differences in the values, a characteristic particularly exhibited by P14 rats. As for the protein, the amount of AQP4 mRNA tended to be higher in adult animals than in neonates. Values of the AQP4 mRNA ranged from 1.39 ± 0.66 at 2 h to

1.65 ± 0.39 at 24 h for P14 against 1.41 ± 0.48 at 2 h to 2.20 ± 0.54 for adults. Time point comparisons of the production of mRNA between neonates and adults in response to PNV showed transcription more evident for adult animals, but the individual intra-group variability produced no meaningful data. The three-way analysis of variance did not show interaction between the time or age variables.

3.2. Immunohistochemistry

Qualitative analysis of anti-AQP4 astrocytic staining showed it to be stronger in animals of both ages after envenoming compared to their controls. Figure 3 displays the labeling pattern in P14 and adults at 24 and 2 h, respectively. Labeled glial processes are spread throughout the molecular layer (ML) and in close contact with both the granule neurons in the granular layer (GL) and Purkinje neurons in the Purkinje layer (PL) and probably nerve fibers of the white matter (WM). The anti-AQP4 labeling was more prominent in the GL. The anti-AQP4 reactivity tended to increase with time after envenoming. The P14 envenomed animals showed important spots of damaged Purkinje cells (Fig. 3B).

4. Discussion

Aquaporins (AQPs) belong to a water channel forming family of integral transmembrane proteins involved in water permeability and water flow in a wide range of cells/organs in different biological systems and different class of organisms, including microbes, plants and animals (Echevarría and Ilundáin, 1998). The ubiquity of AQPs reflects the highly conserved character of the protein as well as their importance in the cellular physiology and organism water handling. In the central nervous system (CNS), the AQP4 isoform is considered a marker of astrocytes, although it is also detected in the endothelial cell membrane facing the neuropil (Nielsen et al., 1997). It is abundantly expressed in a polarized fashion in the endfeet membrane of both the perivascular astrocytes and glia limitans, respectively covering the endothelium of the BBB and the sub-pial surface. This strategic position conforms to the role of AQP4 in water transport, water homeostasis, regulation of water flow and brain edema formation

and resolution (Nico et al., 2002, Verkman et al., 2006). It also gives a clue on the seminal role exerted by the distal endfeet processes of astrocytes on the transport regulation across the BBB (Risau, 1992; Abbott, 2002).

In the present study, at 2 and 5 h after PNV i.p. administration the cerebellar AQP4 level increased in adult and neonates rats, respectively, together with a tendency for increase in the mRNA level at all times studied. Increases in AQP4 and/or its mRNA have been associated with brain edema at the BBB and loss of fluid and ion/neurotransmitter homeostasis at the perisynaptic sites. Downregulation of AQP4 and edema formation have been described in traumatic brain injury (Ke et al., 2001; Kiening et al., 2002), cerebral ischemia and hypoxia (Sato et al., 2000; Kaur et al., 2006). Upregulation of AQP4 was seen in brain tumors (Saadoun et al., 2002) and post-ischemic edema (Taniguchi et al., 2000). Authors have associated downregulation of AQP4 expression with intact BBB and cytotoxic edema, which is when fluid accumulates inside the perivascular astrocytes; the upregulation of AQP4 has been associated with impaired BBB and vasogenic edema when blood-derived fluid drains into the extracellular space (Ke et al., 2001; Verkman et al., 2006).

In recent studies, we found that cytotoxic/intracellular edema occurs in the cerebellum of PNV-envenomed rats in the first 15 min to 5 h post-envenomation (Rapôso et al., 2007) concurrently with redistribution and phosphorylation of junctional proteins and decrease of laminin and P-gp efflux transporter protein (Rapôso et al., 2012). The major decreases of all those proteins occurred soon after 15 min from envenomation with a tendency to recover afterwards. However, no clear evidence of vasogenic/extracellular edema has been found in short periods after venom exposure, only later at 3 days after PNV injection (Le Sueur et al., 2003). However, here we found significant upregulation of the cerebellar AQP4 level as early as 2 h and 5 h after PNV administration. Also in a histochemistry-based study, Stávale and co-workers (2013) reported significant increase in the AQP4 immunostaining at 24 h in the white matter of neonate and adult envenomed rats, at 2 and 5 h in the granular layer of P14 and at 2 and 24 h in adults, and at 2 and 24 h in the molecular layer of P14 and at 24 h in adults. Such apparent discrepancies suggest that in different regions of the cerebellum of envenomed rats, both types of edema could be underway.

Consistent with this, in most clinical situations there is combination of the two types of edema during the time course of a pathological state, principally when there is neuroinflammation by activation of inflammatory cytokines (Rabinstein, 2010, Fukuda and Badaut, 2012) as is the case in experimental envenomation by PNV (Cruz-Höfling et al., 2009). The potential co-existence of the two types of edema implies that BBB, as well as the molecular apparatus of astrocytes end-feet, is not affected homogeneously across the entire cerebellar parenchyma in rats administered PNV. This is in conformity with the astrocyte plasma membrane heterogeneity conferred by the diversity of contacts established by astrocytic processes with neurons, other glia cells, pericytes and endothelial cells, what implies in heterogeneous distribution of transporters, receptors and ion channels (see Wang and Bordey et al., 2008; Kimelberg, 2010; Kimelberg and Nedergaard, 2010 for review). This is in line with the concept that the dynamics of BBB opening can change in a same brain region and even in different portions of a same brain vessel, and that BBB behavior is not uniform throughout a region because regulatory mechanisms modulate restrict domains along the BBB (Saubaméa et al., 2012).

This complies with our immunohistochemistry-based findings which showed that the protein level varied chronologically and regionally and that the AQP4 labeling was highest in the protoplasmic astrocytes of the granular layer and lowest in the fibrous astrocytes of the white matter (Stávale et al., 2013). High concentrations of AQP4 in the cerebellum have been reported with emphasis on its marked presence in the granular layer (Amiry-Moghaddam et al., 2004). The authors suggest that such differences would result from unequal distribution and densities of AQP4 (and water channels) in the astrocytes membrane and consequently in the time course of edema development among brain regions.

AQP4 forms intramembranous supramolecular aggregates, called orthogonal arrays of particles (OAPs), in the glial endfeet membrane (Landis and Reese, 1974; Wolburg et al., 2011). Kir 4.1 potassium channel protein co-localizes with AQP4 to the same glial membrane domain, hence providing robust evidence on a probable functional coupling between water transport and K^+ siphoning (Nielsen et al., 1997; Nagelhus et al., 1999). Potassium siphoning is a process by which inwardly rectifying K^+ channels (Kir4.1) present in astrocytes end-feet carry most of the $K(+)$ current released from neurons

during neurotransmission to blood vessels (Metea and Newman, 2007). Moreover, AQP4 is co-localized with the astrocyte glutamate transporter 1 (GLT-1), with the difference that the latter is highly concentrated on the membrane facing the neuropil (Nielsen et al., 1997). GLT-1 tightly controls the extracellular level of glutamate at the perisynaptic site below neurotoxic level to prevent excitotoxicity and eventually neuronal damage. Such AQP4, Kir 4.1 and GLT-1 rich astrocytic membrane domains arranged together and contiguous to both BBB and perinodal axolemma indicate the three proteins as key players in the maintenance of brain homeostasis (Nielsen et al., 1997). Further research is needed to clarify if the predominance of AQP4 in the granular layer is associated with prevalence of BBB disruption, neuronal activation and excitotoxic activity in that region, in response to PNV.

A recent study has shown that PNV induces neuron activation with evidence that nitric oxide (NO)-derived nNOS acts in the event (Cruz-Höfling et al., 2007). Interestingly, the water channel central pore of AQP4 is reported to serve both as a reservoir for NO within the astrocyte membrane and a conduit for nitric oxide release (Wang and Tajkhorshid, 2010). Considering that PNV-containing toxins can block glutamate uptake (Mafra et al., 1999) the astrocytes assume a relevant role in the control of the neurotoxic level of the excitotoxic amino acid. This is particularly relevant in terms of Bergmann glia of the cerebellar molecular layer which expresses abundant N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors along their processes. Pharmacological studies are now needed to reveal whether AQP4 expression is coupled to the NO/nNOS system and GLT-1 in *Phoneutria* envenomation.

Age-related comparisons of AQP4 level in P14 and adult animals showed the baseline of the protein and principally the mRNA at a higher level in adult rather than P14 animals. The data are in accordance with literature indicating that young animals possess a lower AQP4 level than adults (Wen et al., 1999). However, this contrasts with our previous immunohistochemistry-based study indicating that AQP4 expression was in general higher in the cerebellum of P14 than in adult rats (Stávale et al., 2013). In that study, the protein expression was determined by color segmentation which allows the selective capture of the antigen-antibody immunoreactive sites. The measurement of the optical pixel densities of AQP4 reactive sites was assessed in separate in the white matter, and molecular, Purkinje and granular layers of the gray matter of the cerebellum

at 2, 5 and 24 h after saline injection. We suggest that the increases or decreases of the AQP4 expression revealed by anti-AQP4 immunostaining were dissipated when the total protein was measured in the cerebellum homogenate.

Our results also showed a high inter-individual variability both in the mRNA content. While may reflect intrinsic individual dynamics of the neuronal network and neurotransmission, the individual variability also nullifies possible inter-group (treatment and age groups) differences. Herein, inter-individual variability was observed principally in rats with 14 days of post-natal life. The brain of neonate Wistar rats enlarges markedly, first through neurogenesis and afterwards through gliogenesis and neurogenesis resulting in striking changes during the postnatal life (Bandeira et al., 2009). In the cerebellum, the postnatal development is nonlinear in the different compartments and full growth is reached several months after birth (Wang and Zoghbi, 2001). Moreover, brains of neonates possess marked differences in water handling (Wen et al., 1999), enlarged extracellular spaces (Lehmenkhuler et al., 1993), vasculogenesis and hence developing (immature) BBB (Rodier, 1995). Hence, regulatory mechanisms involved in the control of the expression of the protein are in progress in P14 animals which are still in the suckling age. We suggest that together these postnatal changes and cerebellum characteristics are responsible for the individual variability in the mRNA. We also suggest that the marked edema around damaged Purkinje cells seen in P14 animals reflects the vulnerability of cerebellum in neonates relative to adults relative to water metabolism.

In conclusion, the present study shows that rats administered the venom of the *Phoneutria nigriventer* (armed-spider) show increase in the level of AQP4 suggesting that the protein can be a potential player in the BBB opening, perivascular edema, neuron activation and neuroinflammation induced by this spider venom. The expression of the protein was higher in adults compared with neonates. This experimental model can be useful for studies dealing with the manipulation of the water channel forming protein aquaporin-4 and the effects induced by this manipulation.

Acknowledgments

The authors thank the Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brazil) for the venom donation, Ms. Stephanie S. M. Federighi for technical assistance, Mr. Miguel Silva for excellent animal care and Dr. Lício A. Velloso for laboratory facilities. The authors are indebted to Professor L. Sodek for revising the language. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp # 2008/55748-1 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, # 302206/2008-6 and 481316/2008-6). L.M.S. was supported by a M.Sc. studentship from CNPq and M.A.C.H. is an 1A research fellow of CNPq.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Abbott, N.J., 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of Anatomy* 200, 629-638.
- Agre, P., King, L.S., Yasui, M., Guggino, W.B., Ottersen, O.P., Fujiyoshi, Y., Engel, A., Nielsen, S., 2002. Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. *Journal of Physiology* 542, 3-16.
- Amiry-Moghadam, M.R., Frydenlund, D.S., Ottersen, O.P., 2004. Anchoring of aquaporin-4 in brain: Molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience* 129, 997-1008.
- Bandeira, F., Lent, R., Herculano-Houzel, S., 2009. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 14108-14113.
- Bucarechi, F., Reinaldo, C.R.D., Hyslop, S., Madureira, P.R., de Capitani, E.M., Vieira, R.J., 2000. A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus *Phoneutria*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo* 42, 17–21.
- Cruz-Höfling, M.A., Zago, G.M., Melo, L.L., Rapôso, C., 2007. c-FOS and n-NOS reactive neurons in response to circulating *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Brain Research Bulletin* 1-3, 114-126.

- Cruz-Höfling, M.A., Rapôso, C., Verinaud, L., Zago, G.M., 2009. Neuroinflammation and astrocytic reaction in the course of *Phoneutria nigriventer* (armed-spider) blood-brain barrier (BBB) opening. *Neurotoxicology* 30, 636-646.
- Diniz, C.R., 1963. Separation of proteins and characterization of active substances In the venom of Brazilian spiders. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 35, 283-291.
- Echevarría, M., Ilundáin, A.A., 1998. Aquaporins. *Journal of Physiology and Biochemistry* 54, 107-118.
- Frigeri, A., Gropper, M.A., Umenishi, F., Kawashima, M., Brown, D., Verkman, A.S., 1995. Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular epithelial and glandular tissues. *Journal of Cell Science* 108, 2993-3002.
- Fukuda, A.M., Badaut, J., 2012. Aquaporin4: a player in cerebral edema and neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation* 9, 279 doi:10.1186/1742-2094-9-279
- Hirota, M., Moro, O. 2006. MIP-1 β , a novel biomarker for *in vitro* sensitization test using human monocytic cell line. *Toxicology In vitro* 20, 736-742.
- Kaur, C., Sivakumar, V., Zhang, Y., Ling, E.A., 2006. Hypoxia-induced astrocytic reaction and increased vascular permeability in the rat cerebellum. *Glia* 54, 826-839.
- Ke, C., Poon, W.S., Ng, H.K., Pang, J.C., Chan, Y., 2001. Heterogeneous responses of aquaporin 4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neuroscience Letters* 301, 21-24.
- Kimelberg, H.K., 2010. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist* 16, 79-106.
- Kimelberg, H.K., Nedergaard, M., 2010. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7, 338-353.
- Kiening, K.L., van Landeghem, F.K., Schreiber, S. Thomale, U.W., von Deimling, A., Unterberg, A.W., Stover, J.F., 2002. Decreased hemispheric aquaporin-4 is linked to evolving brain edema following controlled cortical impact injury in rats. *Neuroscience Letters* 324, 105-108.
- Landis, D.M., Reese, T.S., 1974. Differences in membrane structure between excitatory and inhibitory synapses in the cerebellar cortex. *Journal of Comparative Neurology* 155, 93-125.

- Le Sueur, L.P., Collares-Buzato, C.B.; Cruz-Höfling, M.A., 2004. Mechanisms involved in the blood-brain barrier increased permeability induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom in rats. *Brain Research* 1027, 38-47.
- Lehmenkühler, A., Syková, E., Svoboda, J., Zilles, K., Nicholson, C., 1993. Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience* 55, 339-51.
- Mafra, R.A., Figueiredo, S.G., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Cruz, J.D., De Lima, M.E., 1999. PhTx4, a new class of toxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes. *Brain Research* 831, 297-300.
- Mendonça, M.C., Soares, E.S., Stávale, L.M., Irazusta, S.P., Cruz-Höfling, M.A., 2012. Upregulation of the vascular endothelial growth factor, Flt-1, in rat hippocampal neurons after envenoming by *Phoneutria nigriventer*; age-related modulation. *Toxicon* 60, 656-664.
- Metaa, M.R., Kofuji, P., Newman, E.A. 2007 Neurovascular coupling is not mediated by potassium siphoning from glial cells. *Journal of Neuroscience* 27, 2468-2471.
- Nagelhus, E.A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F.M., Nielsen, S., Kurachi, Y., Ottersen, O.P., 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domain. *Glia* 26, 47-54.
- Neal, C.J., Lee, E.Y., Gyorgy, A., Ecklund, J.M., Agoston, D.V., Ling G.S., 2007. Effect of penetrating brain injury on aquaporin-4 expression using a rat model. *Journal of Neurotrauma* 24, 1609-1617.
- Nico, B., Ribatti, D., Frigeri, A., Nicchia, G.P., Corsi, P., Svelto, M., Roncali, L., 2002. Aquaporin-4 expression during development of the cerebellum. *Cerebellum* 1, 207–212.
- Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., Ottersen, O.P., 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *Journal of Neuroscience* 17, 171-180.

- Nunes, K.P., Toque, H.A., Borges, M.H., Richardson, M. Webb, R.C., De Lima, M.E., 2012. Erectile function is improved in aged rats by PnTx2-6, a toxin from *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Journal of Sexual Medicine* 9, 2574-2581.
- Rabinstein, A.A., 2010. Treatment of brain edema in acute liver failure. *Current Treatment Options in Neurology* 12, 129-141.
- Rapôso, C., Zago, G.M., da Silva, G.H., da Cruz-Höfling, M.A., 2007. Acute blood-brain barrier permeabilization in rats after systemic *Phoneutria nigriventer* venom. *Brain Research* 1149, 18-29.
- Rapôso, C., Odorissi, P.A., Oliveira, A.L., Aoyama, H., Ferreira, C.V., Verinaud, L., Fontana, K., Ruela-de-Sousa, R.R., Cruz-Höfling, M.A., 2012. Effect of *Phoneutria nigriventer* venom on the expression of junctional protein and P-gp efflux pump function in the blood-brain barrier. *Neurochemical Research* 37, 1967-1981.
- Rates, B., Verano-Braga, T., Santos, D.M., Nunes, K.P., Pimenta, A.M., De Lima, M.E., 2011. From the stretcher to the pharmacy's shelf: drug leads from medically important Brazilian venomous arachnid species. *Inflammation and Allergy - Drug Targets* 10, 411-419.
- Reichenbach, A., Derouiche, A., Kirchhoff, F., 2010. Morphology and dynamic of perisynaptic glia. *Brain Research Reviews* 63, 11-25.
- Risau, W., 1992. Induction of blood-brain barrier endothelial cell differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 633, 405-419.
- Rodier, P.M., 1995. Developing brain as a target of toxicity. *Environmental Health Perspectives* 103, S73-S76.
- Romano-Silva, M.A., Ribeiro-Santos, M.A., Ribeiro, A.M., Gomez, M.V., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Brammer, M.J., 1993. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX₂ and potassium depolarization. *Biochemistry Journal* 296, 313-319.
- Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., Davies, D.C., Krishna, S., Bell, B.A., 2002. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 72, 262-265.

- Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., Davies, D.C., Krishna, S., Bell, B.A., 2002. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 72, 262-265.
- Sato, S., Umenishi, F., Inamasu, G. Sato, M., Ishikawa, M., Nishizawa, M. Oizumi, T. , 2000. Expression of water channel mRNA following cerebral ischemia. *Acta Neurochirurgica* 76 (Suppl.), 239-241.
- Saubaméa, B., Cochois-Guégan, V., Cisternino, S., Scherrmann, J.M., 2012. Heterogeneity in the rat brain vasculature revealed by quantitative confocal analysis of endothelial barrier antigen and P-glycoprotein expression. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32, 81-92.
- Schenberg, S., Pereira-Lima, F.A., 1971. *Phoneutrianigriventer* venom In: Bücherl, W., Buckley, E.E. (Eds). *Venomous Animals and their Venom*, Academic Press, New York 3, 279-285.
- SINAN/SVS, Ministério da Saúde do Brasil. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>. Access at Feb. 10/2012.
- Stávale, L.M., Soares, E.S., Mendonça, M.P.C., Irazusta, S.P., Cruz-Höfling, M.A., 2013. Temporal relationship between aquaporin-4 and glial fibrillary acidic protein in cerebellum of neonate and adult rats administered a BBB disrupting spider venom. *Toxicon* 66, 37-46.
- Taniguchi, M., Yamashita, T., Kumura, E., Tamatani, M., Kobayashi, A., Yokawa, T., Maruno, M., Kato, A., Ohnishi, T., Kohmura, E., Tohyama, M., Yoshimine, T., 2000. Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Research and Molecular Brain Research* 78, 131-137.
- Verkman, A.S., Binder, D.K., Bloch, O., Auguste, K., Papadopoulos, M.C., 2006. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochimica and Biophysica Acta* 1758, 1085-1093.
- Wang, D.D., Bordey, A., 2008. The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology* 86, 342-367.
- Wang, Y., Tajkhorshid, E., 2010. Nitric oxide conduction by the brain aquaporin AQP4. *Proteins* 78, 661-670.
- Wen, H., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Agre. P., Ottersen, O.P., Nielsen, S.,

1999. Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal expression of the aquaporin-4 water channel. *European Journal of Neuroscience* 11, 935-945.

Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P., Noell, S., Mack, A.F., 2011. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *International Review of Cell and Molecular Biology* 287, 1-41.

Legend to Figures

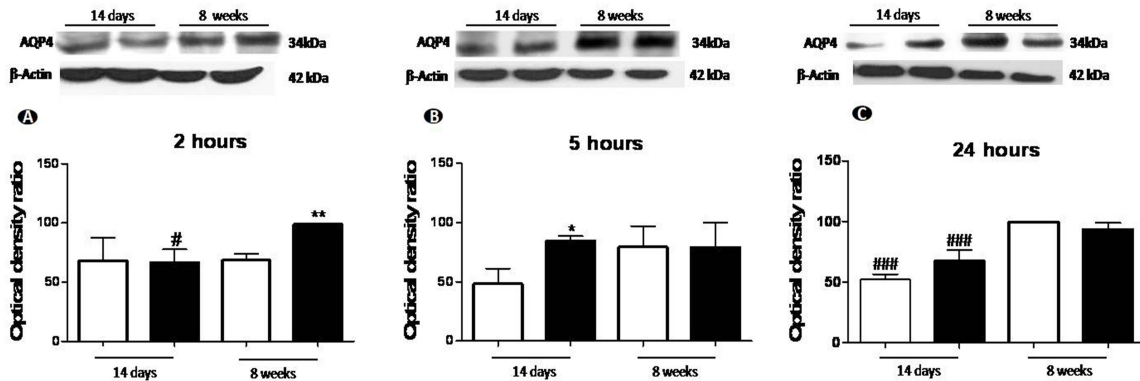


Fig. 1 – Immunoblots of AQP4 and graphical representation of their expression in the cerebellum of neonate (14 days) and adult (8-week-old) rats 2, 5 and 24 h after i.p. injection of saline (white bar) or PNV (black bar). * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$ compared to respective control; # $p \leq 0.05$ and ### $p \leq 0.001$ comparison between PNV-treated neonates and adults at 2 hours and between saline-treated at 5 and 24 h, respectively. β -actin was used as internal control. Data were the mean \pm S.E., unpaired *t*-test.

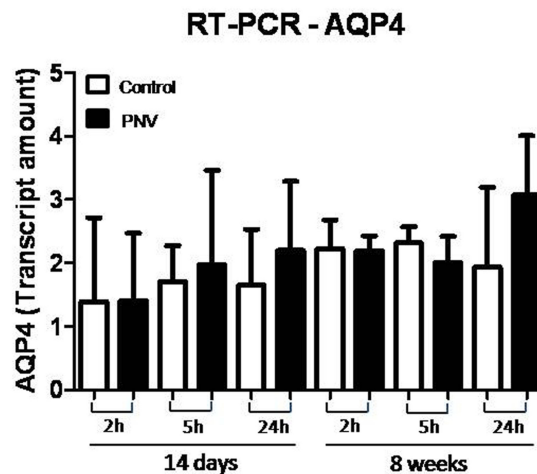


Fig. 2 – Graphic representation of AQP4 mRNA expression in the cerebellum of neonate and adult rats 2, 5 and 24 h after saline or PNV i.v. injection. mRNA expression attained its highest level 24 h after envenoming. GAPDH was used as internal control protein.

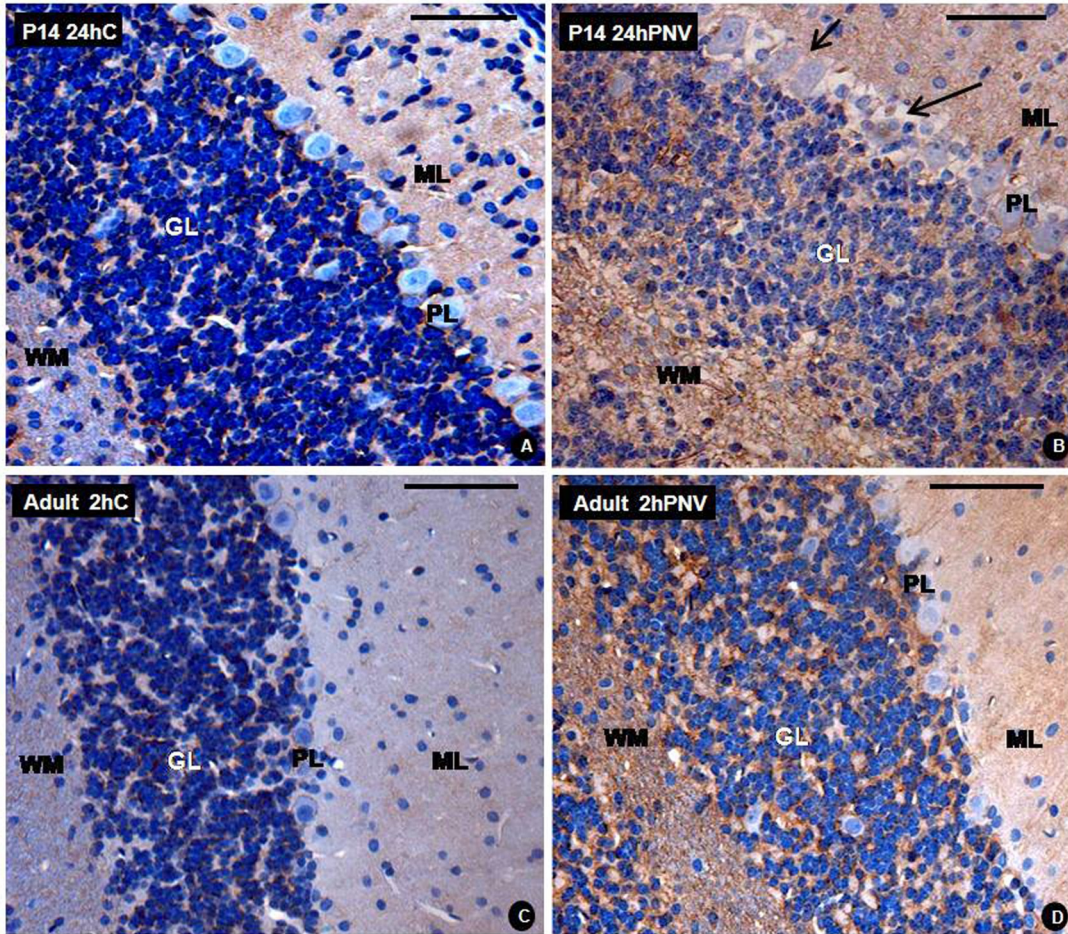


Fig. 3 – Representative anti-aquaporin-4 immunolabeling in the cerebellum of rats aged 14 days (P14) and 8 weeks (adults) injected with saline (controls, panels A and C) or the venom of *P. nigriventer* (PNV, panels B and D, 24 and 2 h, respectively). White matter = WM, molecular layer = ML, Purkinje layer = PL, granular layer = GL. **A.** Rats of both ages exposed to PNV showed stronger AQP4 labeling than corresponding controls. Arrows indicate edema and damage of Purkinje neurons in envenomed P14 rats. Bar = 100 μ m.