

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA
E FARMACOLOGIA

AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO POR
SINAPTOSOMAS CÉREBRO-CORTICAIS DE RATO, PELA
AÇÃO DA PEÇONHA DA SERPENTE CORAL SUL-AMERICANA,
***Micrurus lemniscatus* (LINNAEUS, 1758), E POR ALGUMAS DE**
SUAS FRAÇÕES SEMI-PURIFICADAS

ALESSANDRA DE CASTRO MONTANDON

BELO HORIZONTE /MG

2013

ALESSANDRA DE CASTRO MONTANDON

**AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO POR
SINAPTOSOMAS CÉREBRO-CORTICAIS DE RATO, PELA
AÇÃO DA PEÇONHA DA SERPENTE CORAL SUL-AMERICANA,
Micrurus lemniscatus (LINNAEUS, 1758), E POR ALGUMAS DE
SUAS FRAÇÕES SEMI-PURIFICADAS**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e
Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial à obtenção do título de mestre em
Fisiologia e Farmacologia. Área de concentração:
Farmacologia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Universidade Federal de Minas Gerais**

BELO HORIZONTE /MG

2013

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Órgãos financiadores: CNPq, CAPES, INCTTOX e FAPEMIG

*Aos meus queridos pais,
Maria Teresa e Alexandre, pelo
imenso amor, sacrifício e
incentivo em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e oportunidades.

Aos meus pais, que com muito amor e sacrifício, me proporcionaram incentivo e apoio durante toda jornada acadêmica.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Maria Elena, a quem tanto admiro, agradeço pela acolhida calorosa em seu laboratório, pela amizade, conselhos, confiança e pela grandiosa oportunidade de fazer parte de sua equipe.

Aos colegas e amigos do LVTA pela convivência enriquecedora, pelos momentos de descontração e pela troca de conhecimentos e experiência.

Às amigas Carol e Rosângela pela amizade, paciência e auxílio com os sinaptosomas.

Ao Daniel por dividir sua vasta experiência e pelo auxílio nos experimentos com lipossomos e espectrometria de massas.

À querida amiga e colaboradora Micheline Freire Donato, a quem tanto estimo e cuja amizade, conselhos e conhecimentos foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao meu noivo Fernando, pelo amor, compreensão e incentivo.

À minha irmã Luana pelo exemplo de esforço e dedicação.

Aos técnicos Júlio e Jamil pelo suporte técnico.

Às bioteristas Cida, Bete e Ilda pela amizade e cuidado com os animais.

Às colaboradoras da FUNED, Dra. Consuelo La Torre Fortes Dias e Paula Ladeira Ortolani pela disponibilidade e auxílio com o teste de fosfolipases.

Ao Prof. Dr. Adriano Pimenta pelas sugestões durante os seminários.

Aos professores Dr. Marco Antônio Peliky Fontes e Dra. Lígia Araújo Naves Kushmerick (banca examinadora) pela disponibilidade, interesse e sugestões.

À CAPES, CNPq, FAPEMIG e INCTTOX pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Em pequenas coisas, fatos, circunstância, aparece, com freqüência, a explicação de outras muito maiores que, sem tê-las visto pequenas, não poderiam ter explicação.”

Carlos Bernardo González Pecotche

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	22
1.1- SERPENTES: ASPECTOS BIOLÓGICOS, CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS.....	23
1.2- A FAMÍLIA ELAPIDAE.....	27
1.3- O GÊNERO <i>Micrurus sp.</i>	29
1.3.1- A serpente <i>Micrurus lemniscatus</i> (Linnaeus, 1758).....	30
1.4- PEÇONHAS OFÍDICAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	32
1.5- AS PEÇONHAS ELAPÍDICAS E OS ESTUDOS FARMACOLÓGICOS E PROTEÔMICOS.....	34
1.6- TOXINAS DE TRÊS-DÍGITOS (“Three-finger toxins”).....	35
1.6.1- α-Neurotoxinas elapídicas.....	37
1.7- FOSFOLIPASES.....	38
1.7.1- Fosfolipases elapídicas.....	42
1.8- A NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA.....	45
1.8.1- O glutamato como neurotransmissor.....	45
1.8.2- Metabolismo do glutamato.....	46
1.8.3- Transporte vesicular do glutamato.....	46
1.8.4- Depuração e ciclagem do glutamato.....	47
1.8.5- Liberação de glutamato.....	48
1.8.6- Receptores glutamatérgicos.....	48
1.8.7- Modulação da liberação de glutamato no SNC.....	50
1.8.8- Papel dos receptores glutamatérgicos na plasticidade sináptica e neurodegeneração.....	52

2.0- OBJETIVOS.....	55
2.1- OBJETIVOS GERAIS.....	56
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
3.0- MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.1- EQUIPAMENTOS.....	58
3.2- REAGENTES.....	58
3.3- BLOQUEADORES E TOXINAS.....	60
3.4- SOLUÇÕES.....	60
3.5- OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DA PEÇONHA BRUTA DE <i>M. lemniscatus</i>	62
3.6- ANIMAIS.....	62
3.7- PREPARAÇÃO DOS SINAPTOSOMAS.....	62
3.8- LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO.....	63
3.9- AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE SINAPTOSOMAL PELA DOSAGEM DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE (LDH).....	64
3.10- DOSAGEM PROTEICA DAS FRAÇÕES E DOS SINAPTOSOMAS.....	65
3.11- CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE L-GLUTAMATO.....	66
3.12- ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A ₂ DA PEÇONHA E DAS FRAÇÕES 20 E 31.....	67
3.13- PREPARO DE LIPOSSOMAS E MEDIDAS DE LIBERAÇÃO DE CALCEÍNA ENCAPSULADA.....	69
3.14- ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	70
4.0- RESULTADOS.....	71

4.1- AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA PEÇONHA BRUTA DE <i>M. lemniscatus</i> SOBRE A LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO POR SINAPTOSOMAS CÉREBRO-CORTICAIS DE RATO.....	72
4.2- AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS, OBTIDAS DA PEÇONHA DE <i>M. lemniscatus</i> , SOBRE A LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO POR SINAPTOSOMAS CÉREBRO-CORTICAIS DE RATO.....	73
4.3- CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO DAS FRAÇÕES 20 E 31, PURIFICADAS A PARTIR DA PEÇONHA DE <i>M. lemniscatus</i> , SOBRE A LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO DE SINAPTOSOMAS CÉREBRO-CORTICAIS DE RATO.....	75
4.4- AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE SINAPTOSOMAL- DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE (LDH) NA PRESENÇA DA PEÇONHA E DAS FRAÇÕES 20 E 31 DE <i>M. lemniscatus</i>	77
4.5- INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA PEÇONHA E DA FRAÇÃO 20 DE <i>M. lemniscatus</i> SOBRE A LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO POR SINAPTOSOMAS CÉREBRO-CORTICAIS DE RATO NA PRESENÇA DE 5 μ M DE TETRODOTOXINA (Ttx).....	79
4.6- INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA PEÇONHA E DA FRAÇÃO 20 DE <i>M. lemniscatus</i> SOBRE A LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO DE SINAPTOSOMAS CÉREBRO-CORTICAIS DE RATO NA PRESENÇA DE 100 μ M DE ÍONS CÁDMIO (Cd ⁺²).....	80
4.7- INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA PEÇONHA E DA FRAÇÃO 20 DE <i>M. lemniscatus</i> SOBRE A LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO DE SINAPTOSOMAS CÉREBRO-CORTICAIS DE RATO NA PRESENÇA DE 40mM DE ÍONS TETRAETILAMÔNIO (TEA).....	81

4.8- AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO INDUZIDA PELA PEÇONHA E FRAÇÃO 20 DE <i>M. lemniscatus</i> NA PRESENÇA DE ÍONS Sr^{+2} (2 MM).....	83
4.9- AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO INDUZIDA PELA PEÇONHA DE <i>M. lemniscatus</i> NA PRESENÇA DOS ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS D-TUBOCURARINA E ATROPINA, E DO AGONISTA CARBACOL.....	84
4.10- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A_2 DA PEÇONHA DE <i>M. lemniscatus</i> COMPARADA À DA PEÇONHA DE <i>Crotalus durissus terrificus</i>	86
4.11- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PEÇONHA E DAS FRAÇÕES 20 E 31 DE <i>M. lemniscatus</i> SOBRE A INTEGRIDADE DE LIPOSSOMOS.....	90
5.0- DISCUSSÃO.....	93
6.0- CONCLUSÃO.....	103
7.0- PERSPECTIVAS.....	105
8.0- REFERÊNCIAS.....	107
ANEXOS.....	130

RESUMO

MONTANDON, A. C. **Avaliação da liberação de L-glutamato por sinaptosomas cérebro-corticais de rato, pela ação da peçonha da serpente coral sul-americana, *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758), e por algumas de suas frações semi-purificadas.** 2013. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, AC: Farmacologia). Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG. Brasil.

Os acidentes ofídicos atribuídos ao gênero *Micrurus sp.*, apesar de raros, são extremamente severos e podem levar à morte por parada respiratória. As manifestações clínicas do envenenamento decorrem principalmente, da atividade neurotóxica da peçonha. O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC (sistema nervoso central), quando liberado em excesso, causa uma série de efeitos neurotóxicos, conhecidos como excitotoxicidade. Esses efeitos estão relacionados à patogênese de inúmeras doenças neurodegenerativas. Neste trabalho, investigou-se pela primeira vez, o efeito da peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus*, bem como de algumas de suas frações semi-puras, sobre a liberação de L-glu (L-glutamato) de sinaptosomas cérebro-corticais de rato. Após “screening” da atividade das frações semi-purificadas da peçonha, verificou-se que aquelas contendo PLA₂s foram responsáveis pela maior parte da liberação de L-glu. Duas destas frações, 20 e 31, constituídas segundo análise de massas, por α -NTxs e PLA₂s, respectivamente, induziram a liberação tempo-dependente de L-glu dos sinaptosomas. Das frações que não continham PLA₂s, apenas a fração 20 induziu aumento da liberação de L-glu. Essa fração, diferentemente da peçonha e da fração 31, não promoveu lise de sinaptosomas nem ruptura de lipossomos. Bloqueadores de canais para sódio e potássio não alteraram a liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20; no entanto, essa liberação foi parcialmente afetada na presença de cádmio, um bloqueador de canais para cálcio voltagem-dependente. Também não foram observadas alterações na liberação de L-glu induzida pela peçonha na presença de D-tubocurarina, atropina e carbacol. Entretanto, a liberação induzida pela mesma

e pela fração 20, foi completamente abolida quando o cálcio foi substituído por estrôncio no meio de incubação. A peçonha de *M. lemniscatus*, bem como a fração 31, exibiram alta atividade fosfolipásica quando comparadas à peçonha de *C. durissus terrificus*. Já a fração 20, sugerida ser uma α -NTx de cadeia curta, não mostrou atividade fosfolipásica. Assim, os resultados do presente trabalho sugerem que a neurotoxicidade central exercida *in vitro* pela peçonha de *M. lemniscatus*, pode estar relacionada à liberação excessiva de L-glu no SNC, ocasionada essencialmente pela atividade de PLA₂s presentes na mesma. Já a fração 20, pode estar associada aos sintomas de neurotoxicidade central apresentados por pacientes envenenados por esta serpente, uma vez que as PLA₂s, aparentemente, não atravessam a barreira hematoencefálica. A liberação de L-glu induzida pela peçonha e por esta fração, parece envolver, pelo menos parcialmente, a participação de canais para cálcio voltagem-dependentes, considerando-se a inibição parcial deste efeito pelo cádmio. Além do mais, a presença de cálcio parece ser essencial nesse processo, considerando-se a inibição total da liberação de L-glu pelo estrôncio.

Palavras-chave: *Micrurus lemniscatus*, PLA₂s, neurotoxicidade, liberação de L-glu

ABSTRACT

MONTANDON, A. C. **Evaluation of L-glutamate release by rat brain cortical synaptosomes, by the action of the south american coral snake venom, *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758), and by some of its semi-purified fractions.** 2013. Dissertation (Post-graduation Program in Biological Science: Physiology and Pharmacology, CA: Pharmacology). Laboratory of Animals Venoms and Toxins, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte/MG. Brazil.

The ophidic accidents attributed to the genus *Micrurus sp.*, despite rare, are extremely severe and can lead to death by respiratory arrest. The clinical manifestations of envenoming arise mainly from venom neurotoxic activity. Glutamate, the main excitatory neurotransmitter in CNS (central nervous system), when released in excess, causes neurotoxic effects, known as excitotoxicity. These effects are related to the pathogenesis of many neurodegenerative diseases. In this work, we investigated for the first time, the effect of *Micrurus lemniscatus* snake venom, as well as some of its semi-purified fractions, on the release of L-glu (L-glutamate) from rat brain synaptosomes. After an "screening" of the activity of venom semi-purified fractions, it was found that those containing PLA₂s were responsible for the most part of L-glu release. Two of these fractions, 20 and 31, composed according to mass analysis by α -NTxs and PLA₂s, respectively, induced the release time-dependent of L-glu from synaptosomes. Between the tested fractions having no PLA₂s, only fraction 20, induced increased L-glu release. This fraction, unlike the venom and fraction 31, did not cause synaptosomes lysis or liposomes rupture. Sodium and potassium channels blockers, did not change L-glu release by venom and fraction 20; however, this release was partially affected in the presence of cadmium, an inespecific voltage-dependent calcium channels blocker. Also, it was not observed changes in L-glu release induced by the venom in the presence of D-tubocurarine, atropine and carbachol. However, L-glu release induced by venom and by fraction 20, was completely abolished when calcium was replaced by strontium in the incubation medium. *M. lemniscatus* venom, as well as fraction 31 exhibited high

phospholipasic activity when compared to *C. durissus terrificus* venom. The fraction 20, suggested to be a possible short chain α -NTx, showed no phospholipase activity. Thus, the results of this study suggest that the central neurotoxicity exerted *in vitro* by *M. lemniscatus* venom may be related to excessive release of L-glu in the CNS, caused mainly by the activity of PLA₂s present in it. The fraction 20, may be associated with the central neurotoxicity symptoms found in patients envenomed by this snake, since the PLA₂s, apparently, do not cross the blood brain barrier. The increased L-glu release induced by the venom and by this fraction, seems to involve, at least in part, the contribution of voltage-dependent calcium channels, considering the partial inhibition of this effect by cadmium. Moreover, the presence of calcium ions seems to be essential in this process, considering the total inhibition of L-glu release by strontium.

Keywords: *M. lemniscatus*, PLA₂s, neurotoxicity, L-glu release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação das serpentes quanto ao aparelho inoculador de peçonha.....	25
Figura 2- Desenho esquemático de um exemplar macho de <i>Micrurus lemniscatus</i> e sua localização geográfica no território brasileiro.....	31
Figura 3- Estruturas tridimensionais de toxinas elapídicas de três-dígitos que interagem com receptores nicotínicos de acetilcolina.....	36
Figura 4- Sequências de aminoácidos de neurotoxinas de três-dígitos que interagem com receptores nicotínicos de acetilcolina musculares.....	37
Figura 5- Sítios de clivagem dos fosfolipídeos pelas diferentes classes de fosfolipases.....	39
Figura 6- Estruturas tridimensionais de PLA ₂ s ofídicas.....	41
Figura 7- Figura esquemática do transportador de glutamato.....	47
Figura 8- Comparação entre os receptores NMDA e não-NMDA.....	50
Figura 9- Neurotransmissão glutamatérgica.....	54
Figura 10- Reação catalisada pela enzima glutamato desidrogenase.....	64
Figura 11- Reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase.....	65
Figura 12- (A): Curva representativa da intensidade de fluorescência x tempo de diferentes concentrações de L-glutamato. (B) Reta da regressão linear representativa da média de três leituras.....	67
Figura 13- Molde da placa de Petri utilizada para o teste da atividade fosfolipásica.....	69
Figura 14- Espectro de massas referente à toxina Mltx 20 (MM = 6.675 Da), obtida pelo fracionamento bidimensional da peçonha de <i>M. lemniscatus</i>	101
Figura 15- Sequência N-terminal da toxina Mltx 20 (MM = 6.675 Da).....	101

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Cinética da liberação de L-glu induzida por diferentes concentrações da peçonha bruta de <i>M. lemniscatus</i> por sinaptosomas cérebro-corticais de rato.....	72
Gráfico 2A- Efeito de diferentes frações obtidas por cromatografia em fase reversa (RP-HPLC) da peçonha de <i>M. lemniscatus</i> sobre a liberação de L-glu de sinaptosomas cérebro-corticais de rato.....	74
Gráfico 2B- Cinética da liberação de L-glu induzida por diferentes frações cromatográfica obtidas da peçonha de <i>M. lemniscatus</i> em sinaptosomas cérebro-corticais de rato.....	74
Gráfico 3- Cinética da liberação de L-glu de sinaptosomas cérebro-corticais de rato sob efeito de diferentes concentrações da fração 20, purificada da peçonha de <i>M. lemniscatus</i>	76
Gráfico 4- Cinética da liberação de L-glu de sinaptosomas cérebro-corticais de rato sob efeito de diferentes concentrações da fração 31, purificada da peçonha de <i>M. lemniscatus</i>	77
Gráfico 5- Atividade da enzima Lactato Desidrogenase após incubação dos sinaptosomas com diferentes concentrações da peçonha bruta e das frações 20 e 31.....	78
Gráfico 6- Efeito da tetrodotoxina (Ttx) sobre a liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20 de <i>M. lemniscatus</i> , em sinaptosomas cérebro-corticais de rato.....	80
Gráfico 7- Efeito dos íons Cd^{+2} (100 μ M), sobre a liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20 de <i>M. lemniscatus</i> em sinaptosomas cérebro-corticais de rato.....	81
Gráfico 8- Efeito dos íons tetraetilamônio (TEA) sobre a liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20 de <i>M. lemniscatus</i> , em sinaptosomas cérebro-corticais de rato.....	82

Gráfico 9- Efeito da substituição de Ca^{+2} por Sr^{+2} sobre a liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20 de <i>M. lemniscatus</i> , em sinaptosomas cérebro-corticais de rato.....	84
Gráfico 10- Efeito dos antagonistas e agonista colinérgicos D-tubocurarina, atropina, e carbacol, respectivamente, sobre a liberação de L-glu induzida pela peçonha bruta de <i>M. lemniscatus</i> em sinaptosomas cérebro-corticais de rato.....	85
Gráfico 11- Comparação das atividades fosfolipásicas das peçonhas das serpentes: (A) <i>Micrurus lemniscatus</i> e (B) <i>Crotalus durissus terrificus</i>	87
Gráfico 12- Atividade fosfolipásica da peçonha (C), fração 31 (D) e fração 20 (E) de <i>M. lemniscatus</i> quando utilizadas nas mesmas concentrações utilizadas para a confecção das curvas de liberação de L- glu.....	89
Gráfico 13- Efeito da peçonha e das frações 20 e 31 de <i>M. lemniscatus</i> sobre lipossomos de L- α - fosfatidilcolina de soja.....	91
Gráfico 14- Cinética da liberação de calceína a partir de lipossomos de L- α -fosfatidilcolina de soja sob ação da peçonha e das frações 20 e 31 de <i>M. lemniscatus</i>	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tabela representativa dos casos registrados de acidentes por animais peçonhentos no Brasil no período de 2009 a 2013.....	26
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Comparação do conteúdo enzimático das peçonhas de <i>Micrurus sp.</i>	32
Quadro 2- Fármacos e ferramentas para diagnósticos clínicos produzidos a partir da peçonha de serpentes.....	34
Quadro 3- Soluções para o preparo da solução de Biureto.....	66
Quadro 4- Similaridade estrutural obtida para a extremidade N-terminal da toxina Mltx 20 (MM= 6.675 Da).....	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS : Aminoácidos

ACh : Acetilcolina

AMPA : Ácido alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

ATP : Adenosina trifosfato

BDNF : Fator Neurotrófico Derivado Cerebral

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BSA : Albumina de soro bovino

cPLA₂ : Fosfolipase A₂ citosólica

Crtx : Crotoxina

Ctl : Controle

DL₅₀ : Dose letal média

DTT : Ditionitrito

EAAT1 : Transportadores de aminoácidos excitatórios tipo 1

EAAT2 : Transportadores de aminoácidos excitatórios tipo 2

EAAT3 : Transportadores de aminoácidos excitatórios tipo 3

EAAT4 : Transportadores de aminoácidos excitatórios tipo 4

EAAT5 : Transportadores de aminoácidos excitatórios tipo 5

EAATs : Transportadores de aminoácidos excitatórios

EC₅₀ : Concentração eficaz média

EDTA : Ácido etileno diamino tetracético

GABA : Ácido gama-aminobutírico

GDH : Glutamato desidrogenase

HEPES : 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano ácido sulfônico

i. p : Intraperitoneal

iGluRs : Receptores ionotrópicos de glutamato

iPLA₂ : Fosfolipases independentes de cálcio

KA : Kainato

KRH : Krebs-Ringer-HEPES

Kv : Canais de potássio voltagem-dependentes

LDH : Lactato desidrogenase

L-glu : L-glutamato

Log [] : Logarítimo da concentração

Ip-PLA₂ : Fosfolipases A₂ associadas a lipoproteínas

LTD : Depressão de longa duração

LTP : Potenciação de longa duração

mAChRs : Receptores muscarínicos de acetilcolina

mGluRs : Receptores metabotrópicos de glutamato

nAChRs : Receptores nicotínicos de acetilcolina

NAD : Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH : Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto

NADP : Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NMDA : N-metil -D-aspartato

PAF-AH : Acetilhidrolases ativadoras de fator plaquetário

PBS : Phosphate Buffer Solution

PCP : Fenilciclídina

PLA : Fosfolipase A

PLA₁ : Fosfolipase A₁

PLA₂ : Fosfolipase A₂

PLB : Fosfolipase B

PLC : Fosfolipase C

PLD : Fosfolipase D

q. s. p : Quantidade suficiente para

RP-HPLC : Cromatografia Líquida de Fase Reversa

rpm : Rotações por minuto

SAE : Soro anti-elapídico

SNARE : Receptores solúveis de ligação à N-etilmaleimida

SNC : Sistema Nervoso Central

sPLA₂ : Fosfolipase A₂ secretória

Syp 1 : Sinapsina 1

TEA : Tetraetilamônio

TFA : Ácido trifluoracético

Ttx : Tetrodotoxina

VAMP 2 : Sinaptobrevina 2

VGLUT1 : Transportador Vesicular de Glutamato tipo 1

VGLUT2 : Transportador Vesicular de glutamato tipo 2

VGLUT3 : Transportador Vesicular de glutamato tipo 3

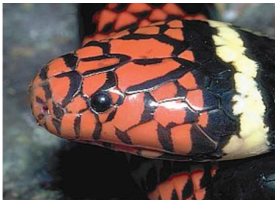
VGLUTs : Transportadores Vesiculares de Glutamato

α-NTxs : Alfa-Neurotoxinas

β-NTx : Beta-Neurotoxina

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Resíduo	Símbolo de três letras	Símbolo de uma letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V



Introdução

1.0- INTRODUÇÃO

1.1- Serpentes: aspectos biológicos, clínicos e epidemiológicos

As serpentes pertencem à Classe Reptilia, Ordem Squamata e Subordem Ophidia ou Serpentes. Originárias provavelmente do período Cretáceo inferior, a maioria das serpentes tiveram seu maior desenvolvimento durante o Cenozóico. Apesar de controvérsias, acredita-se que as mesmas tenham sido derivadas de lagartos de vida subterrânea, que por adaptação, sofreram o alongamento do corpo, redução das patas e semi-atrofia dos olhos (LEE, 1997; FRANCO, 2003). As serpentes, além da forma alongada do corpo e ausência de membros locomotores, caracterizam-se pela ausência de pálpebras móveis, presença de escamas epidérmicas, ausência de ouvido médio e externo e grande elasticidade nos movimentos cranianos. Existem mundialmente, cerca de 3.000 espécies conhecidas, presentes em todos os continentes, com exceção da Antártida. Devido à dependência de calor externo para realizar a termorregulação, as serpentes habitam principalmente as regiões temperadas e tropicais (MELGAREJO, 2003).

Em relação à alimentação, as serpentes são essencialmente carnívoras, alimentando-se desde pequenos invertebrados até mamíferos, aves, peixes e outras serpentes. A frequência alimentar está em geral, associada à digestão, podendo tolerar um jejum de meses. De acordo com o ambiente explorado pelas serpentes em busca de abrigo e comida, as mesmas podem ser classificadas em terrestres, arborícolas, aquáticas e fossoriais (HICKMAN JR, ROBERTS, LARSON, 2004). A estratégia de captura das presas varia muito dentro da subordem das serpentes, incluindo desde grandes espécies constritoras até as peçonhentas (AMARAL, 1927).

A superfamília Colubroidea compreende a maioria das espécies de serpentes atuais e somente a família Colubridae compreende dois terços do grupo. Muitas serpentes Colubroideas são venenosas e as espécies das famílias Viperidae e Elapidae desenvolveram um aparato inoculador de veneno altamente especializado, constituído pela glândula de veneno desenvolvida (glândula de Duvernoy), onde o mesmo é produzido e estocado, ligada através de ductos a um par de presas

inoculadoras na porção anterior da boca. Devido à presença desse aparato inoculador, as serpentes das famílias Viperidae e Elapidae são denominadas peçonhentas, ao contrário da família Colubridae, que possui algumas espécies venenosas, porém não-peçonhentas (KARDONG, 1982; POUGH, HEISER, McFARLAND, 1999).

De acordo com a capacidade de injetar a peçonha, as serpentes são classificadas em:

- Áglifas: (*a*= ausência; *glyphé*= sulco) possuem dentes pequenos e iguais sem sulco ou canal. As presas inoculadoras encontram-se ausentes. Ex: Jararacuçu-do-brejo (*Mastigodryas bifossatus*) (Fig. 1A);
- Opistóglifas: (*opisthos*= atrás, *glyphé*= sulco) presença de dois ou mais dentes posteriores com sulco na parte anterior ou lateral. Apresentam grande dificuldade na inoculação da peçonha. Ex: falsas corais (*Erythrolamprus sp.*) (Fig. 1B);
- Proteróglifas: (*protero*= dianteiro, *glyphé*= sulco) possuem o maxilar imóvel, com um par de presas sulcadas bem desenvolvido na porção anterior. Ex: corais verdadeiras (*Micrurus sp.*) (Fig. 1C);
- Solenóglifas (*soleno*= canal, *glyphé*= sulco) possuem um par de presas grandes, bem desenvolvidas, sulcadas centralmente e inseridas em um maxilar reduzido e móvel. Ex: Cascavel (*Crotallus durissus terrificus*). (Fig. 1D) (SOERENSEN, 2000).

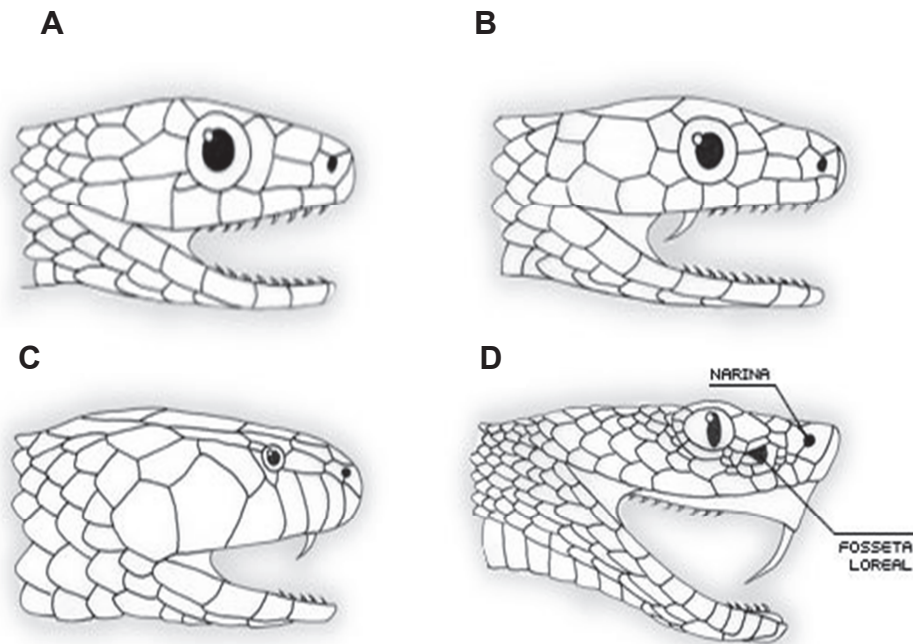


FIGURA 1- Classificação das serpentes quanto ao aparelho inoculador de peçonha. (A) Áglifas, (B) Opistóglifas, (C) Proteróglifas e (D) Solenóglifas. Fonte: (Adaptado de <http://www.blogdonurof.wordpress.com>).

Estima-se que ocorram mundialmente, mais de 5 milhões de envenenamentos ofídicos por ano, resultando em cerca de 20.000 a 125.000 óbitos (CHIPPAUX, 1998; GUTIÉRREZ et al., 2010; KASTURIRATNE et al., 2008; WILLIAMS et al., 2010). Os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública, sobretudo nos países tropicais, em virtude de sua frequência e gravidade. No Brasil, observa-se uma média de 20.000 casos anuais, sendo a maioria das notificações procedentes das regiões norte, sudeste e nordeste, com letalidade de 0,45% (BRASIL, 2013).

O primeiro estudo epidemiológico nacional de acidentes ofídicos foi realizado por Vital Brazil em 1901, ao levantar o número de óbitos por picadas de serpentes peçonhentas no estado de São Paulo, passando a distribuir juntamente com as ampolas de soros anti-peçonhentos, o “*Boletim para Observação de Accidente Ophidico*”, para ser preenchido com dados referentes ao acidente que levou ao uso do antiveneno (BOCHNER, STRUCHINER, 2003).

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), dentre os casos registrados de acidentes por animais peçonhentos no Brasil, os acidentes ofídicos ocupam o segundo lugar, sendo apenas superados pelos

escorpiônicos (BRASIL, 2013) (Tab. 1). A ocorrência dos acidentes está relacionada na maioria das vezes a fatores climáticos e ao aumento da atividade humana no campo, sendo as principais vítimas, trabalhadores rurais do sexo masculino com faixa etária entre 15 a 49 anos, com acometimento maior dos membros inferiores (BRASIL, 2001).

TABELA 1 – Tabela representativa dos casos registrados de acidentes por animais peçonhentos no Brasil no período de 2009 a 2013.

Tipo de acidente	Notificações
TOTAL	542.737
Ignorado/Branco	35.767
Serpente	122.838
Aranha	104.303
Escorpião	228.900
Lagarta	15.821
Abelha	35.108

Fonte: (Adaptado de BRASIL, 2013)

A herpetofauna brasileira é uma das mais vastas do mundo e compreende 375 espécies de serpentes, das quais 55 são peçonhentas (BÉRNILS, COSTA, 2011). Os principais gêneros de serpentes de importância médica no Brasil pertencem às famílias Viperidae (*Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) e Elapidae (*Micrurus*). O gênero *Bothrops* contribui com aproximadamente 85,8% dos acidentes, seguido pelo gênero *Crotalus* (9,4%), *Lachesis* (3,8%) e *Micrurus* (0,9%) (BRASIL, 2013).

Os acidentes causados pelo gênero *Micrurus sp.*, apesar de raros, possuem índice de letalidade de 0,36% e devem ser considerados como potencialmente graves, devido ao risco de evolução para insuficiência respiratória aguda e apnéia (AZEVEDO-MARQUES, CUPO, HERIING, 2003; MORAES et al., 2003). A severidade dos acidentes depende de alguns fatores como o tamanho da serpente,

quantidade de peçonha injetada e o tamanho da vítima. Em geral, a dose letal para humanos é cerca de 4 a 5mg da peçonha, podendo ocorrer injeção de até 20mg por uma serpente adulta (ÁLAPE-GIRÓN et al., 1994; FIX, 1980).

Os sintomas do envenenamento por *Micrurus sp.* são primariamente neurotóxicos, podendo aparecer precocemente, em menos de 1 hora após a picada (AZEVEDO-MARQUES, CUPO, HERING, 2003; VITAL BRAZIL, 1987). O paciente, inicialmente apresenta pouca reação tecidual local e dor discreta, em geral acompanhada de parestesia com tendência à progressão proximal. Posteriormente, pode surgir um quadro de fraqueza muscular generalizada, ptose palpebral, oftalmoplegia e a presença de fácies miastênica ou “neurotóxica”. Associadas a estas manifestações, o paciente pode apresentar mialgia, dificuldade em manter a posição ereta e dificuldade de deglutição em virtude da paralisia velopalatina (BRASIL, 2001; PARDAL et al., 2010).

As manifestações sistêmicas decorrem do bloqueio progressivo dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) na junção neuromuscular pela ação das α -neurotoxinas (α -NTxs) presentes na peçonha, resultando em uma síndrome semelhante ao curare, que induz depressão do sistema nervoso central (SNC), paralisia muscular e instabilidade vasomotora (PARDAL et al., 2010; PETERSON, 2006). Esses sinais são consistentes com disfunção bulbar, em que o paciente apresenta alto risco de falência respiratória, espasmos faríngeais, hipersalivação, cianose e trismus (espasmo dos músculos mastigatórios) (PETERSON, 2006).

O tratamento dos acidentes por *Micrurus sp.*, é realizado através da administração intravenosa do soro anti-elapídico (SAE), obtido através da imunização em cavalos com a peçonha das serpentes *M. frontalis* e *M. corallinus* (PARDAL et al., 2010). Nos casos de manifestações de insuficiência respiratória, é necessária a manutenção do paciente sob suporte ventilatório adequado. O prognóstico é favorável, desde que haja assistência ventilatória e soroterápica adequadas (BRASIL, 2001).

1.2 – A família Elapidae

Os representantes da família Elapidae possuem uma vasta distribuição geográfica, sendo encontrados principalmente em regiões tropicais e subtropicais, como Ásia, África, Austrália, América do norte e América do sul. Algumas serpentes elapídicas são aquáticas e podem ser encontradas nos oceanos Pacífico e Índico. Atualmente, a família Elapidae compreende cerca de 250 espécies de serpentes distribuídas em mais de 50 gêneros, com comprimentos que variam de 18cm (*Ogmodon vitiensis*) a 6m (*Ophiophagus hannah*) (CARDOSO et al., 2003; ZUG, 1993).

O aparelho inoculador de peçonha é do tipo proteróglifo, sendo as presas relativamente imóveis e posicionadas na porção anterior da maxila. Os hábitos das serpentes elapídicas, juntamente com seu padrão de escamas corporais favorecem sua forma alongada e delgada. As serpentes elapídicas são predominantemente diurnas e quase sempre não possuem fosseta loreal, sendo a maioria ovípara (ZUG, 1993).

Na aparência externa, os elapídeos terrestres assemelham-se a seus ancestrais Colubrídeos, apresentando escamas corporais lisas, a cabeça recoberta por grandes escudos epidérmicos e nem sempre distinta do pescoço e olhos com pupilas redondas. Normalmente, as serpentes elapídicas possuem comportamento muito ativo, sendo alguns gêneros arborícolas (ex: *Pseudohaje*, *Dendroaspis* e *Hoplocephalus*) e outros mais ou menos especializados para a escavação (ex: *Ogmodon*, *Parapistocalamus*, *Simoselaps*, *Toxicocalamus*, *Vermicella*). Em relação à alimentação, algumas espécies possuem dietas muito generalizadas, enquanto outras possuem preferência por presas específicas e desenvolveram especializações morfológicas correlatas, como por exemplo, para a alimentação de outras serpentes, lagartos, ovos, mamíferos, anfíbios, aves, peixes, etc (KEOH, 2004).

Filogeneticamente, a família Elapidae é classificada em duas subfamílias: Hydrophiinae e Elapinae (SLOWINSKI, KNIGHT, ROONEY, 1997; KEOGH, 1998; GAYWOOD, SPELLERBERG, 1999). A subfamília Hydrophiinae compreende as serpentes marinhas encontradas nas águas do oeste do Oceano Pacífico e Índico. Essas serpentes possuem uma série de adaptações anatômicas e fisiológicas, como o corpo comprimido lateralmente, cauda bastante desenvolvida, pele pouco

permeável, além da presença de glândula de sal ao redor da língua, que funciona como regulador osmótico (CAMPBELL, LAMAR, 2004).

A subfamília Elapinae contém todos os elapídeos terrestres, como os gêneros *Naja* (cobras), *Bungarus* (kraits), *Dendroaspis* (mambas) e *Ophiophagus* (cobra-rei) na África; os gêneros *Acanthophis* (víbora da morte), *Pseudonaja*, *Notechis* (cobra-tigre) e *Oxyuranus* (taipans) na Austrália; os gêneros *Micrurus*, *Leptomicrurus* e *Micruroides* (cobras corais) nas Américas e os gêneros *Calliophis*, *Sinomicrurus* e *Hemibungarus* na Ásia (cobras corais asiáticas). Também pertencem a esta subfamília as serpentes marinhas do gênero *Laticauda* (sea kraits). Devido à alta letalidade de suas peçonhas, as serpentes elapídicas australianas formam um dos grupos mais perigosos e temidos do mundo (CAMPBELL, LAMAR, 2004; CASTOE et al., 2007).

1.3- O gênero *Micrurus*

Nas Américas, os principais representantes da família Elapidae são as serpentes do gênero *Micrurus*, popularmente conhecidas como cobras corais (MELGAREJO, 2003). No Brasil, existem 20 espécies com uma ampla distribuição. São elas: *M. albicinctus*, *M. altirostris*, *M.averyi*, *M. brasiliensis*, *M. corallinus*, *M. decoratus*, *M. filiformis*, *M. frontalis*, *M.hemprichii*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus*, *M. mipartitus*, *M. ornatissimus*, *M. paraensis*, *M. putumayensis*, *M. spixii*, *M. surinamensis*, *M. tricolor*, *M. silviae* e *M. whenerorum* (DA SILVA JR, SITES, 2001; DI BERNARDO, BORGES-MARTINS, DA SILVA JR, 2007).

As serpentes corais possuem hábitos fossoriais e semi-fossoriais e são raramente vistas, mesmo em áreas muito densas (DA SILVA JR, SITES, 2001). Essas serpentes são encontradas habitando principalmente as camadas superficiais do solo ou sob a serrapilheira que cobre o chão das matas, saindo eventualmente à procura de alimento, para acasalar ou após as chuvas fortes (CARDOSO et al., 2003; SOERENSEN, 2000). Em geral, as serpentes corais apresentam um padrão característico de cores, exibindo combinações de anéis vermelhos, brancos ou amarelos e pretos dispostos em tríades ao redor do corpo. A alimentação é

composta de pequenas serpentes, lagartos e anfisbenídeos. Algumas espécies possuem hábitos nutricionais especializados, como as serpentes *M. surinamensis* e *M. lemniscatus*, que por serem semi-aquáticas, alimentam-se de peixes (CAMPBELL, LAMAR, 2004; ROZE, 1983; SAVAGE, SLOWINSKI, 1992).

Morfologicamente, as serpentes corais apresentam a cabeça oval recoberta por grandes placas simétricas, ausência de fosseta loreal, olhos pequenos e pretos com pupila redonda e pescoço pouco distinto da cabeça, em função do desenvolvimento da musculatura cervical para a escavação. O corpo é recoberto por escamas lisas e a cauda curta dá nome ao gênero (do grego *Micrurus* = pequena cauda) (HARVEY, APARICIO, GONZALEZ, 2003 ; SOERENSEN, 2000).

Devido às limitações anatômicas e funcionais, como cinética craniana limitada, pequena abertura bucal (aproximadamente 30º) e presas fixas de 2,5 mm, as serpentes corais apresentam uma injeção de peçonha difícil e superficial, que é compensada pelo hábito de morder a presa sem soltar, prolongando o tempo de inoculação (CARDOSO et al., 2003). Estas características juntamente com o hábito semi-fossorial e a baixa agressividade dessas serpentes, corroboram para a baixa incidência dos acidentes por *Micrurus sp* (BARRAVIERA, 1999; BROAD, SUTHERLAND, COULTER, 1979).

1.3.1- A serpente *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758)

A serpente *Micrurus lemniscatus*, cuja peçonha foi utilizada neste trabalho é uma espécie encontrada em toda América do Sul, sobretudo em países como Guianas, Trinidad, Venezuela, Colômbia, Equador e Bolívia (VITAL BRAZIL, 1987) No Brasil, essa espécie é mais comumente encontrada no vale amazônico, litoral atlântico e no cerrado (Figura 2). Possui porte avantajado, podendo alcançar ou ultrapassar 1,5m de comprimento. No Brasil, são descritas quatro subespécies: *M. l. lemniscatus*, *M. l. diutius*, *M. l. carvalhoi* e *M. l. helleri* (CARDOSO et al., 2003).

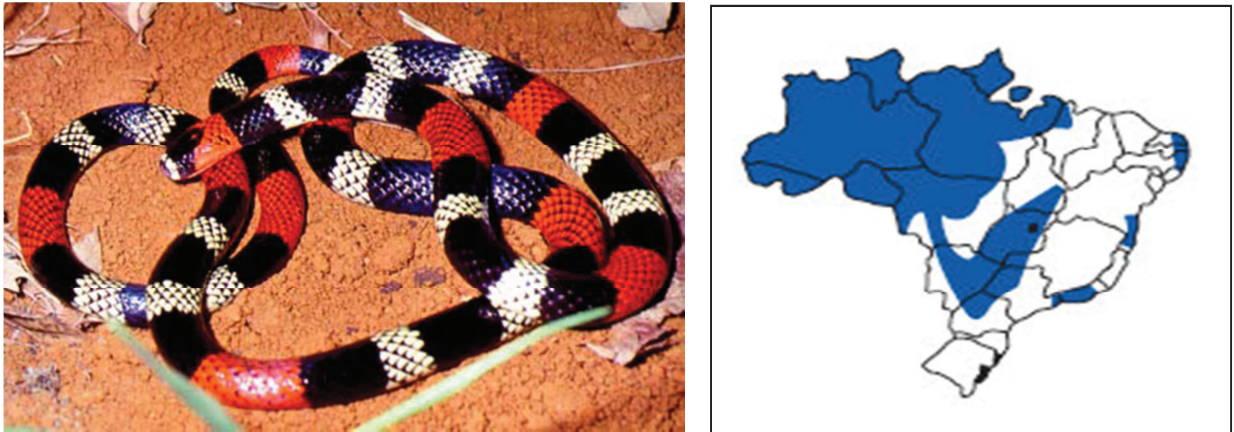


FIGURA 2 – Desenho esquemático de um exemplar macho de *Micrurus lemniscatus* e sua localização geográfica no território brasileiro. Fonte: (PEREIRA-FILHO, 2007).

Criptozóica e com atividades diurnas e noturnas (SAZIMA, ABE, 1991; MARTINS, OLIVEIRA, 1998) a serpente *Micrurus lemniscatus* habita áreas florestadas e abertas, geralmente locais com bastante umidade e ambientes antropizados (CAMPBELL, LAMAR, 2004). A alimentação é composta por outras serpentes, peixes e anfisbenídeos (SAZIMA, ABE, 1991). Apesar de ovípara, a biologia reprodutiva de *M. lemniscatus* é praticamente desconhecida. No entanto, dados de campo e de padrões de atividade de espécimes do Sudeste do Brasil, parecem indicar que a cópula ocorra do fim da estação chuvosa à primeira metade da estação seca (MARQUES et al., 2006).

Quanto à descrição da espécie, apresenta menos de 260 escamas ventrais, 12 ou mais tríades de anéis coloridos no corpo e uma na cauda, sendo cada tríade composta por três anéis pretos e dois brancos intercalados (tão largos quanto os anéis pretos distais). As tríades são separadas por anéis vermelhos (tão largos quanto os anéis pretos intermediários). A ponta do focinho é preta seguida de uma faixa branca internasal (CARVALHO, ALENCAR, VILAR, 2007).

Em um estudo realizado por Tanaka et al. (2010), estimou-se a dose letal 50% (DL₅₀) para a peçonha de *M. lemniscatus* em 13 µg /camundongo (18-22 g) -i.p., apresentando alta atividade neurotóxica se comparada a outras espécies de

Micrurus, como *M. ibiboboca*, *M. surinamensis*, *M. hemprichii*, *M. fulvius* e *M. frontalis*.

1.4- Peçonhas ofídicas: características gerais

As peçonhas ofídicas são secreções altamente tóxicas produzidas por glândulas salivares modificadas e inoculadas através de um aparato especializado. Nas serpentes, a peçonha constitui uma adaptação evolutiva utilizada para a imobilização das presas, digestão e secundariamente para a defesa (KARDONG, 1996).

Em geral, a composição da peçonha das serpentes é influenciada por uma série de fatores, como a origem geográfica, a sazonalidade, o sexo, a idade e o tipo de presa à qual é destinada, havendo variações intra e interespecíficas (AIRD, DA SILVA JR, 1991; DA SILVA JR, AIRD, 2001; DALTRY, WUSTER, THORPE, 1996). Essa composição varia entre 70-90% de proteínas e polipeptídeos e 10 a 30% de carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, compostos orgânicos e íons (DA SILVA JR, BUCARETCHI, 2003). As proteínas e polipeptídeos são os principais responsáveis pela ação tóxica rápida e seletiva da peçonha, interferindo em uma série de processos fisiológicos e moleculares específicos (FRY et al., 2005; STOCKER, 1990).

Também são encontradas na peçonha das serpentes 5 classes diferentes de enzimas (Quadro 1), sendo a maioria de natureza hidrolítica: oxidoredutases (L-aminoácido-oxidases e lactato-desidrogenases), hidrolases (fosfodiesterases e 5-nucleotidases), glicosidases (hialuronidases), proteases (serinoproteases e metaloproteases) e lipases (acetilcolinesterases e fosfolipases) (IWANAGA, SUZUKI, 1979 ; ZELLERS, 2006).

QUADRO 1 – Comparação do conteúdo enzimático das peçonhas de *Micrurus sp.* As abreviações relativas aos nomes das enzimas correspondem a: Acetil = acetilcolinesterase; Hialuron = hialuronidase; L-aminodes = L-aminoácido-oxidase; 5'- nucleo = 5'- nucleotidase; Fosfodies = fosfodiesterases; PLA₂ = fosfolipases; Prote = proteases e Leu = leucina aminopeptidase.

Espécies de <i>Micrurus</i> sp.	ENZIMAS							
	Acetil	Hialuron	L-aminodes	5'-nucleo	Fosfodies	PLA ₂	Prote	Leu
<i>M. albicinctus</i>		traços fortes	traços fortes		traços moderados	traços moderados	traços leves	
<i>M. corallinus</i>		traços fortes	traços fortes		traços moderados	traços moderados	traços leves	
<i>M. f. altirostris</i>			traços fortes			traços moderados	traços leves	
<i>M. f. brasiliensis</i>			traços fortes			traços moderados	traços leves	
<i>M. f. frontalis</i>			traços fortes	traços fortes		traços fortes	traços leves	
<i>M. ibiboboca</i>		traços fortes	traços fortes			traços fortes	traços leves	
<i>M. lemniscatus</i>	traços leves		traços fortes			traços fortes	traços leves	
<i>M. rondonianus</i>			traços fortes			traços moderados	traços leves	traços fortes
<i>M. s. spixii</i>			traços fortes			traços moderados	traços leves	
<i>M. s. surinamensis</i>			traços leves			traços leves	traços leves	traços fortes
<i>M. f. fulvius</i>			traços fortes		traços moderados	traços moderados	traços leves	

Fonte: (DONATO, 2008)

Os constituintes das peçonhas variam em função do gênero da serpente e em cada espécime. A predominância de compostos de diferentes classes bioquímicas determina efeitos distintos em sua toxicidade, sendo divididos em três categorias: (i) hemotoxinas, as quais promovem hemorragia primária, inchaço e necrose; (ii) neurotoxinas, que promovem bloqueio neuromuscular, parada cardíaca e respiratória; (iii) cardiotoxinas, que possuem toxicidade específica para as células cardíacas musculares, promovendo despolarização irreversível das membranas (LI et al., 2004).

Basicamente, as manifestações clínicas do envenenamento ofídico dependem de três fatores: a toxicidade intrínseca, a quantidade da peçonha injetada e o tamanho da vítima. Os sinais e sintomas de maior importância clínica que se seguem após o envenenamento são: paralisia flácida, miólise sistêmica, coagulopatia e hemorragia, falência renal, cardiotoxicidade e dano tissular no local da picada. Esses sintomas sugerem que o envenenamento ofídico é capaz de afetar inúmeros sistemas fisiológicos; particularmente o sistema nervoso central, sistema

cardiovascular, os músculos e o sistema vascular (KOH, ARMUGAN, JEYASEELAN, 2006).

1.5- As peçonhas elapídicas e os estudos farmacológicos e proteômicos

As peçonhas das serpentes representam uma riquíssima biblioteca farmacológica de compostos bioativos acumulada pela natureza ao longo da escala evolutiva. As relações entre presa *versus* predador contribuíram para gerar um arsenal molecular de toxinas capazes de interagir de forma rápida e específica com seus alvos e deferir suas ações tóxicas, podendo potencialmente serem utilizadas em benefício da ciência e medicina (Quadro 2).

Existem uma série de fatores que dificultam o avanço dos estudos bioquímicos e farmacológicos com a peçonha de *Micrurus sp*: a dificuldade na captura e manutenção em cativeiro das serpentes, a pequena quantidade de peçonha obtida em cada extração e a necessidade de uma quantidade relativamente alta de peçonha purificada para os ensaios *in vitro* e sobretudo *in vivo* (DA SILVA JR, BUCARETCHI, 2003).

Em geral, os estudos das peçonhas e toxinas de serpentes têm sido direcionados para atender os seguintes objetivos: (i) determinar o modo e mecanismo de ação das toxinas; (ii) encontrar meios de neutralizar a toxicidade e os efeitos adversos dos acidentes por serpentes; (iii) desenvolver ferramentas de pesquisa eficazes no entendimento dos processos fisiológicos normais em níveis celular e molecular (KINI, 2002).

QUADRO 2 – Fármacos e ferramentas para diagnóstico clínico produzidos a partir da peçonha de serpentes.

Drug/trade name®	Target and function/treatment	Source
Captopril; enalapril	ACE inhibitor/high blood pressure	<i>Bothrops jaracusa</i> (Brazilian arrowhead viper)
Integrilin (eptifibatide)	platelet aggregation inhibitor/acute coronary syndrome	<i>Sistrurus mliarius barbouri</i> (south-eastern pigmy rattlesnake)
Aggrastat (tirofiban)	GPIIb-IIIa inhibitor/myocardial infarct, refractory ischaemia	<i>Echis carinatus</i> (African saw-scaled viper)
Ancrod (Viprinex)	Fibrinogen inhibitor/stroke	<i>Agkistrodon rhodostoma</i> (Malayan pit viper)
Defibrase	thrombin and prothrombin inhibitor/acute cerebral infarction, unspecific angina pectoris	<i>Bothrops moojeni</i>
Hemocoagulase	thrombin-like effect and thromboplastin activity/prevention and treatment of haemorrhage	<i>Bothrops atrox</i>
Protac/protein C activator	protein C activator/clinical diagnosis of haemostatic disorder	<i>Agkistrodon contortix contortix</i> (American copperhead)
Reptilase	diagnosis of blood coagulation disorder	<i>Bothrops jaraca</i> (South American lance adder)
Ecarin	prothrombin activator/diagnostic	<i>E. carinatus</i>
Exanta; ximelagatran	blood thinner/anti-coagulant, thrombin inhibitor	Cobra

Fonte: (KOH, ARMUGAN, JEYASEELAN, 2006).

Estudos comparativos da composição protéica e enzimática das peçonhas de inúmeras espécies de elapídeos demonstraram uma enorme diversidade de enzimas, peptídeos e toxinas presentes nas mesmas (BIRREL et al., 2007; CECCHINI et al., 2005; DAL BELO et al., 2005; FRANCIS et al., 1997; FRY et al., 2005; HODGSON, WICKRAMARATNA, 2006; OLIVEIRA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008; POSSANI et al., 1979). As mais abundantes toxinas compreendem aquelas com estrutura semelhante às fosfolipases A₂ (PLA₂) e em forma de três dígitos (KINI, 2002).

1.6- Toxinas de três dígitos (“Three-finger toxins”)

As toxinas de três dígitos constituem uma ampla família de toxinas não enzimáticas contendo cerca de 60-74 resíduos de aminoácidos (aas) e massas moleculares em torno de 6-9 KDa (Fig. 3). Essas toxinas dividem um mesmo padrão estrutural, composto por um núcleo central contendo quatro ou cinco pontes dissulfeto, do qual emergem três loops com estrutura secundária em folhas β -pregueadas, fazendo alusão aos dedos de uma mão (CHANGEUX, 1990; KINI, 2002).

Compreendem inúmeras classes de toxinas, a saber: α -neurotoxinas (α -NTxs) (antagonistas de nAChR nos músculos), κ -bungarotoxinas (ligam-se especificamente aos nAChR neuronais), toxinas muscarínicas (ligam-se com alta especificidade aos mAChR e são similares as α -NTxs de cadeia curta), fasciculinas (inibem a acetilcolinesterase), calciceptinas (ligam-se aos canais de cálcio do tipo L), cardiotoxinas ou citotoxinas (formam poros nas membranas celulares) e dendroaspinas (antagonizam vários processos de adesão celular e são antagonistas de canais de potássio do tipo Kv 1.1, Kv 1.2 e Kv 1.6 (HARVEY, ROBERTSON, 2004; KINI, 2002). Algumas enzimas como proteases, inibidores de proteases, serinoproteases, metaloproteases, proteínas ricas em cisteína, lectinas e waprinas também foram descritas, porém em menor quantidade. A maior parte do efeito tóxico e letal da peçonha elapídica deve-se às α -NTxs e PLA₂s (BIRREL et al., 2007).

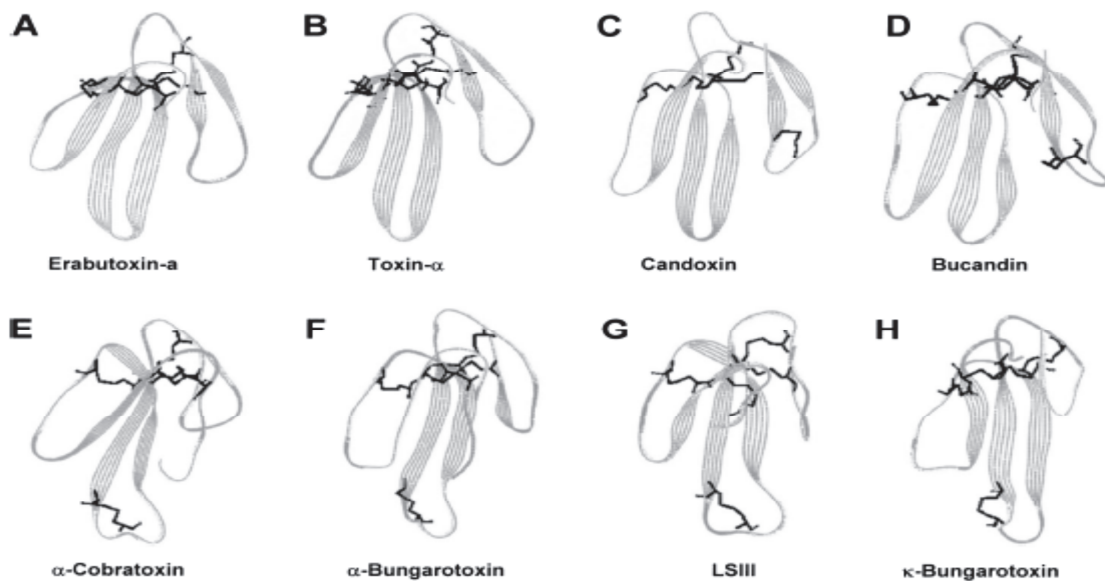


FIGURA 3 – Estruturas tridimensionais de neurotoxinas elapídicas de três-dígitos que interagem com receptores nicotínicos de acetilcolina. As pontes dissulfeto são mostradas em preto. As toxinas, os nomes das espécies das quais foram isoladas e o código de acesso ao banco de dados de proteínas (Protein Data Bank) para as estruturas são os seguintes: A: Erabutoxina-a (*Laticauda semifasciata*), 5EBX; B: Toxina- α (*Naja nigricollis*), 1NEA; C: Candoxina (*Bungarus candidus*), 1JGK; D: Bucandina (*Bungarus candidus*), 1F94; E: α -cobratoxina (*Naja kaouthia*), 2CTX; F: α -Bungarotoxina (*Bungarus multicinctus*), 1IK8; G: LSIII (*Laticauda semifasciata*), 1LSI, e H: κ - Bungarotoxina (*Bungarus multicinctus*), 2NBT (Fonte: NIRTHANAN, GWEE, 2004).

1.6.1- α -Neurotoxinas elapídicas

As α -neurotoxinas (α -NTxs) presentes na peçonha elapídica são as principais responsáveis pelos efeitos neurotóxicos da mesma. Pertencem a uma ampla família de proteínas estruturalmente relacionadas, porém não constituem um grupo homogêneo do ponto de vista funcional, podendo exercer ações farmacológicas distintas. Dependendo da sequência de aminoácidos e/ou estrutura terciária, as α -NTxs podem ser classificadas em: α -NTxs de cadeia curta (60-62 resíduos de aas e quatro pontes dissulfeto), α -NTxs de cadeia longa (66-75 resíduos de aas e cinco pontes dissulfeto), α -NTxs de cadeia longa atípicas (69 resíduos de aas e quatro pontes dissulfeto) e neurotoxinas three-finger não-convencionais (62-68 resíduos de aas e cinco pontes dissulfeto) (Fig. 4). As α -NTxs são também conhecidas como toxinas curaremiméticas ou toxinas pós-sinápticas, pois ligam-se com alta afinidade aos receptores colinérgicos musculares, promovendo o bloqueio da transmissão sináptica (NIRTHANAN, GWEE, 2004).

Toxin	Accession #	Amino acid sequence	Residues
		<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> Loop I </div> <div style="text-align: center;"> Loop II </div> <div style="text-align: center;"> Loop III </div> </div>	
Short-chain toxins			
Toxin- α	P01426	LECHNQSSQP--PTTKTC ^C PG-ETNCYKKVWRD---HRGTIIERG ^C G--CPTVKP-GIKLNC ^C TTDK ^C NN-----	61
NmmI	P01431	LECHNQSSSE--PTTTRCSGGETNCYKKRWRD---HRGYRTERG ^C G--CPTVKK-GIELNC ^C TTDR ^C NN-----	62
Erabutoxin b	230845	RICFNHQSSQP--QTTKTC ^C SPGESSCYHKQWSD---FRGTIIERG ^C G--CPTVKP-GIKLSC ^C CESEV ^C CNN-----	62
Long-chain toxins			
α -Cobratoxin	P01391	IRCFITPDI-----TSKDC ^C PNG-HVCYTKT ^C WDAF ^C SIRGKRVDLGC ^C AATCPTVKTG-VDIQ ^C CCSTD ^C NCNPFTRKRP	71
α -Bungarotoxin	P01378	IVCHTTATSP---ISAVT ^C PPGENL ^C YRKM ^C WDAF ^C SSR ^C SGKVV ^C ELGC ^C AATCPS-KKPYEEV ^C TC ^C STD ^C K ^C CNPHPKQRP	74
Atypical long-chain toxins			
Lc-a	0901189A	RICYL--APR---DTQI-CAPGQEIC ^C YLKSWDDGTGFLKGNRLEFG ^C CAATCPTVKP-GIDIK ^C CCSTD ^C K ^C CNPHPKLA--	69
Lc-b	0901189B	RICYL--APR---DTQI-CAPGQEIC ^C YLKSWDDGTGSIRGNRLEFG ^C CAATCPTVKR-GIHIK ^C CCSTD ^C K ^C CNPHPKLA--	69
Non-conventional toxins			
Candoxin	P81783	MKCKIC ^C NFDT ^C CRAGELKVCASGEKY ^C CFKES-WRE---ARGTRIERG ^C CAATCPKGSVYGLYL ^C CC ^C TTDD ^C CN-----	66
<i>Naja Kaouthia</i> WTX	P82935	LTCLNCP ^C EMFC--GK ^C FQIC ^C RNGEKIC ^C FKKLHQR---PLSWRYIRG ^C CAD ^C TPVGKPYEM-IE ^C CCSTD ^C K ^C CNR-----	65

FIGURA 4 – Sequências de aminoácidos de neurotoxinas de três-dígitos que interagem com receptores nicotínicos de acetilcolina musculares. Os resíduos de cisteína são sombreados em cinza. As pontes dissulfeto e os segmentos que contribuem para a formação dos três loops estão delineados. O número de

resíduos de aminoácido de cada sequência está indicado no final da mesma. Os nomes das espécies são os seguintes: Toxina α (*Naja nigricollis*); Nmml (*Naja mossambica mossambica*); Erabutoxina b (*Laticauda semifasciata*); α -Cobratoxina (*Naja Kaouthia*); α -Bungarotoxina (*Bungarus multicinctus*); Lc-a e Lc-b (*Laticauda colubrina*); Cadoxina (*Bungarus candidus*) e WTX (*Naja Kaouthia*). Os números de acesso ao banco de dados de proteínas (Protein Data Bank) também são indicados. (Fonte: NIRTHANAN, GWEE, 2004).

Interessantemente, apesar da presença de uma quinta ponte dissulfeto não conservada no segundo loop e da extremidade carboxi-terminal mais longa nas α -NTxs de cadeia longa, ambas α -NTxs de cadeia curta e longa ligam-se com afinidades semelhantes ao mesmo sítio nos nAChRs musculares, competindo entre si pela ligação. Por outro lado, somente as α -NTxs de cadeia longa ligam-se com alta afinidade aos nAChRs neuronais do tipo α -7. Essa característica foi atribuída à presença de uma quinta ponte dissulfeto no segundo loop dessas toxinas (SERVENT et al., 1997).

A primeira α - NTx elapídica a ser identificada e sequenciada foi a de *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus I* (ROSSO et al., 1996). Posteriormente, outros autores descreveram o isolamento e caracterização de inúmeras α -NTxs presentes na peçonha de outras espécies de *Micrurus*: *M. frontalis* (FRANCIS et al., 1997), *M. corallinus* (OLIVEIRA et al., 2000), *M. surinamensis* (OLAMENDI-PORTUGAL et al., 2008) e *M. pirrhocryptus* (DOKMETIJIAN et al., 2009).

1.7- Fosfolipases

As fosfolipases são enzimas amplamente distribuídas na natureza, capazes de catalisar a hidrólise dos fosfoglicerídeos de membrana em ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Embora todas as fosfolipases possuam como substrato fosfolipídeos, elas variam em relação ao sítio de clivagem, função fisiológica, modo de ação e formas de regulação. Estudos significativos em relação à caracterização das fosfolipases, função fisiológica e potencial industrial têm sido conduzidos no mundo todo. Alguns deles são direcionados para novos avanços biotecnológicos e

outros reportam as fosfolipases como fatores de virulência e principais causadoras de efeitos patofisiológicos (ALOULOU et al., 2012).

De acordo com o sítio de clivagem dos 1,2-diacil-3sn-fosfoglicerídeos, as fosfolipases são classificadas em A1, A2, B, C e D (Fig. 5). As fosfolipases A (PLAs) são denominadas acil-hidrolases por catalisarem as ligações 1-acil éster (PLA₁) e 2-acil éster (PLA₂), liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Algumas fosfolipases hidrolisam ambas as ligações acil éster, sendo denominadas fosfolipases B (PLBs). A clivagem da ligação glicerofosfato é catalisada pelas fosfolipases C (PLCs), enquanto que a remoção do grupo base é catalisada pelas fosfolipases D (PLDs). Por esta razão, as fosfolipases C e D são denominadas fosfodiesterases (WILTON, WAITE, 2002).

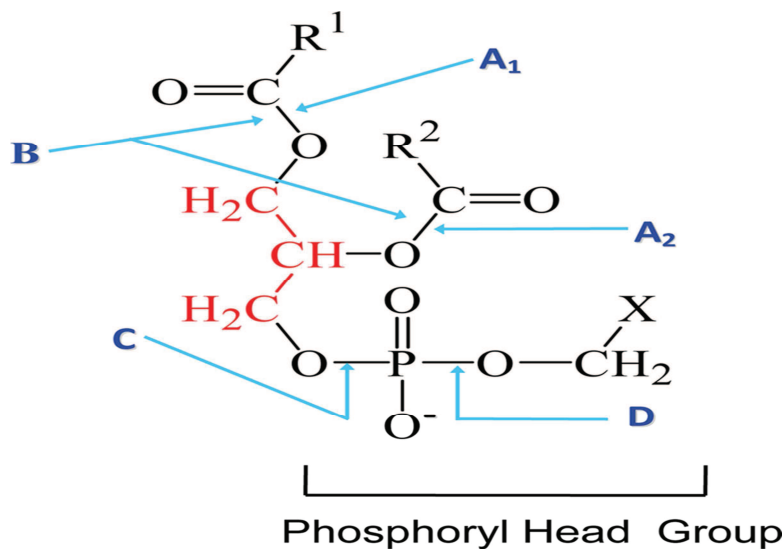


FIGURA 5 – Sítios de clivagem dos fosfolipídeos pelas diferentes classes de fosfolipases. O esqueleto carbônico de glicerol é mostrado em vermelho. As fosfolipases A₁ e A₂ clivam a ligação 1- acil-éster e 2-acil-éster, respectivamente, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos. As fosfolipases B clivam ambas as ligações acil-éster. As fosfolipases C catalisam a clivagem da ligação glicerofosfato, liberando diacilglicerol e o grupo-base (Phosphoryl Head Group) quando X for uma molécula de inositol. As fosfolipases D clivam a ligação fosfodiéster liberando ácido fosfatídico e X, que pode ser tanto uma molécula de etanolamina, serina, inositol ou colina. (Fonte: Adaptado de DJORDJEVIC, 2010).

A superfamília das fosfolipases A_2 inclui 15 grupos de enzimas compreendidas em 4 categorias principais: fosfolipases A_2 secretórias (sPLA₂), fosfolipases A_2 citosólicas (cPLA₂), fosfolipases A_2 independentes de Ca^{+2} (iPLA₂) e fosfolipases A_2 associadas a lipoproteínas (lp-PLA₂), também conhecidas como acetilhidrolases ativadoras de fator plaquetário (PAF-AH) (SCHALOSKE, DENNIS, 2006). Cada uma das categorias citadas têm sido relacionadas a diversas formas de metabolismo lipídico e à progressão de inúmeras doenças, como Alzheimer, esclerose múltipla, aterosclerose, epilepsia, esquizofrenia e outras; despertando o interesse das indústrias farmacêuticas e biotecnológicas no desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos para cada tipo (CHALBOT et al., 2011; FAROOQUI, ONG, HORROCKS, 2006; WILENSKY et al., 2008).

As sPLA₂s, o primeiro tipo de enzimas fosfolipásicas descobertas, caracterizam-se por possuírem baixa massa molecular (13-15 KDa), pela presença do aminoácido histidina no sítio catalítico, por serem cálcio-dependentes e por conterem seis pontes dissulfeto conservadas em sua estrutura (BURKE, DENNIS, 2009), que juntas, sustentam três cadeias em α -hélice e duas em motivos β . Outra característica importante é a presença de um canal hidrofóbico em seu sítio ativo, responsável por acomodar as cadeias de ácidos-graxos dos fosfolipídios, posicionando a ligação éster para ser clivada (MONTECUCCO, ROSSETO, 2000). Em geral, as sPLA₂ dividem um padrão estrutural similar, variando alguns poucos aminoácidos. Essas pequenas variações são suficientes para a conversão de uma sPLA₂ pancreática não tóxica na mais tóxica sPLA₂ de serpente, que atua de forma específica em diversos tecidos e tipos celulares nas presas (CARREDANO et al., 1998; LAMBEAU, LAZDUNSKI, 1999).

Segundo Lambeau et al. (1989), as sPLA₂ são divididas em três tipos, sendo o tipo I encontradas em secreções pancreáticas e na peçonha de algumas serpentes elapídicas. As sPLA₂ do tipo II são encontradas em plaquetas, neurônios, mastócitos, exudatos inflamatórios e na peçonha de algumas serpentes da família Viperidae. Há ainda um terceiro tipo de sPLA₂, encontrada na peçonha de abelhas. Algumas destas enzimas, principalmente as sPLA₂ ofídicas (Fig. 6), evoluíram em potentes neurotoxinas (β -neurotoxinas), exercendo efeitos tóxicos variados, principalmente a nível pré-sináptico.

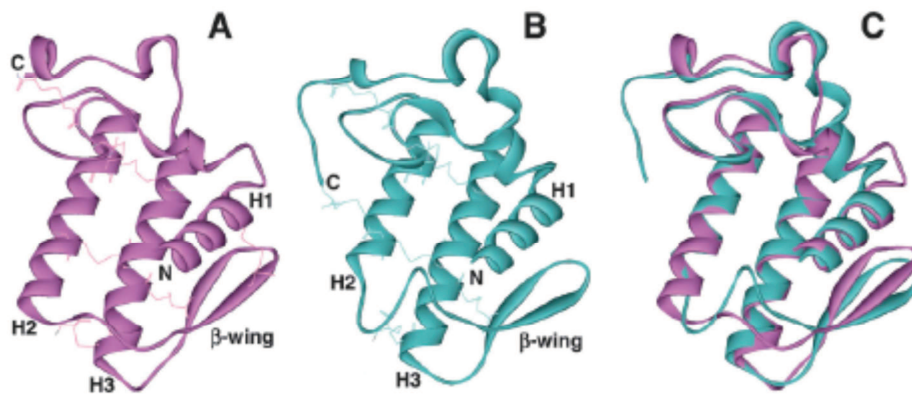


FIGURA 6 – Estruturas tridimensionais de PLA₂s ofídicas. Representação em fita de: (A) notexina (1AE7), fosfolipase A₂ do grupo I, encontrada na peçonha de *Notechis scutatus scutatus*. (B) PLA₂ básica D49 (1VAP), enzima pertencente ao grupo II, encontrada na peçonha de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. As pontes dissulfeto estão representadas em bastão. (C) Sobreposição de ambas as estruturas, ilustrando a conservação do loop de ligação ao cálcio e as três principais hélices (H1, H2 e H3), apesar de desvios evidentes nos demais loops interconectores e alça β. Note que a extremidade C-terminal é maior nas enzimas do grupo II (B) em relação ao grupo I (A). As extremidades N e C-terminais são indicadas por N e C, respectivamente. Fonte: (MONTECUCCO, GUTIÉRREZ, LOMONTE, 2008).

Muitas especulações têm sido feitas acerca do mecanismo de ação das PLA₂s neurotóxicas, também conhecidas como β-neurotoxinas (β-NTxs), levando vários autores a proporem modelos experimentais e hipóteses na tentativa de delineá-lo. O modelo mais convenientemente caracterizado para estudar a inibição pré-sináptica da neurotransmissão pelas PLA₂s são preparações de junções neuromusculares isoladas.

Utilizando esse modelo, Kelly et al. (1976), observaram que a atividade pré-sináptica das PLA₂s caracteriza-se por um evento trifásico na liberação de acetilcolina (ACh). Na primeira fase ocorre uma redução na liberação do neurotransmissor, seguida de um aumento transitório na segunda fase, e na terceira, ocorre um bloqueio completo e irreversível da neurotransmissão. Esse efeito pode ser prevenido pela adição de estrôncio (Sr⁺²) ou pela lavagem do meio com solução apropriada por um curto período de tempo após a adição da toxina. Segundo Montecucco e Rosseto (2000), esse fato representa um forte argumento contra a

hipótese levantada por alguns pesquisadores de que o sítio de ação dessas neurotoxinas seria na superfície extracelular do terminal sináptico.

Outros estudos utilizando microscopia eletrônica em junções neuromusculares de animais pré-tratados com neurotoxinas de ação pré-sináptica, revelaram um alargamento do terminal axonal com depleção das vesículas sinápticas, invaginações da membrana plasmática, presença de grandes vesículas, vacúolos e mitocôndrias danificadas (CHEN, LEE, 1970; CULL-CANDY et al., 1976; DIXON, HARRIS, 1999; GOPALAKRISHNAKONE, HOWGOOD, 1984; LEE et al., 1984).

A partir da observação e análise dos dados obtidos com estes trabalhos, Montecucco e Rosseto (2000), propuseram que as PLA₂s neurotóxicas penetram no lúmen das vesículas sinápticas seguindo-se endocitose e hidrólise dos fosfolípidos da camada interna da membrana. O gradiente de pH gerado, dirige a translocação dos ácidos graxos para a camada citosólica, deixando os lisofosfolípidos na camada luminal. Estas vesículas são altamente fusogênicas e liberam neurotransmissores após fusão com a membrana pré-sináptica, mas não podem ser recicladas devido à alta concentração local de ácidos graxos e lisofosfolípidos, os quais impedem o fechamento das mesmas.

Segundo Yang (1994), o efeito neurotóxico decorrente da ação das PLA₂s parece não ocorrer exclusivamente pela hidrólise dos fosfolípidos de membrana, mas também pela presença de sítios farmacológicos distintos do catalítico em sua estrutura, o que explicaria a alta afinidade de ligação destas toxinas à proteínas específicas que atuam como receptoras ou aceptoras (KINI, 2003). Além disso, o aumento da permeabilidade ao cálcio, decorrente da ação dos lisofosfolípidos e ácidos graxos sobre a membrana parece desempenhar um papel importante na degeneração das organelas e terminações nervosas (TEDESCO et al., 2009).

1.7.1- Fosfolipases elapídicas

Os efeitos neurotóxicos induzidos pela ação das PLA₂s, como descrito anteriormente, decorrem principalmente de uma perturbação na membrana neuronal que resulta em um aumento da liberação de neurotransmissores, tanto no SNC como na junção neuromuscular, levando à degeneração de organelas e terminações nervosas. O mecanismo pelo qual ocorre essa perturbação ainda é controverso, levando alguns autores a acreditarem que essas toxinas possam exercer um papel lítico sobre as membranas (DORANDEU et al., 1998; O' REAGAN et al., 1995) ou ainda, que possam ter diferentes alvos tissulares, diferentes receptores de membrana ou ainda, diferentes mecanismos de alteração da membrana plasmática neuronal (KINI, 2003; MONTECUCCO, GUTIÉRREZ, LOMONTE, 2008).

Algumas neurotoxinas de serpentes elapídicas munidas de atividade fosfolipásica já estão bem caracterizadas na literatura com relação à modulação da neurotransmissão. São elas: β -bungarotoxina, isolada da serpente *Bungarus multicinctus* (CHANG, LEE, 1963); taipoxina, isolada da serpente australiana *Oxyuranus s. scutellatus* (FOHLMAN et al., 1976), notexina, isolada da serpente *Notechis scutatus scutatus* (KARLSSON, EAKER, RYDÉN, 1972) e textilotoxina, purificada da serpente *Pseudonaja textilis* (BARNETT, HOWDEN, SPENCE, 1980). Todas elas possuem ação pré-sináptica semelhante e interferem na neurotransmissão colinérgica promovendo a depleção das vesículas sinápticas na junção neuromuscular e a degeneração de fibras nervosas musculares (DIXON, HARRIS, 1999; HARRIS et al., 2000).

Em um estudo realizado por Rigoni et al. (2004) com culturas de neurônios provenientes de diferentes partes do cérebro de rato, as quatro neurotoxinas pré-sinápticas mencionadas acima induziram a formação dose-dependente de protuberâncias discretas em vários sítios das projeções neuronais, as quais localizavam-se paralelamente à redistribuição dos marcadores vesiculares Sypl (Sinapsina I) e VAMP2 (sinaptobrevina 2) e à exposição do domínio luminal da sinaptotagmina na superfície celular. Ainda neste trabalho, os autores observaram que as quatro neurotoxinas induziram a liberação de glutamato de neurônios cultivados, similarmente à liberação de ACh das junções neuromusculares.

Em relação à peçonha de *Micrurus sp*, apesar da alta atividade fosfolipásica demonstrada experimentalmente, variações interespecíficas na atividade enzimática

podem ocorrer, como é o caso da peçonha das espécies *M. corallinus* e *M. nigrocinctus*, caracterizadas pela presença de neurotoxinas de ação pré sináptica (GOULART et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2000; VITAL BRAZIL, 1987) e das espécies *M. lemniscatus* e *M. frontalis*, que aparentemente, apresentam somente ação pós-sináptica (VITAL BRAZIL, 1987).

Em 2005, foi isolada uma nova PLA₂ (MiDCA1) pré-sináptica da peçonha de *Micrurus dumerelli carinicauda*, a qual produziu bloqueio neuromuscular tempo e concentração dependentes, além de alterações trifásicas na resposta contrátil e aumento da freqüência dos potenciais de ação em miniatura, os quais parecem ser causados pela ativação de canais de sódio e concomitante bloqueio dos canais de potássio nas terminações nervosas (DAL BELO et al., 2005).

A partir do veneno de *M. lemniscatus*, foi possível isolar quatro PLA₂s com atividade neurotóxica (Mlx-8, Mlx-9, Mlx-11 e Mlx-12). Essas toxinas induziram alterações comportamentais, eletroencefalográficas e degeneração neuronal após administração intra-hipocampal em camundongos. As Mlxs demonstraram ser potentes agentes convulsivantes, mas com pouca atividade epileptogênica. Provavelmente o mecanismo de ação envolve a ligação destas toxinas na membrana neuronal provocando distúrbios em sua conformação, o que resultaria em aumento da liberação de neurotransmissores e inibição da fusão e reciclagem das vesículas sinápticas (OLIVEIRA et al., 2008).

Outros efeitos têm sido atribuídos às sPLA₂s de *Micrurus sp*; como efeitos miotóxicos, demonstrados através da mionecrose produzida experimentalmente a partir da peçonha das espécies *M. nigrocinctus*, *M. alleri*, *M. frontalis*, *M. dumerelli carinicauda*, *M. surinamensis* (GUTIÉRREZ et al., 1983), *M. altirostris*, *M. spixii*, *M. hemprichi ortonii*, *M. corallinus*, *M. albicinctus*, *M. ibiboboca* (GUTIÉRREZ et al., 1992), *M. avery* e *M. lemniscatus* (BARROS et al., 1994). Efeitos locais como formação de edema e hemorragia também são constantemente relatados em estudos com serpentes corais (BARROS et al., 1994; CECCHINI et al., 2005). Atividades pró-inflamatórias como aumento da permeabilidade vascular e formação de edema também foram detectadas na peçonha de *M. ibiboboca* e *M. spixii* (TAMBOURGI et al., 1994).

A presença de uma PLA₂ com ação hemorrágica foi relatada em um estudo realizado com toxinas isoladas da peçonha de *M. frontalis frontalis* (FRANCIS et al., 1997). Posteriormente, verificou-se que a peçonha das espécies *M. brasiliensis*, *M. lemniscatus*, *M. pyrrhocryptus*, *M. corallinus* e *M. frontalis* causam hemorragia visceral, pulmonar e subendocárdica em ratos (DA SILVA JR, BUCARETCHI, 2003; FRANCIS, 1997).

Com relação aos efeitos hemolíticos, a peçonha de *M. altirostris* apresentou alta atividade hemolítica indireta em hemácias humanas, a qual pode estar relacionada à presença de PLA₂s na peçonha, similarmente a outras espécies de *Micrurus* (MORAES et al., 2003).

Outra atividade inerente às PLA₂s é sua capacidade de promover a ruptura de lipossomos. Este efeito foi observado na peçonha de *M. lemniscatus carvalhoi* de maneira tempo e temperatura dependente, demonstrando a alta atividade fosfolipásica de sua peçonha (CECCHINI et al, 2005).

1.8- A neurotransmissão glutamatérgica

1.8.1- O glutamato como neurotransmissor

O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório no cérebro de mamíferos, em parte devido à sua natureza ubíqua e funções metabólicas diversas no SNC. O glutamato está relacionado à maioria das funções cerebrais normais, como cognição, memória e aprendizado e é também o precursor do GABA, o principal neurotransmissor inibitório do SNC (PETROFF, 2002). Concentrações extremamente altas de glutamato no tecido cerebral associadas ao seu potencial excitotóxico, requerem uma regulação fisiológica minuciosa de seus níveis extracelulares, visando-se assegurar uma neurotransmissão excitatória adequada e limitar os danos celulares conhecidos como “excitotoxicidade”. Tal regulação é um processo que exige altos níveis energéticos, requisitando múltiplos processos

regulatórios e grande consumo de glicose e oxigênio (NICIU, KELMENDI, SANACORA, 2012).

1.8.2- Metabolismo do glutamato

O glutamato possui sua extremidade C-terminal e esqueleto carbônico derivados da glicose. Uma vez captada pelos astrócitos, a glicose é quebrada via glicólise a ácido pirúvico no citosol. O ácido pirúvico entra no ciclo do ácido tricarboxílico e é convertido a α -cetoglutarato, o qual sofre transaminação através da doação de um grupo amino a partir de um aminoácido doador de cadeia ramificada convertendo-se em glutamato (PELLERIN, MAGISTRETTI, 2004).

1.8.3- Transporte vesicular do glutamato

O glutamato citosólico atravessa a membrana vesicular através dos transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs). Os VGLUTs são antiporters multiméricos H^+ /glutamato (TAKAMORI, 2006). Até então, foram clonados 3 tipos: VGLUT1, VGLUT2 e VGLUT3. Os dois primeiros são primariamente expressos em neurônios glutamatérgicos e em células da glia. O terceiro tipo foi detectado em neurônios gabaérgicos, colinérgicos e monoaminérgicos (FREMEAU et al., 2004). A liberação vesicular de glutamato é um processo dependente de Ca^{+2} e de interações com proteínas do complexo SNARE (PANG, SUDHOF, 2010; SUDHOF, ROTHMAN, 2009). Estudos recentes demonstraram que o empacotamento e a liberação vesicular de glutamato são modulados pelo stress e drogas psicotrópicas, levando a especulações de que este poderia ser um sítio crítico em relação à patofisiologia do stress e possivelmente um alvo para o desenvolvimento de drogas (MUSAZZI et al., 2010).

1.8.4- Depuração e ciclagem do glutamato

Para prevenir os possíveis danos celulares causados por altos níveis de glutamato extracelular, e sobretudo extrasináptico, o mesmo é ativamente removido da fenda sináptica e transportado para o citosol contra seu gradiente de concentração através dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), primariamente encontrados nos processos astrocíticos sinápticamente associados (O'SHEA, 2002). O transporte do glutamato (Fig. 7) é dirigido através de um gradiente eletroquímico, envolvendo a entrada de três íons Na^+ , de um próton H^+ e saída de K^+ (GONZALEZ, ROBINSON, 2004).

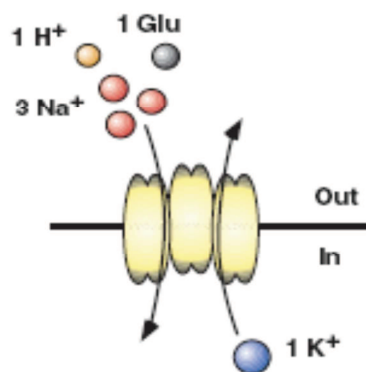


FIGURA 7- Figura esquemática de um transportador de glutamato. O transporte de glutamato em neurônios e astrócitos é um processo eletrogênico que requer a entrada de três íons sódio (Na^+), um íon hidrogênio (H^+) e uma molécula de glutamato (Glu) para o citosol, acoplados ao contra-transporte de um íon potássio (K^+) para o meio extracelular. Fonte: (Adaptado de GONZALEZ, ROBINSON, 2004).

O glutamato captado pode ser utilizado para fins metabólicos (síntese de proteínas, metabolismo energético, fixação de amônia) ou ser reutilizado como neurotransmissor (DANBOLT, 2001). Até agora, foram identificados 5 transportadores de glutamato (O'SHEA, 2002): EAAT1, presente em astrócitos do neocórtex e cerebelo; EAAT2, principal transportador de glutamato no prosencéfalo, expresso principalmente em astrócitos e de forma limitada em neurônios; EAAT3 é neurônio - específico e expresso em terminações pré-sinápticas gabaérgicas;

EAAT4 foi somente detectado em neurônios de Purkinje cerebelares. Finalmente, EAAT5 é específico da retina (ZHENG, SCIMEMI, RUSAKOV, 2008).

Uma vez no citosol das células da glia, o glutamato é metabolizado a glutamina através da enzima glutamina sintetase, em uma reação com amônia dependente de ATP, ou convertido a α -cetoglutarato pela ação de ambas as enzimas glutamato oxaloacetato transaminase ou glutamato desidrogenase (ANDERSON, SWANSON, 2000; MELDRUM, AKBAR, CHAPMAN, 1999). Sob condições apropriadas, a glutamina é transportada dos astrócitos para os neurônios através de transportadores específicos presentes em ambas as células. Nos neurônios, a glutamina é reconvertida a glutamato pela enzima glutaminase para ser subseqüentemente reembalado nas vesículas sinápticas. Assim, existem 2 vias para a produção neuronal de glutamato: (1) a produção *de novo* a partir da glicose e de aminoácidos derivados via metabolismo energético e (2) a reciclagem do glutamato a partir da glutamina via recaptação do mesmo, atividade da enzima glutaminase e dos transportadores de glutamina (ERECINSKA, SILVER, 1990).

1.8.5- Liberação de glutamato

A liberação de glutamato na fenda sináptica pode ser processada de duas formas: via exocitose de vesículas contendo o neurotransmissor (aproximadamente 100mmol/L), envolvendo a entrada de íons Ca^{+2} através de canais de cálcio voltagem-dependentes ou pela reversão dos transportadores de glutamato. Nesse caso, a reversão ocorrerá quando o gradiente de Na^{+} e K^{+} ao longo da membrana estiver reduzido, como acontece durante a isquemia cerebral (ANDERSON, SWANSON, 2000; MELDRUM, 2000). Estudos sugerem que as concentrações de glutamato na fenda sináptica no período pré-liberação são de 2-5 μ mol/L, podendo alcançar 50-100 μ mol/L após o estímulo despolarizante (DAIKHIN, YUDKOFF, 2000).

1.8.6- Receptores glutamatérgicos

Uma vez liberado do terminal pré-sináptico, o glutamato exercerá sua ação excitatória ligando-se a receptores presentes tanto nos neurônios pré como nos pós-sinápticos. Existem duas categorias de receptores de glutamato: receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) são canais iônicos que transportam cátions (Ca^{+2} , Na^{+} e K^{+}), mediante mudanças conformacionais ocasionadas pela ligação do agonista. Os receptores metabotrópicos (mGluRs), por outro lado, ativam ou inibem sistemas de segundos mensageiros via interações com proteínas G acopladas (NICIU, KELMENDI, SANACORA, 2012). Os receptores ionotrópicos tendem a ser mais rápidos na transmissão de informações, no entanto os metabotrópicos são associados com um estímulo mais prolongado, que se deve ao uso de diferentes mensageiros para transmitir o sinal (GOTO et al., 2009).

Três classes de iGluRs foram identificadas (Fig. 8): N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e Kainato (KA). Esses receptores formam complexos tetraméricos de subunidades individuais/heteroméricas, sendo os dois últimos denominados coletivamente de receptores não-NMDA (NICIU, KELMENDI, SANACORA, 2012; OZAWA, 1998).

Os receptores NMDA possuem a mais alta afinidade pelo glutamato ($\text{EC}_{50} = 1\mu\text{M}$) (TSIEN, HUERTA, TONEGAWA, 1996) e são os únicos que requerem a ligação de co-agonistas como o glutamato e a glicina para sua ativação. Além disso, possuem gating lento, fraca dessensibilização, bloqueio voltagem-dependente pelo ionóforo Mg^{+2} e alta permeabilidade ao Ca^{+2} (DINGLELINE et al., 1999). Outros co-ligantes desses receptores incluem íons Zn^{+2} e poliaminas, que apesar de não serem necessários para sua ativação, funcionam como importantes reguladores alostéricos, afetando a eficácia do canal. Alguns antagonistas de receptores NMDA, como fenciclidina (PCP), ketamina e MK-801 também possuem sítios de ligação aos mesmos, exercendo sua influência de maneira voltagem-dependente (NICIU, KELMENDI, SANACORA, 2012).

Os receptores AMPA possuem quatro sítios para a ligação do glutamato, mas basta a ocupação de dois sítios para que o poro do canal se abra, aumentando a intensidade da corrente à medida que os demais sítios são ocupados (MAYER, 2005; PLATT, 2007; ROSENMUND, STERN-BACH, STEVENS, 1998). Esses

receptores se abrem e se fecham rapidamente, sendo responsáveis pela maior parte da neurotransmissão excitatória rápida no SNC (PLATT, 2007). Os principais íons transportados pelos receptores AMPA são o sódio e o potássio, o que os distingue dos receptores NMDA, que também são permeáveis ao cálcio (KIM et al., 2001). Os receptores Kainato possuem uma distribuição mais limitada no cérebro de mamíferos se comparados aos receptores AMPA e NMDA, e sua função não é bem definida. O canal iônico formado pelos receptores Kainato, assim como os receptores AMPA, é permeável ao sódio e potássio, sendo apenas levemente permeável ao cálcio. A condutância dos canais dos dois receptores também são semelhantes; no entanto, os tempos de subida e decaimento dos potenciais pós-sinápticos gerados pelos receptores Kainato são mais lentos que os gerados pelos receptores AMPA (HUETTNER, 2003).

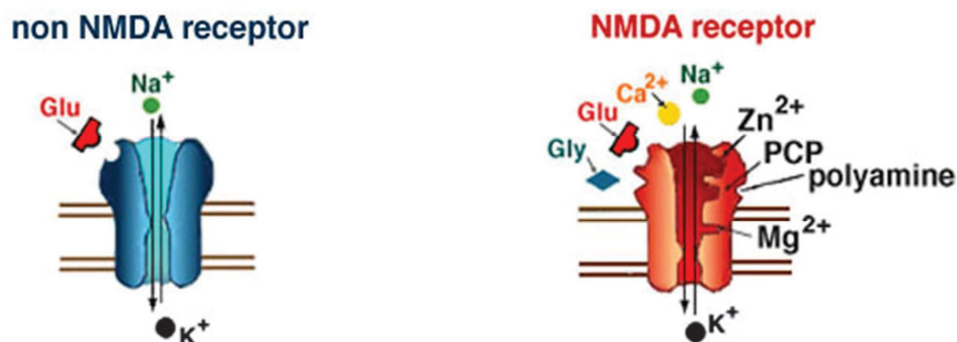


FIGURA 8 – Comparação entre os receptores NMDA e não-NMDA. Os receptores não-NMDA (non NMDA receptor) incluem os receptores AMPA e Kainato. Os canais iônicos desses receptores são mais permeáveis aos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) que ao cálcio (Ca^{+2}). Os receptores NMDA (NMDA receptor) são estruturalmente complexos, possuindo sítios de ligação separados para o glutamato (Glu), glicina (Gly), magnésio (Mg^{+2}), zinco (Zn^{+2}), poliaminas (polyamine) e até para alguns antagonistas, como a fenciclidina (PCP). Os canais iônicos desses receptores são mais permeáveis aos íons Ca^{+2} que ao Na^+ . Fonte: (Adaptado de KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 1991).

1.8.7- Modulação da liberação de glutamato no SNC

Existem diferenças na atividade neuronal exercida pelas duas famílias de receptores glutamatérgicos; uma vez que os iGluRs pós-sinápticos medeiam a transmissão direta e rápida de informação, os mGluRs controlam a excitabilidade neuronal ou modulam a liberação de neurotransmissores. Evidências recentes, demonstraram que ambos os receptores são também encontrados no terminal pré-sináptico, provavelmente controlando a intensidade da neurotransmissão por alterarem a probabilidade com que as vesículas serão “lançadas” em resposta a um potencial de ação. Os receptores de glutamato podem atuar tanto como autoreceptores (localizados em terminais próximos aos sítios em que o glutamato é liberado), ou como heteroreceptores (localizados em terminais glutamatérgicos ou não-glutamatérgicos, distantes do terminal no qual o glutamato foi liberado), controlando sua própria liberação (PINHEIRO, MULLE, 2008).

Estudos sugerem que os iGluRs pré-sinápticos ativados pelo glutamato endógeno na maioria das vezes facilitam a neurotransmissão, embora existam evidências claras de ações inibitórias (ALI et al., 2001; SATAKE et al., 2006; SATAKE et al., 2000; SCHIMITZ, MELLOR, NICHOLL, 2001). Esse efeito provavelmente envolve ações ionotrópicas diretas através do influxo de Ca^{+2} através dos mesmos. Os mGluRs pré-sinápticos, ao contrário, possuem uma ação sináptica inibitória, que pode estar relacionada à regulação direta da maquinaria exocitótica, diminuindo a corrente de entrada de Ca^{+2} (BLACKMER et al., 2005; GERACHSHENKO et al., 2005).

Outra forma de modulação da neurotransmissão glutamatérgica foi observada no SNC, particularmente na habenula medial (Mc GEHEE et al., 1995) e hipocampo, através de receptores nicotínicos pré-sinápticos de acetilcolina (nAChRs), em que aplicações curtas de nicotina resultaram em um aumento significativo das correntes pós-sinápticas excitatórias (GRAY et al., 1996). Os receptores nicotínicos α_7 foram sugeridos por mediar esse efeito (RADCLIFFE, DANI, 1998). Subsequentemente, nAChRs contendo as subunidades α_4/β_3 foram relacionados a um aumento da liberação de glutamato na região CA1 hipocampal (ALKONDON, ALBUQUERQUE, 2002). Outros estudos, também demonstraram o envolvimento dos nAChRs na facilitação da liberação de glutamato na área postrema (FUNAHASHI, MITOH,

MATSUO, 2004), amígdala (BARAZANGI, ROLE, 2001), no cerebelo (RENO et al., 2004) e em neurônios do bulbo olfatório (ALKONDON et al., 1996).

Diferentemente dos nAChRs, os receptores muscarínicos de acetilcolina diminuem a liberação de glutamato no SNC, como mostra um estudo desenvolvido por Marchi e Raiteri (1989) em sinaptosomas de hipocampo. Este efeito parece ser devido a uma diminuição do influxo de Ca^{+2} através de canais de cálcio voltagem-dependentes pré-sinápticos (QUIAN, SAGGAU, 1997).

1.8.8- Papel dos receptores glutamatérgicos na plasticidade sináptica e neurodegeneração

Ambos receptores glutamatérgicos (iGluRs e mGluRs) desempenham um papel importante na plasticidade sináptica (DEBBANE et al., 2003), ou seja, alterações na intensidade da transmissão sináptica (CITRI, MALENKA, 2008). Essa propriedade cerebral está diretamente relacionada ao processo de memória e aprendizado. O aumento ou a diminuição do número de iGluRs presentes na célula pós-sináptica pode levar a eventos conhecidos como potenciação de longa duração (LTP) ou depressão de longa duração (LTD) (PÉREZ-OTAÑO, EHLERS, 2005; ASZTÉLY, GUSTAFSSON, 1996). Uma proteína conhecida como Fator Neurotrófico Derivado Cerebral (BDNF), pertencente à família das neurotrofinas, é conhecida por desempenhar um papel cooperativo com o glutamato na regulação da transmissão sináptica, plasticidade e desenvolvimento neuronal. Em particular, o glutamato e o BDNF co-regulam-se de tal forma que, o glutamato aumenta a transcrição e secreção de BDNF e, inversamente, o BDNF aumenta a liberação de glutamato por regular a expressão dos receptores NMDA e aumentar sua ativação (MARTIN, FINSTERWALD, 2011).

Adicionalmente, os mGluRs podem modular a plasticidade sináptica regulando a síntese pós-sináptica de proteínas através de segundos mensageiros (WEILER, GREENOUGH, 1993). A estimulação em excesso dos GluRs (especialmente NMDA) está associada à neurodegeneração e danos neuronais

através de um processo conhecido como excitotoxicidade, causada pelo influxo de altos níveis de íons Ca^{+2} na célula pós-sináptica (DUBINSKY, 1993). Altas concentrações intracelulares desse íon ativam uma cascata de processos degenerativos envolvendo lipases, proteases, óxido nítrico sintases e uma série de enzimas que danificam estruturas celulares levando à morte neuronal (MANEV et al., 1989). A importância dos GluRs na excitotoxicidade neuronal relaciona os mesmos a uma série de doenças neurodegenerativas, como isquemia cerebral, doença de Parkinson, doença de Huntington e esquizofrenia (BEAL, 1992). Por outro lado, a hipofunção dos receptores NMDA, ocasionada por uma baixa estimulação dos mesmos pelo glutamato, tem sido relacionada com os sintomas positivos da esquizofrenia (NORTHOFF et al., 2005).

Dessa forma, o conhecimento das vias de sinalização glutamatérgicas (Fig. 9) e de moléculas capazes de interferir com essas vias, promovendo tanto o aumento como a inibição da liberação desse neurotransmissor no SNC tem sido alvo de pesquisas em diversos laboratórios e representam uma grande “promessa” para o entendimento e tratamento de distúrbios relacionados à neurodegeneração ou hipofunção dos receptores NMDA.

Assim sendo, baseando-se em estudos recentes que mostram efeitos neurotóxicos centrais induzidos por componentes isolados da peçonha de *M. lemniscatus* (OLIVEIRA et al., 2008), este trabalho teve como objetivo, a prospecção da ação da peçonha desta serpente, bem como de suas frações semi-purificadas sobre a liberação de L-glutamato (L-glu) no SNC, procurando-se entender os possíveis mecanismos envolvidos. Espera-se que num futuro próximo, com a obtenção de moléculas purificadas a partir desta peçonha, possa-se contribuir para o melhor entendimento dos sintomas do envenenamento, bem como do mecanismo de ação da peçonha e, quiçá, identificar moléculas específicas que sirvam de “ferramentas moleculares” para a maior compreensão do sistema glutamatérgico e de sua modulação.

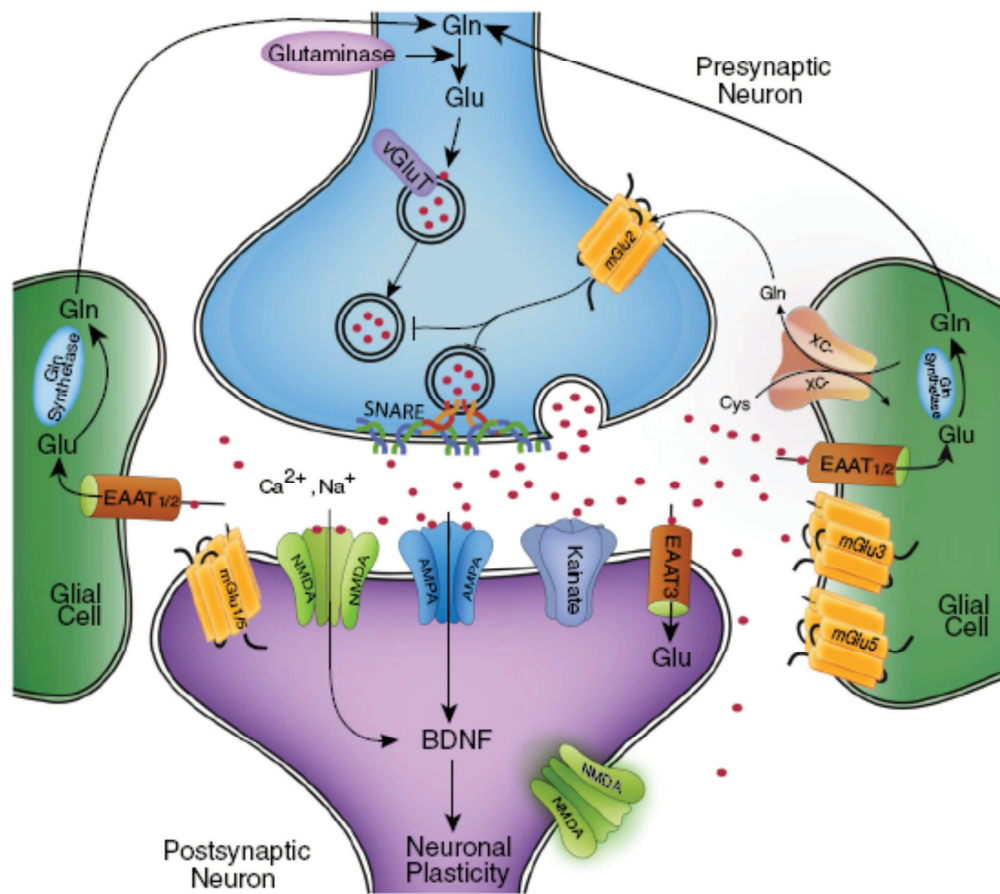
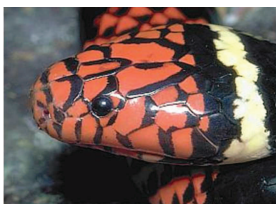


FIGURA 9 – Neurotransmissão glutamatérgica. Devido ao risco de danos excitotóxicos relativos à estimulação glutamatérgica excessiva, um controle fisiológico preciso deve ser mantido no SNC de mamíferos. A glutamina (Gln) é convertida a glutamato (Glu) pela enzima glutaminase [embora o glutamato também possa ser derivado do ciclo do ácido cítrico (não mostrado)]. O Glu é empacotado em vesículas pré- sinápticas pelos transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs) e liberados do terminal pré-sináptico de maneira voltagem-dependente através de interações vesiculares com proteínas do complexo SNARE. O Glu liberado é reciclado do espaço extracelular pelos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), expressos principalmente na astróglia. Nos astrócitos, o Glu é convertido a Gln pela enzima glutamina sintetase e exportado para o espaço extracelular para ser recaptado pelos neurônios. Adicionalmente, o sistema X-C é um transportador cistina/glutamato expresso na glia que também contribui para a reciclagem do Glu. Os receptores de glutamato estão presentes tanto nos neurônios pré e pós-sinápticos, bem como nas células da glia. Eles podem ser tanto ionotrópicos (NMDA, AMPA e kainato) como metabotrópicos (mGluRs). O efeito do Glu é determinado pelo subtipo do receptor, localização (sináptico, perisináptico ou extrasináptico) e interação com várias proteínas sinalizadoras (não mostrado) no neurônio pós-sináptico. A estimulação dos receptores glutamatérgicos resulta não em apenas efeitos ionotrópicos rápidos, mas também na plasticidade sináptica, ex: potenciação de longo prazo (LTP- *long term potentiation*) e depressão de longo prazo (LTD- *long term depression*), através de uma cascata conjugada de transdução de sinais, envolvendo a participação do Fator Neurotrófico Derivado Cerebral (BDNF- Brain- Derived Neurotrophic Factor). Fonte: (Adaptado de NICIU, KELMENDI, SANAKORA, 2012).



Objetivos



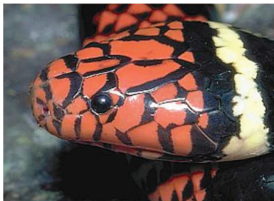
2.0- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral:

Avaliar o possível efeito da peçonha e de frações cromatográficas semi-purificadas da serpente sul-americana *Micrurus lemniscatus*, sobre a liberação de L-glu em sinaptosomas cérebro-corticais de rato.

2.2- Objetivos Específicos:

- Avaliar a liberação de L-glu em sinaptosomas cérebro-corticais de rato por ação da(e):
 - a) peçonha da serpente *M. lemniscatus*,
 - b) frações cromatográficas semi-purificadas desta peçonha
- Averiguar a possível atividade fosfolipásica A₂ da peçonha e de duas de suas frações semi-purificadas.
- Investigar o mecanismo de ação pelo qual a peçonha, bem como uma de suas frações (Fra. 20) alteram a liberação de L-glu, utilizando-se alguns bloqueadores de canais iônicos e antagonistas de receptores nicotínicos e muscarínicos de ACh.



==== *Material e Métodos* ====

3.0 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Equipamentos

- Espectrofluorofotômetro – Biotek, modelo Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader.
- Centrífuga - Hitachi – Himac, modelo CR21 GII.
- Homogeneizador de tecido- Potter-Elvehjem,USA.
- Microcentrífuga – Hettich, modelo MIKRO 200 R.
- Balança semi-analítica – Shimadzu, modelo AY220.
- Banho – Maria Hydrosan.
- Espectrofotômetro – Molecular Devices, modelo Spectra Max 340
- Ultrasonicador – Sonics Vibra Cell, modelo VC 505.
- Evaporador Rotativo – Marconi, modelo MA 120.
- Fluorímetro – Varian Cary Eclipse.
- Liofilizador – Liotop, modelo K-105

3.2- Reagentes

A maioria dos reagentes utilizados foi de grau analítico, os utilizados nas cromatografias, espectrometria de massas e seqüenciamento foram de grau HPLC.

Lista de reagentes:

- Acetato de sódio: Sigma, Sto Louis, Mo, EUA
- Acetonitrila: Carlo Erba, Sigma-Aldrich, Merck e J. T. Baker.
- Ácido pirúvico: Sigma-Aldrich
- Ácido trifluoracético: Sigma-Aldrich, Fluka, Vetec e J. T. Baker.
- Ágar granulado: BBL
- Albumina de soro bovino: Sigma-Aldrich
- Calceína: Sigma-Aldrich
- Cloreto de cálcio: Sigma-Aldrich
- Cloreto de estrôncio: Sigma-Aldrich
- Cloreto de magnésio: Cinética
- Cloreto de potássio: Synth
- Cloreto de sódio: Isofar, Vetec, Sigma, Sto Louis, Mo, EUA
- Clorofórmio: Carlo Erba
- Ditiotreitól (DTT): Sigma-Aldrich, Merk
- EDTA: Sigma- Aldrich, ACS
- Fosfato bibásico de sódio: Sigma- Aldrich, Carlo Erba
- Fosfato monobásico de potássio: Merck
- Fosfato monobásico de sódio: Sigma- Aldrich
- Glicose: Sigma-Aldrich
- Glutamato desidrogenase (GDH): Sigma-Aldrich
- HEPES: Sigma-Aldrich
- L- α -fosfatidilcolina de soja: Avanti
- NADH: Sigma-Aldrich
- NADP: Sigma-Aldrich
- Percoll®: Sigma-Aldrich
- Resina Sephadex G-50 Fine: GE Health Care
- Sacarose: Dinâmica, Vetec
- Sulfato de magnésio: Synth
- Triton X-100: Sigma-Aldrich

3.3- Bloqueadores e toxinas

A toxina tetrodotoxina foi adquirida da Latoxan (France). A D-tubocurarina, atropina, carbacol, cloreto de cádmio, cloreto de estrôncio, EGTA e cloreto de tetraetilamônio foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.4- Soluções

Solução de homogeneização de tecido (córtex cerebral de rato)

Sacarose 0,32 M
EDTA (Ácido etileno diamino tetracético) 1,0 mM
DTT (Ditioneitol) 0,25 mM
(pH ajustado para 7,4 com NaOH 1M)

Soluções Percoll® para gradiente descontínuo

Percoll® 3% (v/v) em Solução de homogeneização
Percoll® 10% (v/v) em Solução de homogeneização
Percoll® 15% (v/v) em Solução de homogeneização
Percoll® 23% (v/v) em Solução de homogeneização
(pH ajustado para 7,4 com HCl 1M)

Solução Krebs-Ringer-HEPES (KRH) sem cálcio

NaCl	124 mM
KCl	4 mM
MgSO ₄	1,2 mM
HEPES	25 mM
Glicose	10 mM

(pH ajustado para 7,4 com NaOH 1M)

Tampão Fosfato

Solução A

NaH₂PO₄ . H₂O (fosfato de sódio monobásico) 50mM

Solução B

Na₂HPO₄ (fosfato de sódio dibásico) 50mM

(A solução B teve o seu pH acertado para 7,4 com a solução A)

Tampão PBS

NaCl	0,137M
KCl	2,68mM
Na ₂ HPO ₄ (fosfato de sódio dibásico)	4,3mM
KH ₂ PO ₄ (fosfato de potássio monobásico)	1,47mM

(pH ajustado para 7,4 com NaOH 1M)

Tampão de incubação para preparo de lipossomos

HEPES 0,02M

NaCl 0,15M
(pH ajustado para 7,2 com NaOH 1M)

3.5- Obtenção e fracionamento da peçonha bruta de *M. lemniscatus*

A peçonha bruta liofilizada da serpente *Micrurus lemniscatus* foi gentilmente fornecida pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) – Belo Horizonte/MG, extraída de várias serpentes machos e fêmeas da mesma espécie. Posteriormente, foi purificada por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC), com o cromatógrafo ÄKTA Explorer 100 (Amersham Biosciences®, Uppsala, Suécia) e Ettan Shimadzu, utilizando-se coluna semipreparativa Discovery Supelco C18. As soluções de uso foram as seguintes: água e TFA 0,1% (eluente A) e TFA 0,1% em acetonitrila 100% (eluente B). Para os testes, as amostras foram diluídas em água Milli Q® e mantidas em gelo. Esta metodologia foi estabelecida pela doutoranda Micheline Donato (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), que fez a purificação das frações e toxinas utilizadas no presente trabalho.

3.6- Animais

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus* albino da linhagem Wistar (250-350g), fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Os animais foram mantidos em caixas plásticas coletivas (17 x 34 x 40 cm), com livre acesso à água e ração, em ciclos de 12 em 12 horas claro/escuro. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 164/2012).

3.7- Preparação dos sinaptosomas

Ratos adultos machos (250-350g) foram sacrificados por decapitação em guilhotina, os cérebros foram rapidamente removidos, imersos em solução de homogenização (sacarose 0,32M, EDTA 1mM e ditioneitol (DTT) 0,25mM, pH= 7,4) e mantidos em gelo. Em seguida, foram utilizados no preparo dos sinaptosomas segundo a metodologia proposta por Dunkley et al. (1988).

Os hemisférios cerebrais foram separados e o córtex dissecado sobre uma placa de Petri invertida forrada com papel de filtro umedecido com solução de homogeneização e apoiada em gelo. O material dissecado foi transferido para um tubo (Thomas Company- B19982) contendo 5ml de solução de homogeneização, sendo homogeneizado (homogeneizador Potter-Elvehjem) em três séries de movimentos “up and down”, repetidos por quatro vezes com intervalo de 2 minutos entre cada série.

A suspensão obtida foi centrifugada (centrífuga Hitachi-Himac CR21GII, rotor R20A2) a 3.000 rpm (1.080 x g), 4^o C, por 10 minutos. Para a separação dos componentes celulares e purificação dos sinaptosomas, o sobrenadante foi aplicado em dois tubos contendo um gradiente descontínuo de Percoll (Sigma) em ordem decrescente: 23%, 15%, 10% e 3% v/v. Os tubos foram centrifugados (centrífuga Hitachi-Himac CR21GII, rotor R20A2) a 18.000 rpm (39.000 x g), 4^oC, por 15 minutos. As frações 3 e 4 obtidas (correspondentes aos sinaptosomas) foram retiradas cuidadosamente em conjunto, transferidas para um tubo de centrífuga (SORVALL Tube, PP-F, 50ml) e lavadas com 45ml de tampão Krebs- Ringer-HEPES (KRH) para a retirada do excesso de Percoll. O precipitado foi retirado, ressuspensão em 1,2ml de tampão KRH, homogeneizado e centrifugado (centrífuga Hettick MIKRO 200R) durante 1 minuto a 10.000 rpm (9.500 x g) a 4^o C. O precipitado resultante foi ressuspensionado em 1,2ml de KRH.

3.8- Liberação de L-glutamato

O ensaio de liberação de L-glutamato (L-glu) foi analisado conforme proposto por Nichols, Sihra, Sanchez-Prieto (1987). Esse ensaio baseia-se na reação envolvendo a enzima GDH (glutamato desidrogenase), NADP⁺ (β-nicotinamida

adenina dinucleotídeo fosfato), NADPH e glutamato a 37° C (Fig. 10). Uma vez liberado pelos sinaptosomas, o L-glu é oxidado a α -cetoglutarato pela enzima GDH, sendo o NADP⁺ o aceptor dos elétrons provenientes desta reação. O NADPH (produto da redução do NADP⁺), ao ser excitado por luz em comprimento de onda de 340nm, emite fluorescência a 440nm, que é detectada através de um fotomultiplicador no espectrofluorímetro (Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader), controlado pelo Software BioTek's Gen5™ Reader Control e Data Analysis Software. Dessa forma, é possível quantificar o L-glu liberado pelos sinaptosomas.



FIGURA 10 – Reação catalisada pela enzima glutamato desidrogenase. A enzima glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a oxidação do L-glutamato na presença de NADP⁺ e água para a formação de NADPH, α -cetoglutarato e amônia. Sendo a reação reversível, um excesso de NADP⁺ favorece o sentido da reação para a formação de α -cetoglutarato.

Inicialmente, preparava-se uma mistura contendo 30 μ l (~0,13 mg) da suspensão de sinaptosomas (4,3 mg/ml) e 7,5 μ l NADP⁺ (1mM) em 262,5 μ l de KRH contendo cloreto de cálcio (CaCl₂) 2mM. Essa mistura era transferida para a microplaca de Elisa (300 μ l / poço) que era então acoplada ao espectrofluorímetro. Após 1 minuto de leitura, adicionava-se a enzima GDH (4,5 unidades/ poço) e a leitura prosseguia até a fluorescência alcançar equilíbrio (platô), aproximadamente 10 minutos. Subseqüentes adições eram feitas para os diferentes experimentos, cujas condições estão especificadas em cada figura nos resultados.

3.9- Avaliação da integridade sinaptosomal pela dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH).

A determinação da atividade da enzima citoplasmática LDH, foi realizada segundo Kubowitz, Ott (1943), como uma evidência bioquímica da integridade dos sinaptossomas. Essa enzima é considerada um marcador citoplasmático, sendo liberada para o meio extracelular somente quando ocorre lise da membrana sinaptosomal ou celular. Sua atividade foi monitorada através da redução do piruvato a lactato, tendo NADH como agente redutor (Fig. 11). A oxidação de NADH a NAD⁺ causa uma redução na leitura da fluorescência, que é monitorada a 339 nm utilizando-se o espectrofluorímetro (Synergy 2, Biotek).

Para o teste, tampão fosfato contendo piruvato foi distribuído na placa de Elisa (260ul por poço) e iniciada a leitura no espectrofluorímetro. Após 1 minuto de leitura, foi adicionado NADH; seguindo-se a leitura por mais 1 minuto, adicionou-se os sinaptossomas e após mais 1 minuto de leitura foi adicionada a peçonha e as frações 20 e 31. O experimento foi então estendido por mais 1 hora. A atividade LDH 100% foi medida na presença de 1% de Triton X-100 (controle positivo, considerado = 100% de lise). Foi também realizado experimento na ausência da peçonha e das frações como controle negativo.

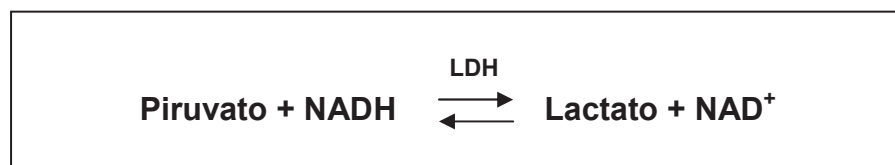


FIGURA 11 – Reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase. A enzima lactato desidrogenase (LDH) catalisa a redução do piruvato a lactato, utilizando-se a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) como agente redutor. Esse composto, ao ser oxidado a NAD⁺, promove uma redução da fluorescência do meio, que é monitorada a 339nm.

3.10- Dosagem protéica das frações e dos sinaptossomas

A concentração de proteína sinaptosomal foi determinada pelo método de Lowry et al (1951). O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma

redução quando reage com proteínas na presença do catalisador cobre (II) e produz um composto com absorção máxima em 750nm. Para a dosagem, foi construída uma curva de calibração utilizando-se os seguintes volumes de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) 1mg/ml: 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 4,8; 6,4 e 8 µl. Estes volumes foram adicionados aos poços em duplicata na placa de Elisa após a adição de 168µl da solução de Biureto (Quadro 4). Após 10 minutos, acrescentou-se 16µl de reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água na proporção de 1:2. O volume dos poços foi completado com água para 200µl. A placa foi homogenizada e coberta com papel alumínio. Em seguida, aguardou-se 1 hora até a leitura em espectrofotômetro (Spectra Max 340) a 750nm. Para a dosagem das amostras (frações e sinaptosomas), o mesmo procedimento foi realizado, substituindo-se o BSA por 2µl de cada amostra. Como controle, foi feito um branco, contendo apenas solução de Biureto, reagente de Folin e água (q.s.p 200µl).

QUADRO 3 - Soluções para o preparo da solução de Biureto. A solução de Biureto é composta por: 98% v/v de solução alcalina de carbonato de sódio (solução A); 1% v/v de solução de sulfato de cobre (solução B) e 1% v/v de solução de tartarato de sódio e potássio (solução C).

Solução A	Solução B	Solução C
Na ₂ CO ₃ 0,18M NaOH..... 0,1M H ₂ O q.s.p.....1L	CuSO ₄ . 5H ₂ O.....0,4mM H ₂ O q.s.p.....100mL	Tartarato de Na ⁺ e K ⁺0,7mM H ₂ O q.s.p.....100mL

3.11- Curva de concentração de L-glutamato

Curvas padrão de L-glutamato foram construídas com o objetivo de converter unidades de fluorescência em nmoles de L-glutamato liberado. Uma mistura contendo tampão KRH, NADP⁺ (1mM) e GDH (4,5 unidades/ poço) foi adicionada aos poços, na placa de Elisa e a leitura foi feita durante 1 minuto. Em seguida, diferentes volumes de uma solução de ácido glutâmico 50µM foram acrescentados

de forma a obter as seguintes concentrações de glutamato nos poços: 5, 10, 15 e 20 nM. A leitura estendeu-se por mais 5 minutos. A média de três leituras (unidades de fluorescência) foi plotada *versus* concentração de L-glu. A reta de regressão linear obtida, como mostra a figura abaixo (Fig. 12), foi utilizada para se calcular as quantidades de L-glu liberado pelos sinaptosomas em cada ensaio.

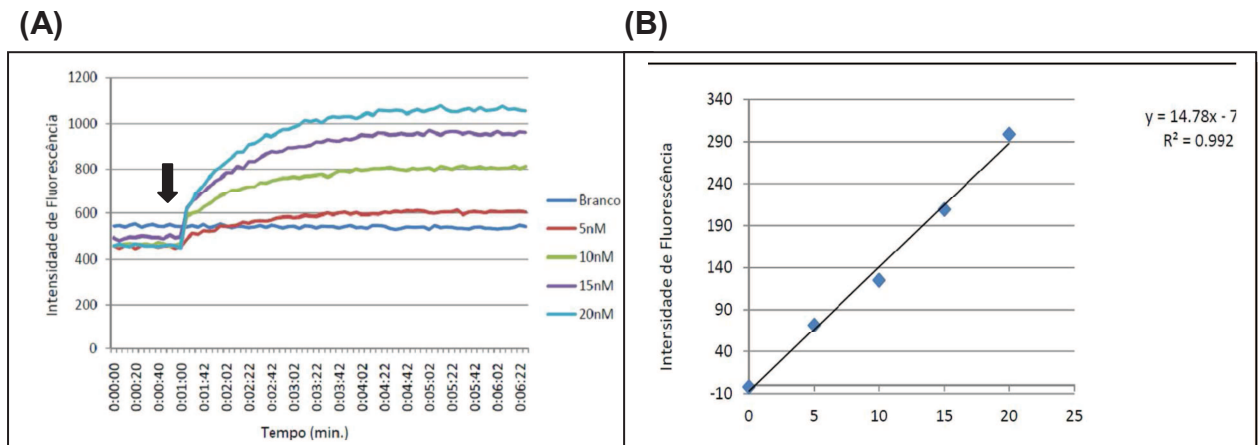


FIGURA 12- (A): Curva representativa da intensidade de fluorescência x tempo de diferentes concentrações de L-glutamato. A seta representa o momento da adição de diferentes concentrações de L-glu. (B): Reta da regressão linear representativa da média de três leituras.

3.12- Atividade fosfolipásica A_2 da peçonha e das frações 20 e 31

O teste da atividade fosfolipásica foi realizado segundo Habermann e Neumann (1954), para avaliar a presença de fosfolipases na peçonha e nas frações 20 e 31 de *M. lemniscatus*, comparando sua atividade com a da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*, utilizada como padrão de comparação. O princípio deste teste baseia-se na lise dos fosfolipídeos presentes na gema do ovo pelas fosfolipases presentes na amostra a ser testada. A lise dos fosfolipídeos gera um halo ao redor do ponto onde a amostra foi aplicada. O diâmetro do halo é diretamente proporcional à atividade fosfolipásica da amostra. O teste foi iniciado preparando-se uma solução de ágar granulado (0,3 g) em 20ml de tampão PBS. Essa solução foi levada ao forno microondas para a fusão do ágar. Em seguida aguardou-se até que a temperatura da solução resfriasse a 50⁰ C. Acrescentou-se

imediatamente, 250 μ l de uma suspensão de gema de ovo 25% em PBS e 5 μ l de cloreto de cálcio (CaCl₂) 1M.

A mistura foi homogeneizada cuidadosamente e distribuiu-se 15ml por placa de Petri (diâmetro 8,5 cm), previamente lavada e limpa com etanol. As placas foram deixadas à temperatura ambiente para a solidificação do ágar. Em seguida confeccionaram-se 12 furos na mesma (Fig. 13) com auxílio de um cilindro de metal (diâmetro 0,31 cm). O ágar contido nos furos foi retirado através de uma bomba de sucção. Finalmente, 12 μ l de diferentes concentrações de cada amostra (peçonha e frações diluídas em tampão PBS) foram aplicadas em cada furo e as placas foram acondicionadas em uma câmara úmida feita com uma vasilha de plástico com tampa, contendo gazes umedecidas com água destilada nas paredes laterais internas. A vasilha foi incubada em uma estufa a 37⁰ C por 20 horas. Posteriormente os halos foram medidos em duplicata com auxílio de um paquímetro. Como controles positivo e negativo foram utilizados, respectivamente, 12 μ l de uma solução de 50 μ g/ml da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e tampão PBS, pH= 7,4.

A comparação da atividade fosfolipásica exercida por ambas as peçonhas foi feita da seguinte forma: calculou-se a média da medida dos halos correspondentes à concentração de 50 μ g/ml (ponto médio da curva) para a peçonha de *C. durissus terrificus*. Em seguida, este valor foi aplicado à equação da reta de regressão linear obtida para a peçonha de *M. lemniscatus*. O antilog do valor de x obtido, corresponde à concentração da peçonha de *M. lemniscatus* equivalente à concentração da peçonha de *C. durissus terrificus* que gerou esse halo. Assim, o quociente da divisão: 50 μ g/ml/x , corresponde à potência da atividade fosfolipásica da peçonha de *M. lemniscatus* em relação à peçonha de *C. durissus terrificus*.

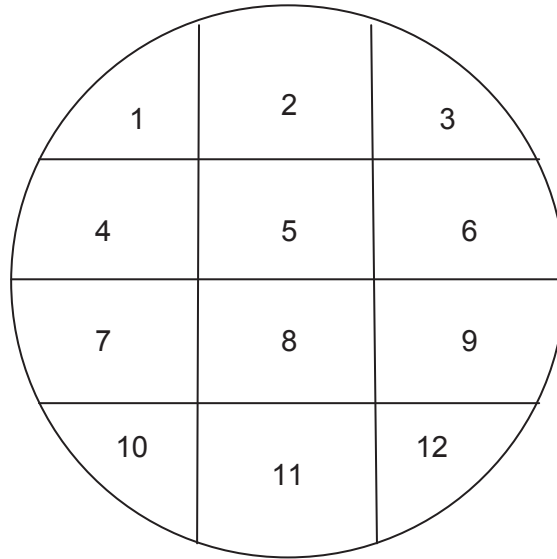


FIGURA 13 - Molde da placa de Petri utilizada para o teste da atividade fosfolipásica. Os números representam o local dos furos onde as amostras são aplicadas.

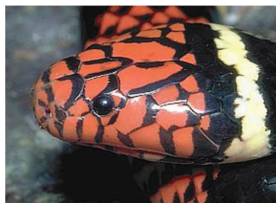
3.13- Preparo de lipossomos e medidas de liberação de calceína encapsulada

Para confirmar os resultados obtidos com o teste da enzima LDH e da atividade fosfolipásica, foram utilizados lipossomos de L- α -fosfatidilcolina de soja. Os lipossomos foram preparados baseando-se no ensaio realizado por Wieprecht et al. (2000). L- α -fosfatidilcolina de soja dissolvida em clorofórmio foi secada sob fluxo de argônio ou nitrogênio. O filme lipídico foi completamente seco sob vácuo, a 55° C, por 45 minutos e em seguida, hidratado com 1 mL do tampão de incubação (HEPES a 20mM, NaCl a 150mM, pH 7,2) ou 1 mL de solução tampão (HEPES a 20mM, NaCl a 150mM e calceína a 75mM, pH 7,2) para os experimentos de liberação de fluorescência, medida por espectroscopia. A suspensão foi sonicada (Sonics – Vibracell) sob fluxo de argônio, em banho de água e gelo, até que a turbidez desaparecesse, o que indica a formação de vesículas unilamelares. A calceína não encapsulada no processo foi removida por cromatografia em coluna Sephadex G-50 (1 mL de volume), equilibrada com o tampão de incubação. A atividade de permeabilização da membrana foi detectada pela liberação de calceína. Esta liberação foi monitorada em espectrofluorímetro (Cary Eclipse – Varian) utilizando-se

o comprimento de onda de 505 nm para excitação e 513 para a emissão. A fluorescência foi monitorada durante todo o curso do experimento; a peçonha (10 µg/ml), a fração 20 (10 µg/ml) e 31(0,1µg/ml) foram adicionadas após 2 minutos de incubação à 37^o C. A fluorescência máxima emitida (100 % de liberação de calceína) foi determinada adicionando-se 10 µL de solução de Triton X-100 (10% v/v) à uma cubeta de 700 µL contendo a preparação lipossomal (lipossomos 0,3% v/v em tampão de incubação) após 3 minutos de leitura.

3.14- Análises estatísticas

Para a realização da análise estatística, foi utilizado o software Graph Pad Prism, San Diego, CA (Versão 5). Durante a análise, para a comparação das médias entre os grupos foram utilizados os testes One-way ANOVA e Two-way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. Os dados foram expressos pela média ± erro padrão da média, considerando-se valores significativos para $p < 0,05$.



Resultados



4.0- RESULTADOS

4.1 - Avaliação do efeito de diferentes concentrações da peçonha bruta de *M. lemniscatus* sobre a liberação de L-glutamato por sinaptosomas cérebro-corticais de rato

Para avaliar a capacidade da peçonha bruta de *M. lemniscatus* em induzir a liberação de L-glu, diferentes concentrações da mesma (10; 1; 0,1; 1×10^{-2} ; 1×10^{-3} ; 1×10^{-4} ; 1×10^{-5} ; 1×10^{-6} $\mu\text{g/ml}$) foram incubadas a 37°C com a preparação sinaptosomal. A cinética de liberação de L-glu foi monitorada a 440nm por 60 minutos (Gráf. 1). Observa-se, a partir dos dados obtidos, que a peçonha bruta de *M. lemniscatus* induz a liberação de L-glu a partir da concentração mínima de $1 \mu\text{g/ml}$. Este efeito é concentração e tempo- dependente, sendo significativo em relação à liberação pelo controle (incubação na ausência da peçonha), após aproximadamente 30 minutos de incubação.

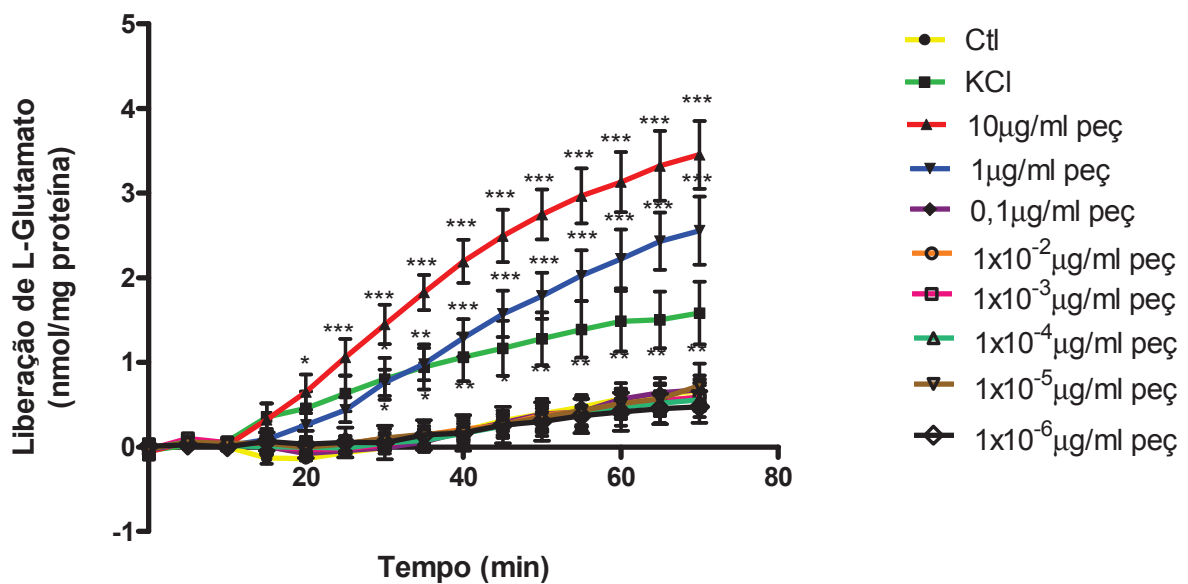


GRÁFICO 1 – Cinética da liberação de L-glu induzida por diferentes concentrações da peçonha bruta de *M. lemniscatus* em sinaptosomas cérebro-corticais de rato. A preparação sinaptosomal foi incubada em condições controle (Ctl) e na presença de diferentes concentrações da peçonha bruta (peç), conforme indicado

no gráfico. O agente despolarizante KCl (33mM), foi utilizado como controle positivo. Os dados foram comparados ao controle e representam a média \pm erro padrão de no mínimo, três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância quando comparados ao controle.

4.2- Avaliação do efeito de diferentes frações cromatográficas, obtidas da peçonha de *M. lemniscatus*, sobre a liberação de L-glutamato por sinaptosomas cérebro-corticais de rato

Para avaliar quais os componentes são responsáveis pela liberação cortical de L-glu, a peçonha bruta de *M. lemniscatus* foi fracionada por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC), conforme descrito em “Material e Métodos”. Dentre as 34 frações obtidas, 30 foram testadas nos ensaios com sinaptosomas. As demais (6, 9, 28 e 29) não foram testadas por não conterem quantidade suficiente de material. Assim, uma alíquota de cada fração (8 μ g/ml) foi incubada a 37⁰ C com a preparação sinaptosomal, conforme descrito em “Material e Métodos. A cinética de liberação de L-glu foi monitorada a 440nm por 90 minutos. Os resultados obtidos (Gráf. 2A) indicam uma tendência de aumento da liberação de L-glu pelas frações 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27. Essas frações exibiram um perfil de liberação tempo-dependente (Gráf. 2B). Os resultados mostrados no gráfico 2A foram compilados dos gráficos de 2B. Os experimentos foram realizados com a finalidade de uma “varredura” da atividade das diversas frações obtidas da peçonha. Devido à limitação de material, não foi possível realizar um número maior de experimentos, o que impossibilitou os cálculos estatísticos. As massas moleculares dos componentes das frações, obtidas por espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS- resultados da tese de doutorado de Micheline Donato), indicaram que todas as frações acima mencionadas, com exceção da fração 16, apresentaram pelo menos, uma toxina com massa na faixa de 12-14 KDa, o que corresponde à massa de PLA₂s (dados não mostrados).

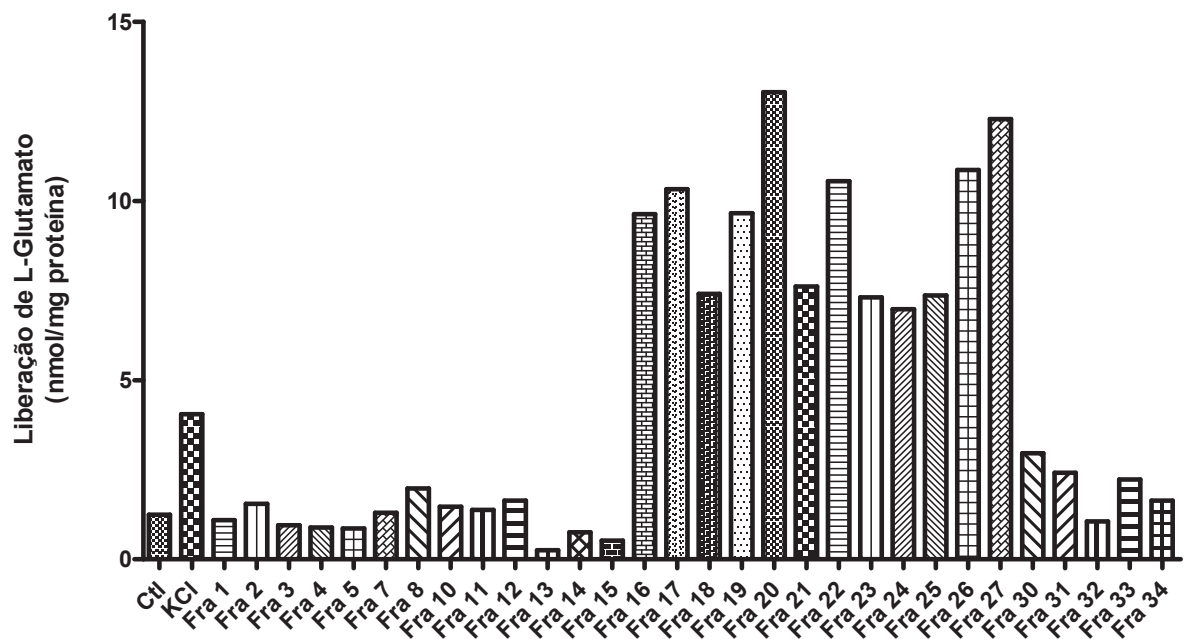
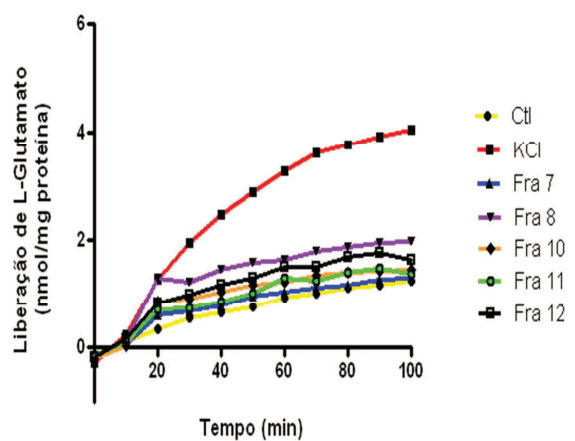
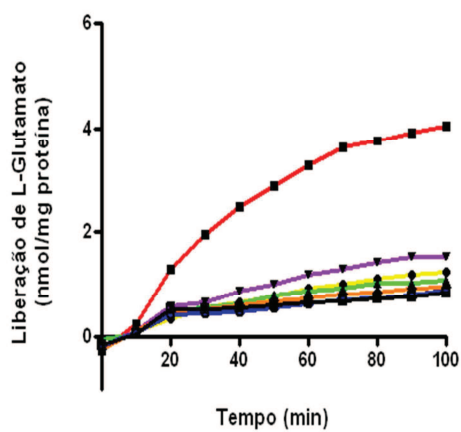


GRÁFICO 2A – Efeito de diferentes frações obtidas por cromatografia em fase reversa (RP-HPLC), sobre a liberação de L-glu de sinaptosomas cérebro-corticais de rato. A preparação sinaptosomal foi incubada em condições controle (Ctl) e na presença de 8 µg/ml de diferentes frações cromatográficas (Fra), conforme indicado no gráfico, durante 90 minutos. O agente despolarizante KCl (33mM), foi utilizado como controle positivo. Os dados foram comparados com o controle e representam a média de dois experimentos independentes. Os cálculos estatísticos não puderam ser feitos devido ao pequeno número de experimentos realizados.



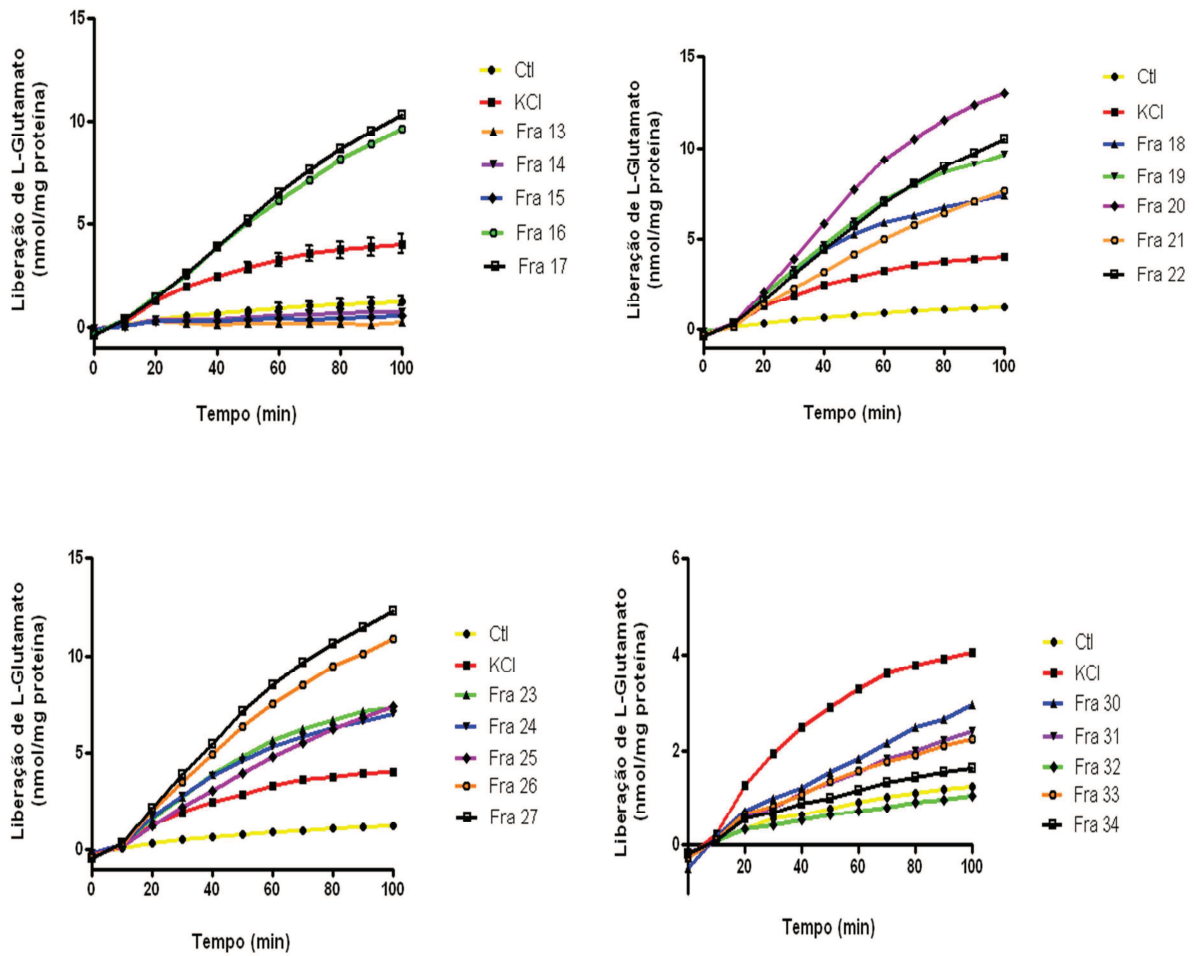


GRÁFICO 2B- Cinética da liberação de L-glu induzida por diferentes frações cromatográfica obtidas da peçonha de *M. lemniscatus* em sinaptosomas cérebro-corticais de rato. A preparação sinaptosomal foi incubada em condições controle (Ctl) e na presença de 8 $\mu\text{g/ml}$ de diferentes frações cromatográficas (Fra), conforme indicado no gráfico, durante 90 minutos. O agente despolarizante KCl (33mM), foi utilizado como controle positivo. Os dados foram comparados com o controle e representam a média de dois experimentos independentes. Os cálculos estatísticos não puderam ser feitos devido ao pequeno número de experimentos realizados.

4.3- Curva concentração-efeito das frações 20 e 31, purificadas a partir da peçonha de *M. lemniscatus*, sobre a liberação de L-glutamato de sinaptosomas cérebro-corticais de rato

A partir do “screening” mostrado anteriormente, duas frações (20 e 31) contendo respectivamente, toxinas de três-dígitos e PLA₂s, foram testadas para verificar o perfil de liberação de L-glu e a influência da concentração das mesmas neste processo. Para isso, alíquotas contendo diferentes concentrações de cada fração (10; 1; 0,1; 1×10^{-2} e 1×10^{-3}) foram incubadas com a preparação sinaptosomal. A cinética de liberação de L-glu foi monitorada a 440nm por 60 minutos. Os resultados obtidos indicam que ambas as frações apresentaram um perfil de liberação de L-glu tempo-dependente. A fração 20 apresentou um aumento significativo da liberação de L-glu apenas na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Gráf. 3), enquanto que a fração 31 induziu aumento significativo da liberação de L-glu a partir da concentração mínima de 1 $\mu\text{g/ml}$ (Gráf. 4), sendo tempo e concentração-dependente. Esses efeitos foram observados após aproximadamente, 25 e 30 minutos, respectivamente. As frações 16 (citada anteriormente) e 20 (utilizada neste experimento) possuem cada uma, duas toxinas de massas moleculares semelhantes (6000 a 7000 Da) e foram utilizadas como correspondentes. Ambas liberaram L-glu da preparação sinaptosomal e são desprovidas de atividade fosfolipásica.

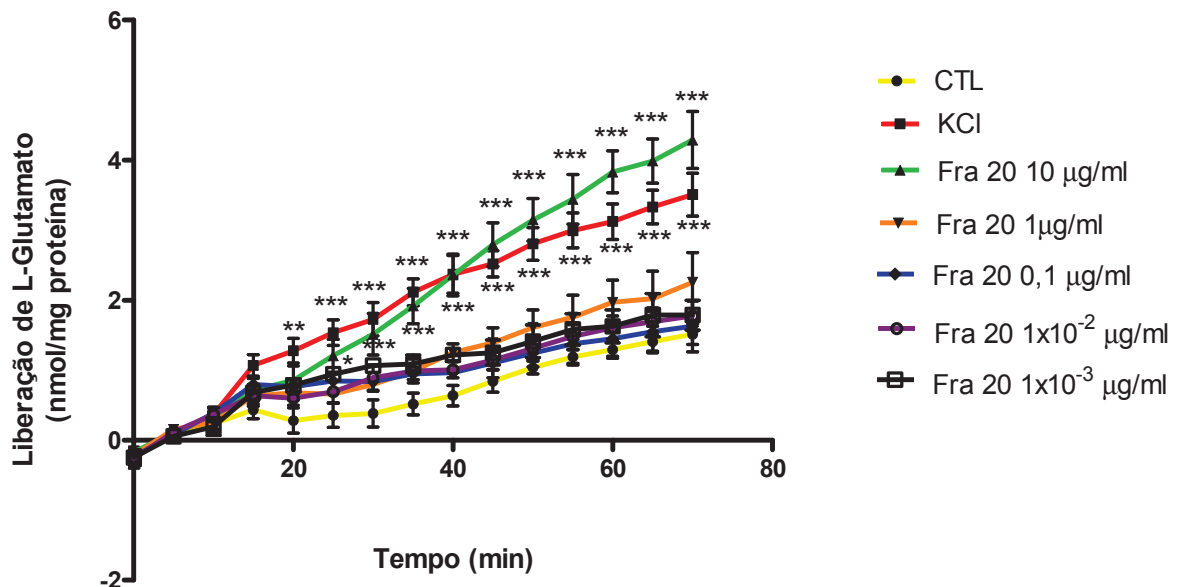


GRÁFICO 3 – Cinética da liberação de L-glu de sinaptosomas cérebro-corticais de rato sob efeito de diferentes concentrações da fração 20, purificada da peçonha de *M. lemniscatus*. A preparação sinaptosomal foi incubada em condições controle (Ctl) e na presença de diferentes concentrações da fração 20

(Fra 20), conforme indicado no gráfico. O agente despolarizante KCl (33mM), foi utilizado como controle positivo. Os dados foram comparados ao controle e representam a média \pm erro padrão de no mínimo, três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância quando comparados ao controle.

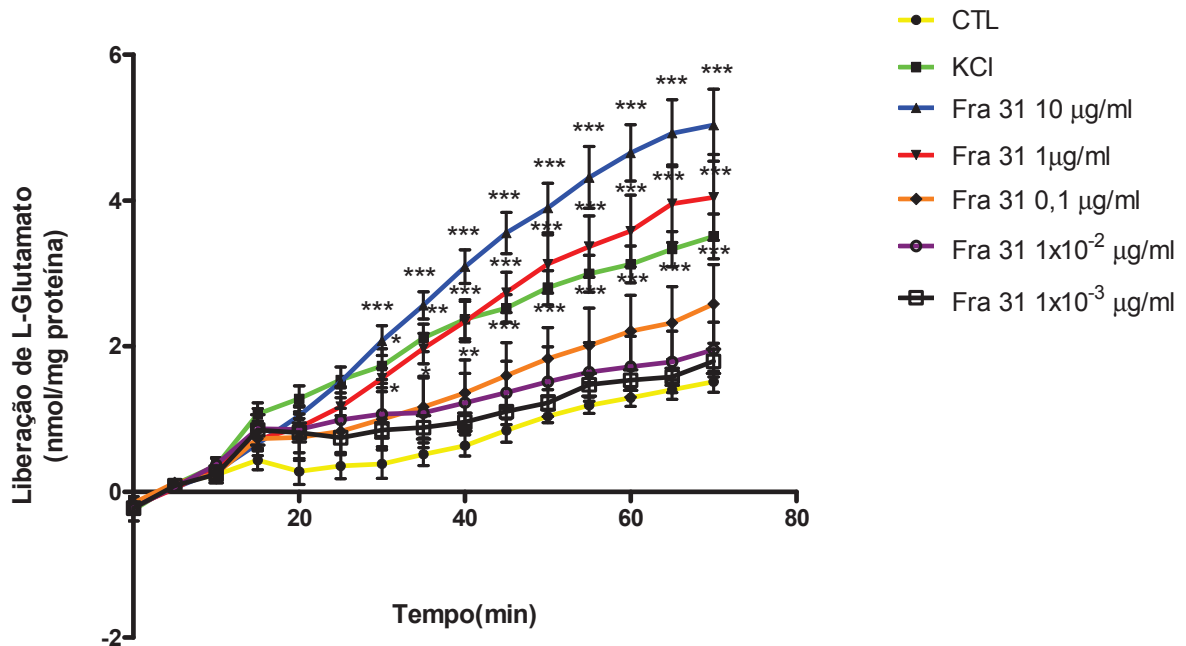


GRÁFICO 4 – Cinética da liberação de L-glu de sinaptosomas cérebro-corticais de rato sob efeito de diferentes concentrações da fração 31, purificada da peçonha de *M. lemniscatus*. A preparação sinaptosomal foi incubada em condições controle (Ctl) e na presença de diferentes concentrações da fração 31 (Fra 31), conforme indicado no gráfico. O agente despolarizante KCl (33mM), foi utilizado como controle positivo. Os dados foram comparados ao controle e representam a média \pm erro padrão de no mínimo, três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância quando comparados ao controle.

4.4- Avaliação da integridade sinaptosomal - dosagem da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) na presença da peçonha e das frações 20 e 31 de *M. lemniscatus*.

Para verificar a integridade da preparação sinaptosomal e também uma possível atividade lítica da peçonha e das frações, foram realizados testes para a

avaliação da atividade da lactato desidrogenase, enzima tipicamente citosólica. Para isso, diferentes concentrações da peçonha e das frações 20 e 31 (10; 1 e 0,1µg/ml) foram incubadas a 37°C, na presença de tampão fosfato-piruvato, NADH (0,2mM) e da suspensão sinaptosomal, conforme descrito em “Material e Métodos”. A reação fluorimétrica foi monitorada a 339nm por 60 minutos na presença de 1% de Triton X-100 (100% de lise) como controle positivo. Os resultados indicam (Gráf. 5) que a preparação sinaptosomal manteve integridade relativa durante o período do teste, apresentando 25% de lise, valor próximo ao aceitável (i.e. 15-20%). A peçonha, na concentração de 10 µg/ml, induziu lise de 65% da preparação sinaptosomal. Tal efeito também foi observado para a fração 31, que induziu 60% e 70% de lise nas concentrações de 10 µg/ml e de 1µg/ml, respectivamente, valores semelhantes entre si. Já a fração 20 não apresentou atividade lítica significativa em relação ao controle.

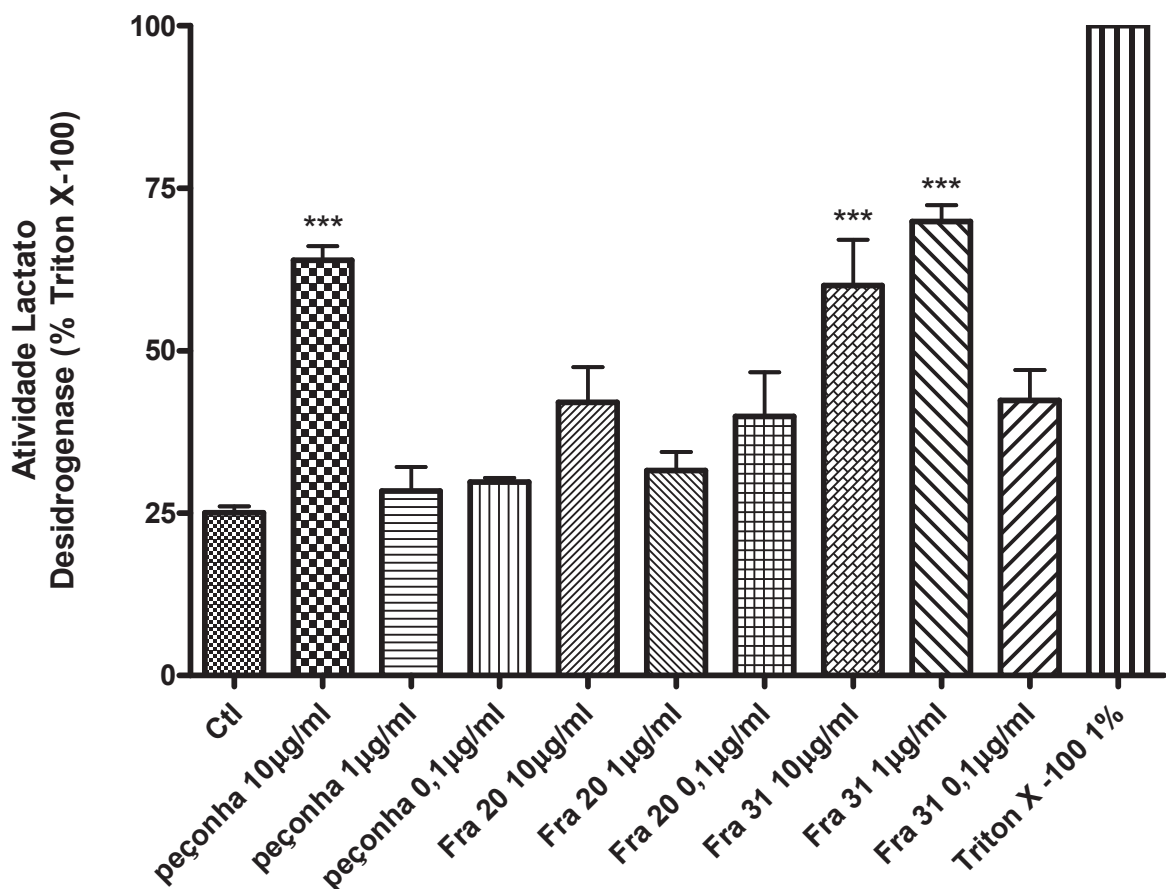


GRÁFICO 5 – Atividade da enzima Lactato Desidrogenase após incubação dos sinaptosomas com diferentes concentrações da peçonha bruta e das frações 20 e 31. A preparação sinaptosomal foi incubada

em condições controle (Ctl) e na presença de diferentes concentrações da peçonha, da fração 20 (Fra 20) ou da fração 31 (Fra 31), conforme indicado no gráfico. Os dados foram comparados ao controle e expressos como porcentagem da lise induzida por Triton X-100 (controle positivo = 100% de lise). Os dados representam a média \pm erro padrão de no mínimo, três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância quando comparados ao controle.

4.5- Investigação do efeito da peçonha e fração 20 de *M. lemniscatus* sobre a liberação de L-glutamato por sinaptosomas cérebro-corticais de rato na presença de 5 μ M de tetrodotoxina (Ttx)

Para verificar a possível participação de canais para sódio voltagem-dependentes, sensíveis a tetrodotoxina, na liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20 de *M. lemniscatus*, foi utilizada a Ttx (5 μ M) como bloqueadora desses canais. Verifica-se no gráfico abaixo (Gráf. 6) que a liberação de L-glu induzida tanto pela peçonha quanto pela fração 20 não foi significativamente afetada por Ttx durante os 60 minutos de monitoramento.

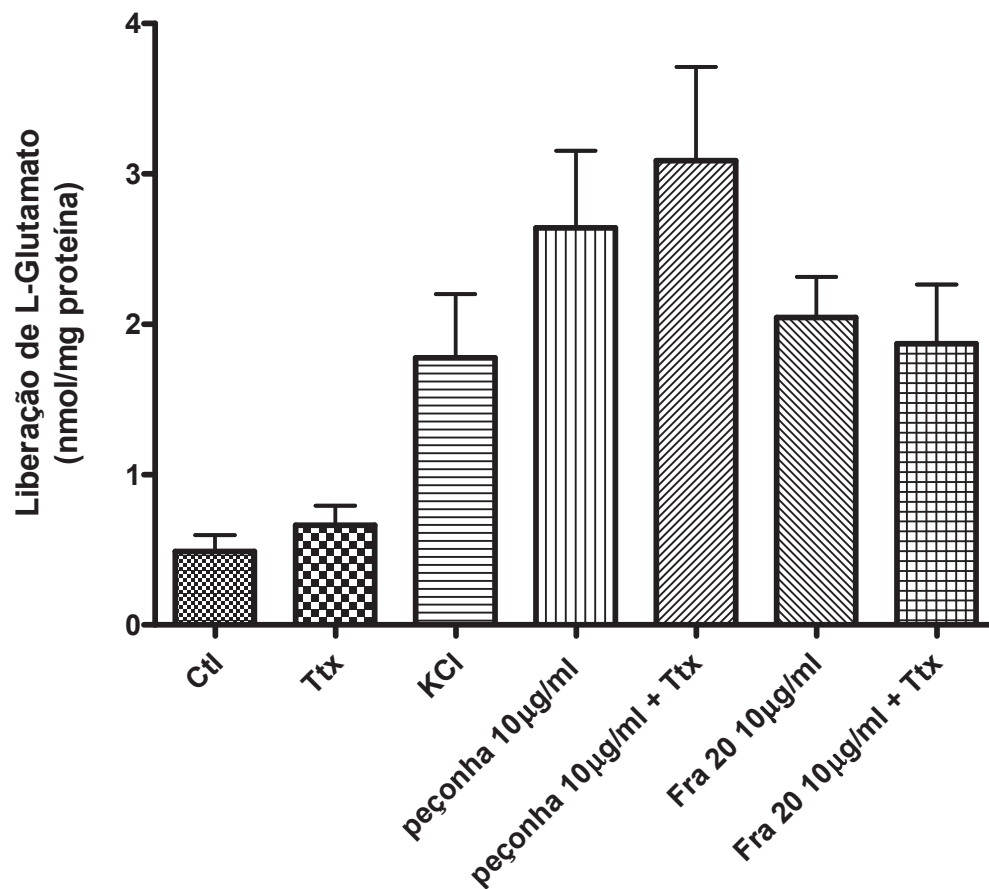


GRÁFICO 6 – Efeito da tetrodotoxina (Ttx) sobre a liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20 de *M. lemniscatus*, em sinaptosomas cérebro-corticais de rato. A preparação sinaptosomal foi pré- incubada a 37°C por 10 minutos em condições controle (Ctl) e na presença da peçonha ou da fração 20 (10µg/ml) contendo ou não 5µM de Ttx, conforme mostrado no gráfico. O agente despolarizante KCl (33mM) foi utilizado como controle positivo. Os dados foram comparados aos respectivos controles (peçonha *versus* peçonha/Ttx; Fra 20 *versus* Fra 20/Ttx), representando a média ± erro padrão de no mínimo, 3 experimentos independentes. Quando comparados aos seus controles, os dados não apresentaram diferenças estatísticas.

4.6- Investigação do efeito da peçonha e fração 20 de *M. lemniscatus* sobre a liberação de L-glutamato de sinaptosomas cérebro-corticais de rato na presença de 100µM de íons cádmio (Cd²⁺)

Para verificar a possível participação de canais para cálcio voltagem-dependentes na liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20 de *M. lemniscatus*, íons Cd²⁺ (100µM) foram utilizados como bloqueadores inespecíficos desses canais. Verifica-se no gráfico abaixo (Gráf. 7), que a liberação de L-glu

induzida tanto pela peçonha quanto pela fração 20, foi parcialmente reduzida em cerca de 28% e 46%, respectivamente, na presença dos íons Cd^{+2} durante os 60 minutos de monitoramento.

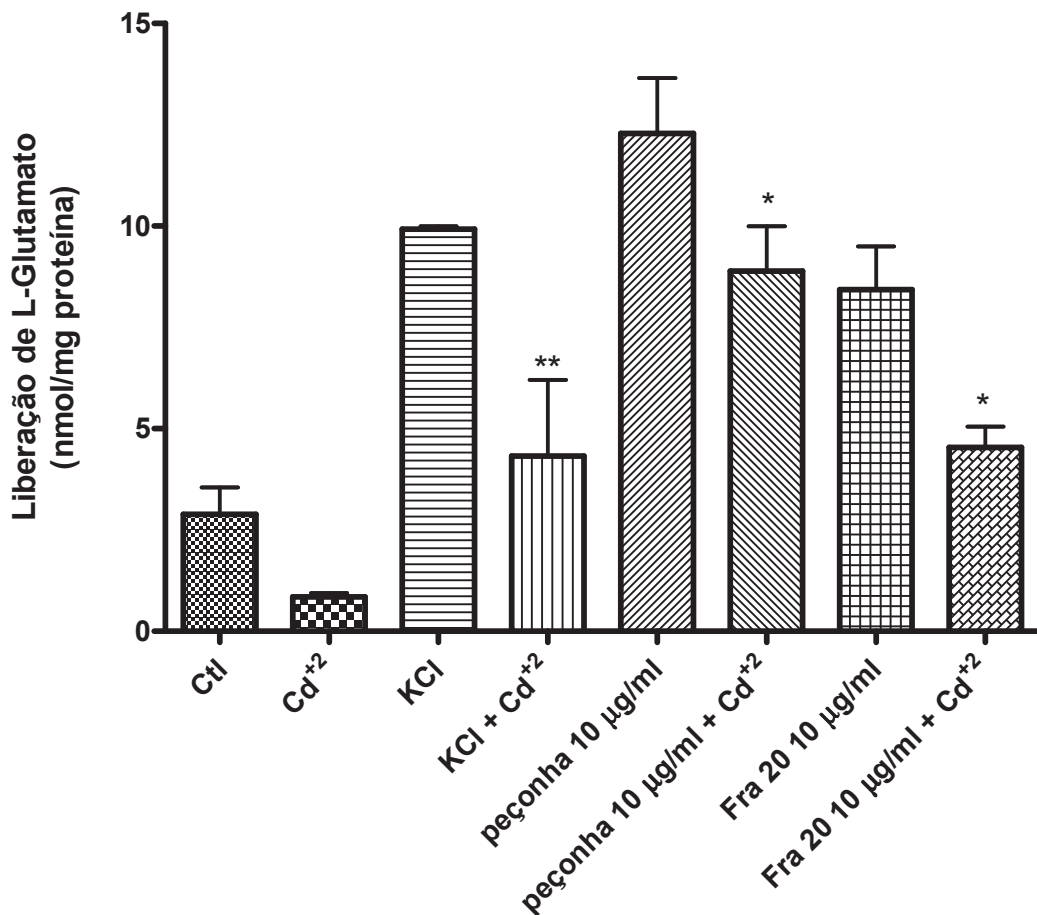


GRÁFICO 7 - Efeito dos íons Cd^{+2} (100µM), sobre a liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20 de *M. lemniscatus* em sinaptosomas cérebro-corticais de rato. A preparação sinaptosomal foi pré- incubada a 37°C por 5 minutos em condições controle (Ctl), na presença da peçonha (10µg/ml), da fração 20 (10µg/ml) ou de KCl 33mM (controle positivo) contendo ou não 100µM de Cd^{+2} , conforme mostrado no gráfico. Os dados foram comparados aos respectivos controles (peçonha *versus* peçonha/ Cd^{+2} ; Fra 20 *versus* Fra 20/ Cd^{+2}), representando a média ± erro padrão de no mínimo, 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância quando comparados aos controles.

4.7- Investigação do efeito da peçonha e da fração 20 de *M. lemniscatus* sobre a liberação de L-glutamato de sinaptosomas cérebro-corticais de rato na presença de 40mM de íons tetraetilamônio (TEA)

Para verificar a possível participação de canais para potássio voltagem-dependentes na liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20 de *M. lemniscatus*, íons TEA (40mM), bloqueadores inespecíficos destes canais, foram previamente adicionados ao tampão de incubação KRH e acrescidos à mistura contendo a suspensão sinaptosomal (10% do volume final) e NADP^+ (1mM). Verifica-se no gráfico abaixo (Gráf. 8), que a liberação de L-glu induzida tanto pela peçonha, quanto pela fração 20 não foi afetada na presença dos íons TEA durante os 60 minutos de monitoramento.

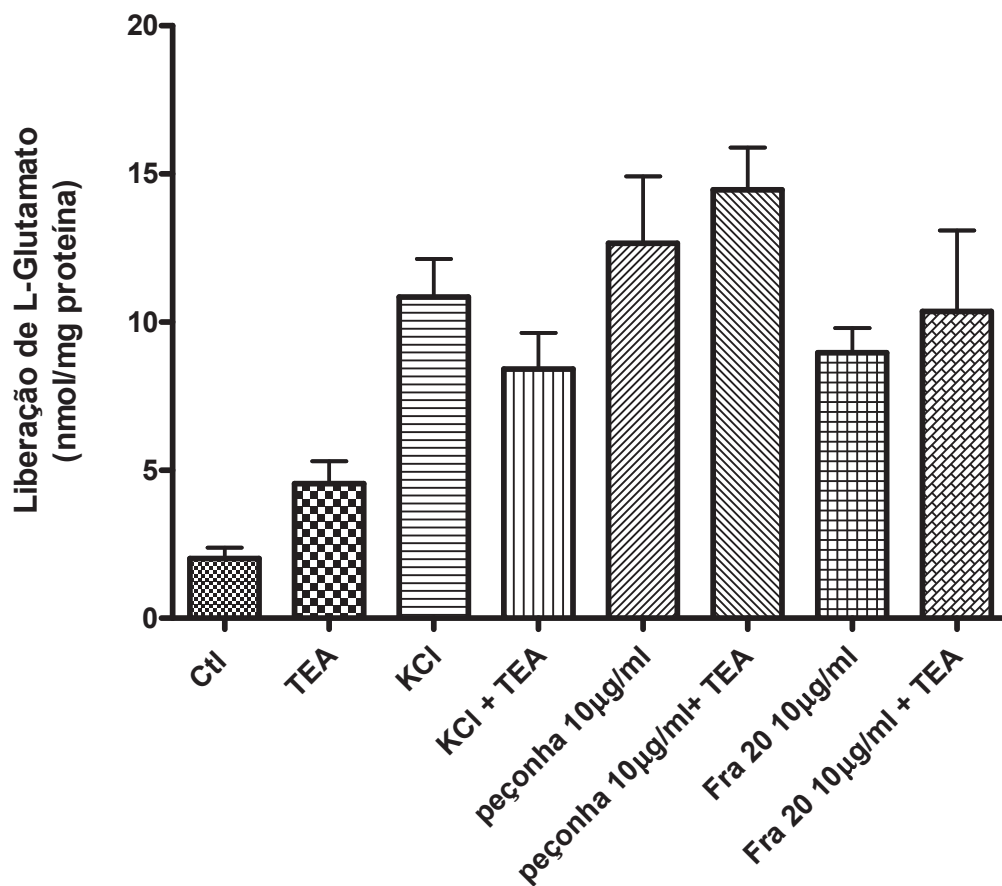


GRÁFICO 8 - Efeito dos íons tetraetilamônio (TEA) sobre a liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20 de *M. lemniscatus*, em sinaptosomas cérebro-corticais de rato. A preparação sinaptosomal foi incubada a 37°C em condições controle (Ctl), na presença da peçonha (10µg/ml), da fração 20 (10µg/ml) ou de KCl 33mM (controle positivo) contendo ou não TEA (40mM), conforme mostrado no gráfico. Os dados foram comparados aos respectivos controles (peçonha *versus* peçonha/TEA; Fra 20 *versus* Fra 20/TEA), representando a média \pm erro padrão de no mínimo, 3 experimentos independentes. Quando comparados aos controles, os dados não apresentaram diferenças estatísticas.

4.8- Avaliação da liberação de L-glutamato induzida pela peçonha e fração 20 de *M. lemniscatus* na presença de íons Sr^{+2} (2 mM)

Para avaliar a importância dos íons Ca^{+2} para a atividade da peçonha e da fração 20 de *M. lemniscatus* na liberação de L-glu, estes íons foram substituídos equimolarmente por estrôncio (2mM) no tampão de incubação (KRH). Sabe-se que o Sr^{2+} substitui o cálcio no processo da neurotransmissão *in vitro* (DODGE JR, MILEDI, RAHAMIMOFF, 1969). A partir dos dados obtidos, verifica-se que a liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20 de *M. lemniscatus* é completamente abolida na presença de estrôncio, apresentando níveis semelhantes ao do controle. Crotoxina (Ctx), uma PLA_2 obtida da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (0,8 μ M) e cuja atividade já foi demonstrada ser inibida por estrôncio, foi utilizada como controle positivo (Gráf. 9).

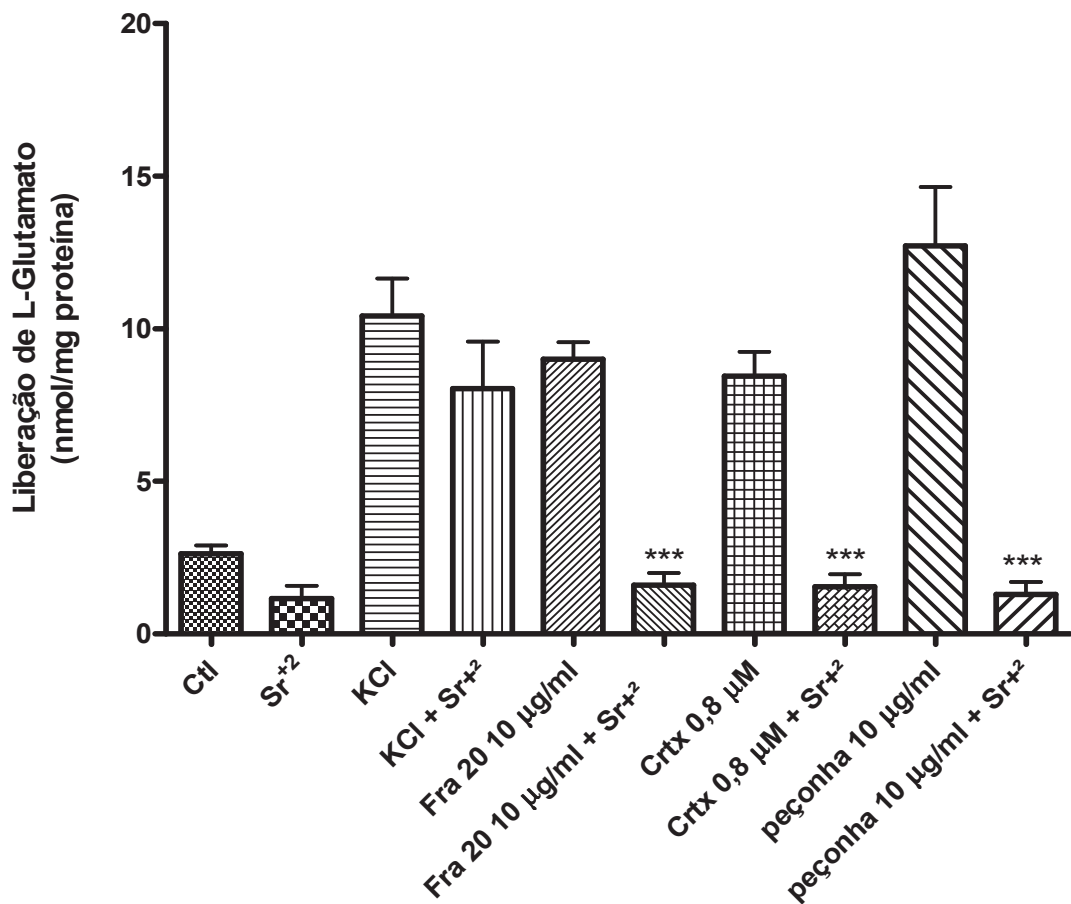


GRÁFICO 9 – Efeito da substituição de Ca^{+2} por Sr^{+2} sobre a liberação de L-glu induzida pela peçonha e fração 20 de *M. lemniscatus*, em sinaptosomas cérebro-corticais de rato. A preparação sinaptosomal foi incubada em condições controle (Ctl), na presença da peçonha (10µg/ml), da fração 20 (10µg/ml), da Crtx (0,8.µM), ou de KCl (33mM), contendo Ca^{2+} ou Sr^{2+} (2 mM), conforme indicado no gráfico. Os dados foram comparados aos respectivos controles (peçonha *versus* peçonha/ Sr^{+2} ; Fra 20 *versus* Fra 20/ Sr^{+2}), representando a média \pm erro padrão de no mínimo, 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância quando comparados aos controles.

4.9- Avaliação da liberação de L-glutamato induzida pela peçonha bruta de *M. lemniscatus* na presença dos antagonistas colinérgicos D-tubocurarina e atropina, e do agonista carbacol.

Para verificar uma possível modulação colinérgica da liberação de L-glu induzida pela peçonha de *M. lemniscatus* através dos receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina, foram realizados experimentos utilizando-se a D-

tubocurarina (100 μ M) como antagonista de receptores nicotínicos de ACh, a atropina (1 μ M) como antagonista de receptores muscarínicos de ACh e o carbacol (1 μ M) como agonista de receptores muscarínicos de ACh. Esses testes foram realizados com a peçonha bruta, uma vez que não foi possível obter quantidades suficientes da fração 20 ou de toxina pura. A partir dos dados obtidos (Gráf. 10), pode-se verificar que, a liberação de L-glutamato induzida pela peçonha de *M. lemniscatus* não foi afetada na presença de nenhum dos antagonistas ou agonista mencionados.

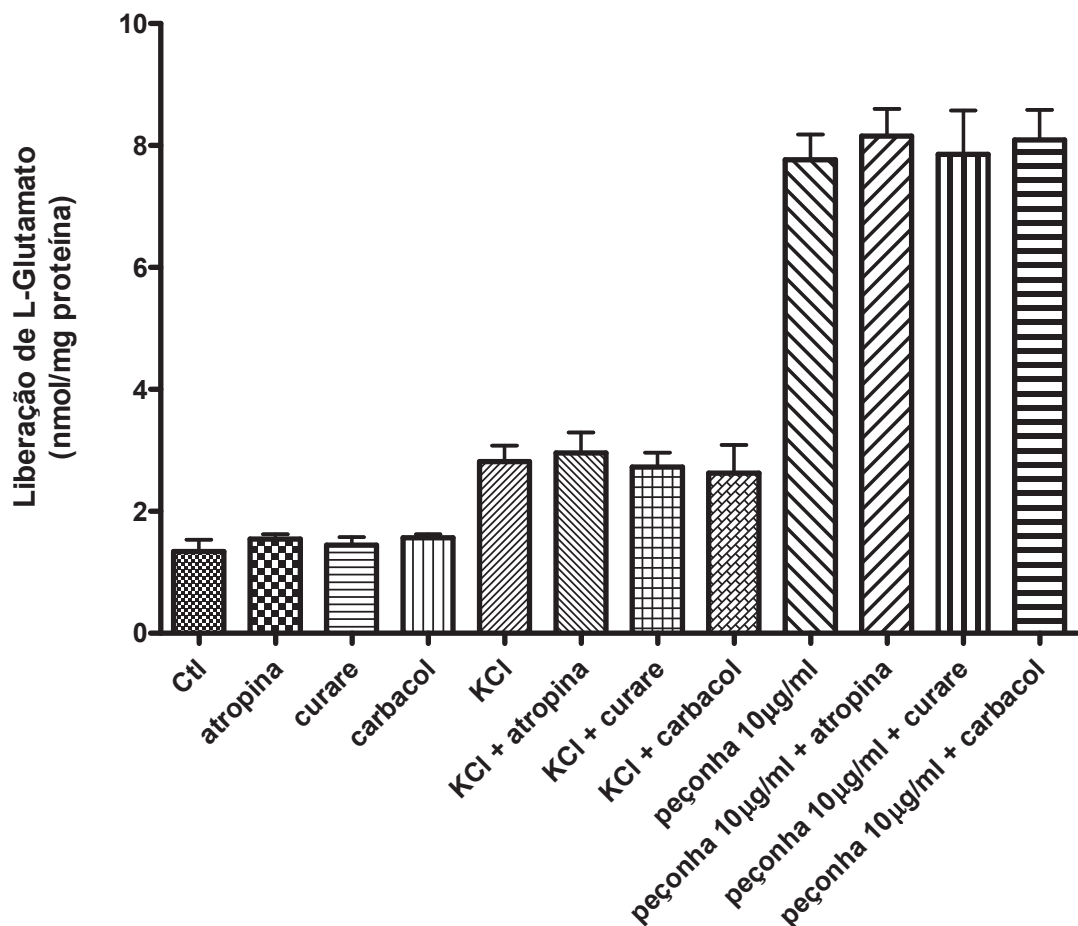


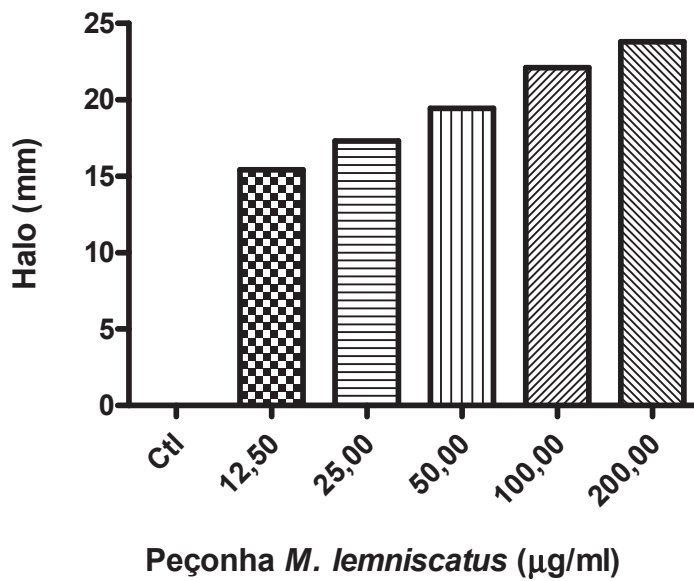
GRÁFICO 10 – Efeito dos antagonistas e agonista colinérgicos D-tubocurarina, atropina, e carbacol, respectivamente, sobre a liberação de L-glu induzida pela peçonha bruta de *M. lemniscatus* em sinaptosomas cérebro-corticais de rato. . A preparação sinaptosomal foi incubada em condições controle (Ctl), na presença da peçonha (10 μ g/ml) ou de KCl (33mM), contendo ou não D-tubocurarina (100 μ M) (curare), atropina (1 μ M) e carbacol (1 μ M), conforme indicado no gráfico. Os dados foram comparados ao respectivo controle (peçonha *versus* peçonha/atropina, peçonha/curare, peçonha/carbacol), representando a média \pm erro

padrão de no mínimo, 3 experimentos independentes. Quando comparados aos controles, os dados não apresentaram diferenças estatísticas.

4.10- Avaliação da atividade fosfolipásica A₂ da peçonha bruta de *M. lemniscatus* comparada à da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*

Para avaliar a possível atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *M. lemniscatus* utilizou-se como padrão de comparação a peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Ambas as peçonhas foram testadas em diferentes concentrações (200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/ml). As peçonhas foram adicionadas à placas de Petri contendo ágar incorporado com gema de ovo a 25% (ver “Métodos”). Como controles positivo e negativo, foram utilizados, respectivamente, 50 µg/ml da peçonha de *C. durissus terrificus* e tampão PBS, pH= 7,4. A medida dos halos, obtidos após incubação por 20 horas, a 37° C, sugere que a peçonha bruta de *M. lemniscatus* induz a lise dos fosfolipídeos da gema de ovo de forma concentração-dependente (Gráf. 11 A), assim como a peçonha bruta de *C. durissus terrificus* (Gráf. 11 B). A peçonha de *M. lemniscatus*, apresentou atividade fosfolipásica estimada em torno de 14 vezes maior que a de *C. durissus terrificus*.

(A)



(B)

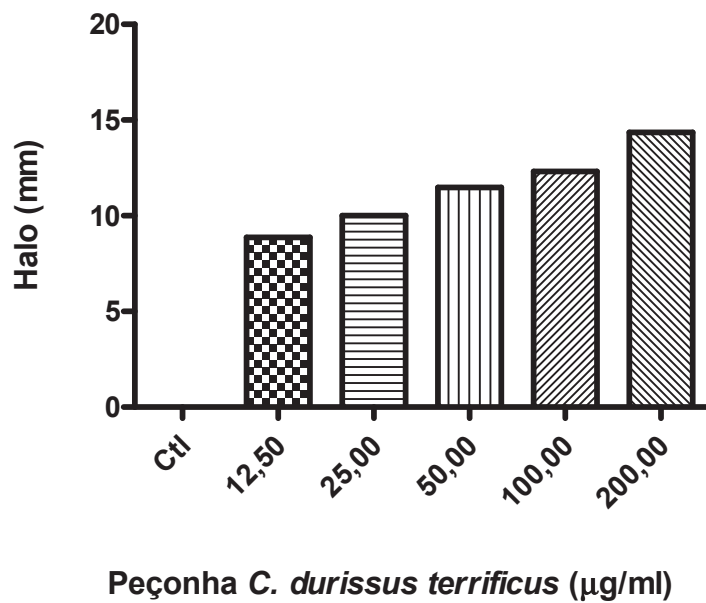
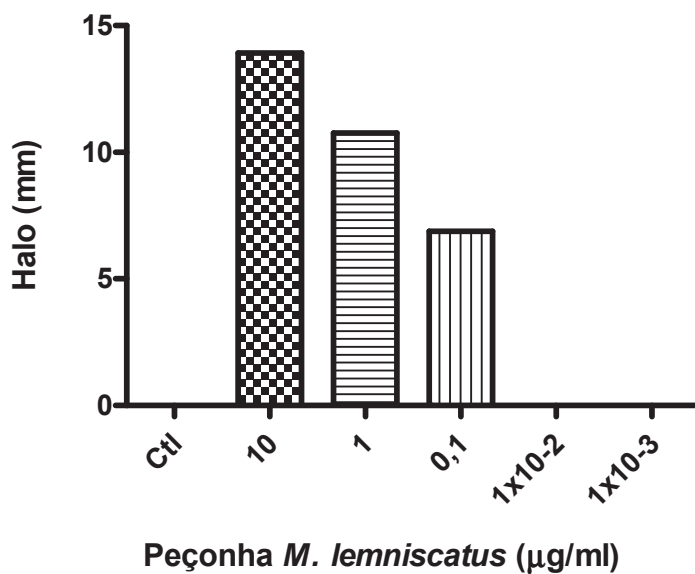


GRÁFICO 11 – Comparação das atividades fosfolipásicas das peçonhas das serpentes: (A) *Micrurus lemniscatus* e (B) *Crotalus durissus terrificus*. Diferentes concentrações de ambas as peçonhas (200, 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/ml}$) foram aplicadas às placas de ágar incorporadas com gema de ovo (25%) e incubadas a 37^o C por 20 horas. Medidas dos halos formados foram feitas em duplicata e expressas em milímetros (mm). Os

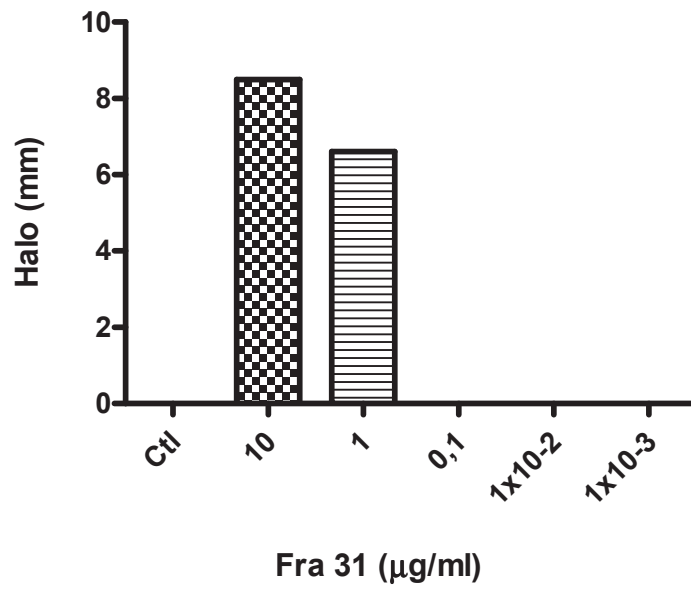
resultados expressam a média \pm erro padrão de no mínimo, 2 experimentos independentes. Ctl= Controle (tampão PBS).

As frações 20 e 31, assim como a peçonha de *M. lemniscatus* também foram testadas nas mesmas concentrações utilizadas para a confecção da curva de liberação de L- glutamato (10; 1; 0,1; 1×10^{-2} e 1×10^{-3}). Os resultados mostram que a peçonha bruta exibiu atividade fosfolipásica nas concentrações de 10, 1 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Gráf. 12 C). A fração 31 também induziu a lise dos fosfolipídeos da gema de ovo nas concentrações de 10 e 1 $\mu\text{g/ml}$ (Gráf. 12 D). Já a fração 20 não apresentou atividade fosfolipásica nas concentrações testadas (Gráf. 12 E).

(C)



(D)



(E)

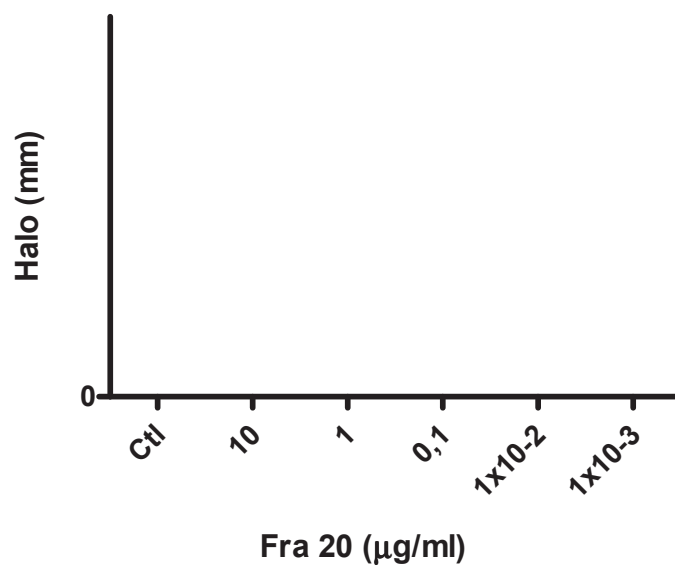


GRÁFICO 12 – Atividade fosfolipásica da peçonha (C), fração 31 (D) e fração 20 (E) de *M. lemniscatus* quando utilizadas nas mesmas concentrações utilizadas para a confecção das curvas de liberação de L-

glu. Diferentes concentrações da peçonha e das frações 20 e 31 (10; 1; 0,1; 1×10^{-2} e 1×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$) foram aplicadas às placas de ágar incorporadas com gema de ovo (25%) e incubadas a 37°C por 20 horas. Medidas dos halos formados foram feitas em duplicata e expressas em milímetros (mm). Os resultados expressam a média \pm erro padrão de no mínimo, 2 experimentos independentes. Ctl= controle (tampão PBS).

4.11 – Avaliação da atividade da peçonha e das frações 20 e 31 sobre a integridade de lipossomos

Para verificar se a peçonha, bem como as frações 20 e 31 de *M. lemniscatus* podem permear a membrana lipossomal, fez-se medida fluorimétrica que detecta a liberação de calceína dos lipossomos, a 513 nm. A peçonha (10 $\mu\text{g/ml}$), ou a fração 20 (10 $\mu\text{g/ml}$) ou a fração 31 (0,1 $\mu\text{g/ml}$) foram adicionadas à cubeta (700 μl) contendo a preparação lipossomal após 2 minutos de incubação a 37°C (ver “Métodos”). Observa-se, a partir dos dados obtidos, que a peçonha, bem como a fração 31, induziram lise lipossomal em cerca de 40 e 10 %, respectivamente. Em relação à fração 20, não foi observada lise (Gráf. 13). A cinética da liberação de calceína na presença da fração 31 parece ser tempo-dependente. O mesmo não foi observado na presença da peçonha (Gráf. 14). Devido à limitação de material não foi possível realizar um número maior de experimentos, o que impossibilitou os cálculos estatísticos.

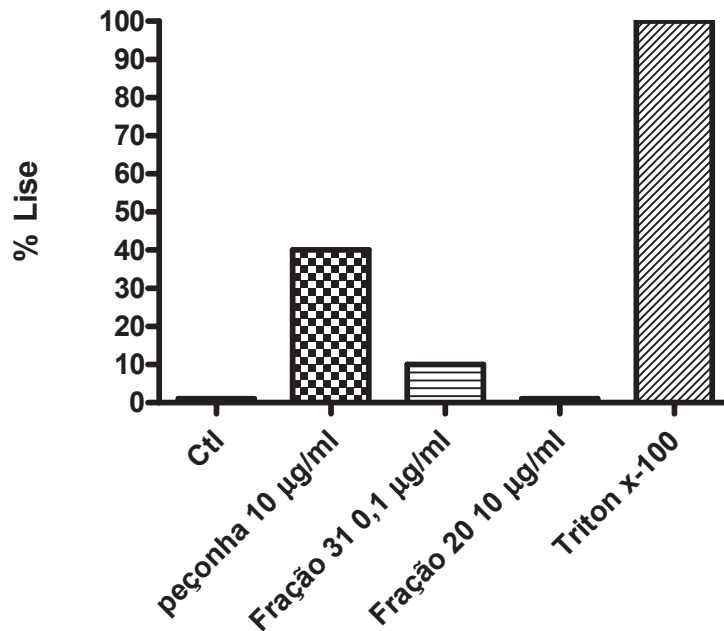


GRÁFICO 13 – Efeito da peçonha e das frações 20 e 31 de *M. lemniscatus* sobre lipossomos de L- α -fosfatidilcolina de soja. A peçonha (10 $\mu\text{g/ml}$), a fração 20 (10 $\mu\text{g/ml}$) ou a fração 31 (0,1 $\mu\text{g/ml}$) foram adicionadas à preparação lipossomal após 2 minutos de incubação a 37^o C. A liberação de calceína foi monitorada fluorimetricamente a 513 nm por 2 minutos e 30 segundos. Triton X-100 (10 % v/v) foi utilizado como controle positivo, representando 100% de lise. Como controle negativo (Ctl), utilizou-se apenas a preparação lipossomal (lipossomos 0,3% v/v em tampão de incubação). Os cálculos estatísticos não puderam ser feitos devido ao pequeno número de experimentos realizados.

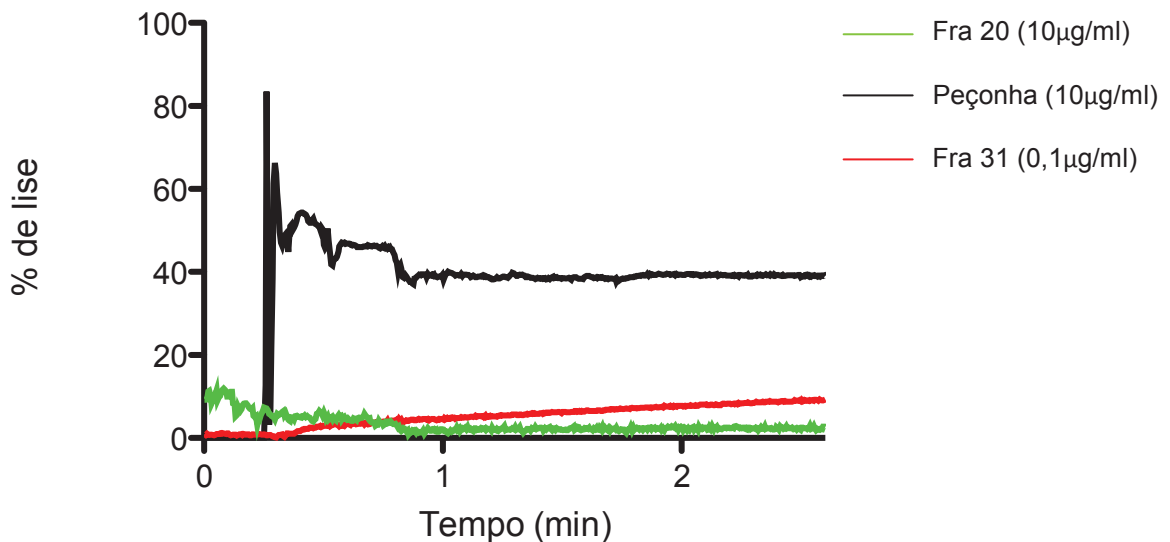
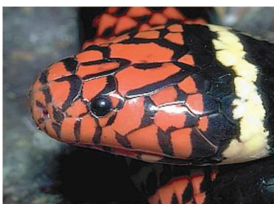


GRÁFICO 14- Cinética da liberação de calceína a partir de lipossomos de L- α -fosfatidilcolina de soja pela ação da peçonha e das frações 20 e 31 de *M. lemniscatus*. A peçonha (10 $\mu\text{g/ml}$), a fração 20 (10 $\mu\text{g/ml}$) ou a fração 31 (0,1 $\mu\text{g/ml}$) foram adicionadas à preparação lipossomal após 2 minutos de incubação a 37^o C. A

liberação de calceína foi monitorada fluorimetricamente a 513 nm por 2 minutos e 30 segundos. Triton X -100 (10 % v/v) foi utilizado como controle positivo e adicionado ao final da leitura, representando 100% de lise (não mostrado). Um controle negativo utilizando-se apenas a preparação lipossomal (lipossomos 0,3% v/v em tampão de incubação) foi feito antes da adição da peçonha e das frações (não mostrado). Os cálculos estatísticos não puderam ser feitos devido ao pequeno número de experimentos realizados.



Discussão

5.0 – DISCUSSÃO

As peçonhas das serpentes representam um verdadeiro arsenal de moléculas ativas, especificamente desenhadas e aperfeiçoadas evolutivamente para interagir de forma rápida e seletiva com diversos alvos farmacológicos em suas presas e deferir suas ações tóxicas. Estas características têm atraído a atenção de pesquisadores de diversas áreas, como biologia molecular, bioquímica, farmacologia e medicina em virtude do potencial terapêutico e farmacológico que representam.

Apesar da vasta gama de efeitos gerados pelo envenenamento ofídico, a peçonha elapídica, particularmente, chama atenção por seu caráter neurotóxico de rápida evolução e a elevada morbi-mortalidade que ocasiona (OLIVEIRA et al., 2008). Algumas PLA₂s elapídicas, sobretudo as que possuem ação pré-sináptica, como β -bungarotoxina, taipoxina, textilotoxina e notexina já estão bem caracterizadas na literatura com relação à modulação da neurotransmissão e à degeneração neuronal (RIGONI et al., 2004; SU, CHANG, 1984; HARRIS et al., 2000). No entanto, o mecanismo de ação dessas toxinas ainda é controverso, levando a muitas especulações e a necessidade de maiores esclarecimentos. Por outro lado, as toxinas de três-dígitos, apesar de sua similaridade estrutural, exercem efeitos farmacológicos diversos, interagindo com receptores e canais iônicos específicos em diferentes tecidos e órgãos. As mais estudadas são as α -NTxs, cuja seletividade pelos nAChRs tem sido amplamente utilizada no entendimento da estrutura e função do sistema nervoso, além de desempenharem um papel crucial para o isolamento e a caracterização dos nAChRs na placa motora (KOH, ARMUGAN, JEYASEELAN, 2006).

A composição e o modo de ação da peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus*, bem como de seus componentes, objeto de estudo deste trabalho, ainda é pouco conhecida. Estudos prévios de nosso Laboratório, envolvendo a purificação e a caracterização bioquímica desta peçonha, revelaram a presença de inúmeras toxinas. Dentre elas, destacam-se as PLA₂s do tipo I e as toxinas de três-dígitos, como os componentes majoritários (Micheline Freire Donato, tese em andamento, dados não publicados). Alguns trabalhos comparativos com a peçonha de diversas espécies de *Micrurus sp.*, revelaram algumas propriedades biológicas

características da peçonha de *M. lemniscatus*. Algumas destas propriedades incluem: miotoxicidade (BARROS et al., 1994; CECCHINI et al., 2005), neurotoxicidade (CECCHINI, et al., 2005; VITAL BRAZIL, 1987), hemorragia (DA SILVA, BUCARETCHI, 2003), edematogenicidade, inibição da captação de $^3\text{H-L}$ -glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos e ruptura de lipossomos (CECCHINI, et al., 2005). Além destes efeitos, PLA₂s isoladas da peçonha de *M. lemniscatus* também produziram alterações comportamentais (caracterizadas por convulsões e movimentos clônicos), eletroencefalográficas e neuropatológicas (perda neuronal massiva e gliose hipocampal) após injeção intra-hipocampal em camundongos (OLIVEIRA et al., 2008). Este resultado é surpreendente pelo fato de que até então, somente PLA₂s com ação pré-sináptica (β -neurotoxinas) atuando sobre a liberação de ACh e eventualmente, de aminoácidos neurotransmissores, eram relacionadas à maioria dos efeitos neurotóxicos observados em estudos com peçonhas de serpentes elapídicas.

Logo, sabendo-se que a peçonha de *M. lemniscatus* aparentemente não possui PLA₂s pré-sinápticas (CECCHINI et al., 2005), esse trabalho forneceu indícios de que outros tipos de PLA₂s (conhecidas como PLA₂s não neurotóxicas) e até mesmo outras moléculas, podem exercer efeitos neurotóxicos centrais, pelo menos quando testadas *in vitro*. Outro ponto importante a ser ressaltado é que a maioria dos trabalhos com PLA₂s e NTxs elapídicas conduzidos até então, utilizaram preparações de junções neuromusculares, que são modelos específicos para caracterizar a neurotoxicidade periférica dessas toxinas, sendo escassos os estudos envolvendo evidências de neurotoxicidade central pelas mesmas.

Assim sendo, o presente trabalho investigou o efeito da peçonha da serpente coral *Micrurus lemniscatus* e de algumas de suas frações isoladas, sobre a liberação de L- glu no SNC de ratos adultos machos. Duas frações contendo toxinas com massas moleculares correspondentes às de PLA₂s e toxinas de três-dígitos foram escolhidas para a investigação deste efeito e do possível mecanismo de ação.

Para isso, utilizou-se preparações de sinaptosomas cérebro-corticais de ratos, que são modelos de terminações sinápticas isoladas amplamente utilizadas no estudo dos mecanismos pré-sinápticos envolvidos no processo de liberação de neurotransmissores. Essa preparação possui como vantagem a rapidez de

obtenção, a baixa contaminação por componentes pós-sinápticos, células da glia e mitocôndrias extrasinaptosomais; além de produzir estruturas viáveis, preservando as organelas e a constituição do nervo original. Os sinaptosomas são também capazes de captar e liberar neurotransmissores de forma eficaz, produzir ATP e manter o potencial de membrana, devido à presença de receptores, carreadores e canais iônicos na membrana sinaptosomal. Entretanto, os sinaptosomas não possuem a maquinaria necessária para a produção de novas proteínas, o que limita sua capacidade de reparo (DUNKLEY, JARVIE, ROBINSON, 2008).

Ao verificar a integridade das preparações utilizadas neste trabalho, através do ensaio da atividade da enzima lactato desidrogenase, observou-se em torno de 15- 25% de lise no controle, provavelmente ocasionada durante a manipulação, o que não afeta a interpretação de nossos resultados, que sempre eram comparados ao referido controle. No entanto, essa porcentagem é pequena se comparada à porcentagem de lise induzida pela peçonha na concentração de 10 µg/ml (65%) e pela fração 31 (60 e 70%) nas concentrações de 1 e 10 µg/ml, respectivamente. Deduzindo-se os valores do controle, a lise provocada pela peçonha e fração 31 ainda permanece na faixa de 40-60%, nas condições experimentais do trabalho. Isto sugere que um dos mecanismos pelo qual a peçonha e a fração 31 alteram a liberação desse neurotransmissor, está relacionado à lise das membranas neuronais, pois estas concentrações foram as mesmas que induziram a liberação de L-glu dos sinaptosomas. O mesmo não se pode concluir com relação à fração 20, pois esta não promoveu a lise de membranas, mas aumentou de forma tempo-dependente a liberação de L-glu dos sinaptosomas na concentração de 10µg/ml. Por um lado, esse resultado foi intrigante, pois é a primeira vez que se observa uma ação pré-sináptica induzida por toxinas de três-dígitos, neste caso o aumento da liberação de L-glu; por outro lado, a ausência de atividade lítica desta fração sobre a membrana sinaptosomal já era esperada, uma vez que toxinas de três-dígitos são desprovidas de atividade enzimática.

A liberação concentração e tempo-dependente de L-glu pela peçonha e fração 31 de *M. lemniscatus*, pode justificar as alterações eletroencefalográficas e neuropatológicas observadas por Oliveira et al. (2008). Essas observações sugerem que a liberação central de L-glu, relacionada em inúmeros trabalhos com efeitos deletérios sobre o SNC (ARUNDINE, TYMIANSKI, 2004; NISHIZAWA, 2001;

SONSALLA, ALBERS, ZEEVALK, 1998), pode estar diretamente relacionada aos efeitos neurotóxicos centrais induzidos *in vitro* pela peçonha desta serpente.

Em um ensaio de neurotoxicidade periférica em preparações neuromusculares de camundongos, realizado por Cecchini et al. (2005) com a peçonha de *M. lemniscatus carvalhoi*, a concentração da peçonha utilizada para produzir o bloqueio completo da neurotransmissão foi de 5µg/ml, a qual encontra-se dentro do intervalo de concentração em que foi observada liberação significativa de L-glu pelos sinaptosomas (1-10µg/ml).

O “screening” realizado neste trabalho com as frações semi-puras de *M. lemniscatus*, demonstrou que dentre as frações que induziram a liberação desse neurotransmissor, apenas a fração 16, segundo análise de massas, não continha toxinas com massas correspondentes às de PLA₂s, o que sugere que esta classe de toxinas parece ser a principal responsável pela liberação central de L-glu pela peçonha, corroborando com o trabalho de inúmeros autores que relacionam as mesmas com efeitos neurodegenerativos e neuropatológicos (HAMLEY, EMSON, 1979; LYSZ, ROSENBERG, 1974; KOLKO et al., 2003; GANDOLFO et al., 1996), inclusive relacionados à liberação de L-glu (KOLKO et al., 1996; O`REAGAN et al., 1995).

No entanto, no trabalho desenvolvido por Oliveira et al. (2008), quando as mesmas PLA₂s que causaram efeitos neurotóxicos após injeção intra-hipocampal em camundongos, foram administradas por via intravenosa, não foram observados efeitos tóxicos para nenhuma delas nas concentrações testadas. Foi sugerido, que as PLA₂s de *M. lemniscatus* não produzem neurotoxicidade quando administradas periféricamente, provavelmente por não atravessarem a barreira hematoencefálica (MONTECUCCO, GUTIÉRREZ, LOMONTE, 2008). Por isso, o efeito central destas PLA₂s é considerado patologicamente irrelevante nos casos de envenenamento por esta serpente, embora constituam ferramentas de grande valia para investigar o efeito de sPLA₂s endógenas e os mecanismos envolvidos na liberação de neurotransmissores; além de explicar as propriedades convulsivantes das mesmas.

Diante desses fatos, focou-se neste trabalho, na peçonha e na fração 20, a qual continha duas neurotoxinas com massas correspondentes às de toxinas de três-dígitos e cujo mecanismo de ação não envolveu a ruptura de membranas. Na

tentativa de delinear esse mecanismo, utilizou-se testes com bloqueadores de canais para cátions, como sódio, potássio e cálcio, que frequentemente estão envolvidos com a despolarização dos terminais sinápticos e a liberação de neurotransmissores (MEIR et al., 1999).

Os bloqueadores tetrodotoxina (Ttx, 5 μ M), tetraetilamônio (TEA, 40mM) e cádmio (Cd⁺², 100 μ M) foram incubados previamente com a preparação como descrito em “Material e métodos”. As concentrações utilizadas foram de 5 μ M, 40mM e 100 μ M, respectivamente. Essas concentrações estão de acordo com aquelas citadas na literatura (RETZ, YOUNG, COYLE, 1982; LENDVAI et al., 1996).

Estudos relatam efeitos específicos de toxinas de três-dígitos em canais iônicos, como é o caso das dendrotoxinas, que são antagonistas potentes de canais para potássio Kv 1.1, 1.2 e 1.6 (HARVEY, ROBERTSON, 2004) e calciceptinas, que se ligam a canais de cálcio tipo L (KINI, 2002). Nos resultados do presente trabalho, não foi verificada nenhuma alteração da liberação de L-glu pela peçonha e fração 20 na presença de Ttx e de TEA, não evidenciando assim, a participação de canais para sódio ou potássio, como essenciais para esta liberação. Entretanto, íons Cd⁺² inibiram parcialmente, o efeito de liberação de L-glu pela fração 20 e pela peçonha, o que sugere o envolvimento de canais para cálcio voltagem-dependentes no processo de liberação de L-glu pelas mesmas. Entretanto, estudos eletrofisiológicos devem ser realizados para melhor esclarecer estes mecanismos.

Para avaliar a importância dos íons cálcio para a atividade da peçonha e da fração 20, experimentos foram realizados utilizando-se estrôncio (2mM), um íon capaz de substituir o cálcio na neurotransmissão *in vitro* (DODGE, MILEDI, RAHAMIMOFF, 1969). Os resultados observados, corroboram aqueles obtidos por Cecchini et al. (2005), em que a inibição da captação de ³H-L-glutamato pela peçonha de *M. lemniscatus* em sinaptosomas corticais, foi atribuída à ação de PLA₂s presentes na mesma. Estes autores verificaram que a alquilação da peçonha pelo reagente brometo de p-bromofenacila, que assim como o estrôncio, é um potente inibidor de fosfolipases, aboliu este efeito. Além disso, as PLA₂s possuem um sítio interno para a ligação ao cálcio; assim, a ausência deste íon ou sua substituição pelo estrôncio resulta em sua inativação (STRONG et al., 1976). No presente trabalho, verificou-se curiosamente, que o aumento da liberação de L-glu pela fração

20 (não fosfolipásica), também foi inibido pelo estrôncio, indicando que esta fração é ativada pelo cálcio e provavelmente, possui um sítio para a sua ligação. Os experimentos com concentrações despolarizantes de potássio e na presença de estrôncio, confirmaram que a liberação *in vitro* se processa normalmente na presença deste íon em substituição ao cálcio. O controle positivo, representado pelo ensaio com crotoxina, confirma o efeito inibitório do estrôncio para PLA₂s. Ensaio complementares, para averiguar a importância dos estoques extracelulares de cálcio para a atividade da peçonha e da fração 20, foram feitos utilizando-se EGTA, um quelante desses íons. No entanto, apesar de ter sido verificada uma tendência à inibição do efeito da peçonha e da fração 20, os resultados com os controles foram incoerentes e tais experimentos deverão ser repetidos.

De acordo com a literatura, a ACh pode estimular a liberação central de L-glu através de seus receptores nicotínicos (ALKONDON, ALBUQUERQUE, 2002) ou inibir esta liberação através de receptores muscarínicos (MARCHI, RAITERI, 1989) localizados no terminal pré-sináptico. Assim, para averiguar o possível efeito da peçonha sobre estes receptores, foram utilizados dois antagonistas (D-tubocurarina 100µM; atropina 1µM) e um agonista (carbacol 1µM) inespecíficos para as diferentes subunidades dos receptores colinérgicos. De acordo com os resultados observados, não houve nenhuma alteração da liberação de L-glu na presença dos mesmos. Este teste deverá ser feito também com a fração 20, pois devido às quantidades limitantes da mesma, o experimento não pôde ser realizado, o que demandará novas purificações da peçonha.

Sabe-se que a peçonha é uma mistura de várias toxinas com diferentes alvos farmacológicos e com alta concentração de PLA₂s, que dentre outros mecanismos, induzem o rompimento da membrana sinaptosomal. Logo, é possível que, mesmo que a peçonha exercesse algum efeito sobre esses receptores, o mesmo poderia ser mascarado pela presença majoritária das PLA₂s. Neste caso, a purificação, e a realização dos experimentos com frações puras, é desejável.

Para comprovar a atividade fosfolipásica da peçonha e das toxinas presentes em nossas frações de estudo, mediu-se a atividade fosfolipásica direta das mesmas, conforme descrito. Os resultados obtidos comprovam que a atividade fosfolipásica da peçonha de *M. lemniscatus* é concentração-dependente, com potência estimada

em torno de 14 vezes maior em relação à peçonha de *C. durissus terrificus*. Esse resultado está de acordo com os dados de Aird e Da Silva Jr. (1991), que verificaram alta atividade fosfolipásica para peçonhas de diferentes espécies de *Micrurus sp.*, incluindo as de *M. lemniscatus*, *M. frontalis* e *M. ibiboboca*.

Ao serem testadas nas mesmas concentrações utilizadas para a construção da curva de liberação de L-glu, a peçonha apresentou atividade fosfolipásica nas concentrações de 10, 1 e 0,1 µg/ml; a fração 31, nas concentrações de 10 e 1 µg/ml, enquanto que a fração 20 não apresentou nenhuma atividade fosfolipásica detectável pelo teste utilizado neste trabalho. Esses resultados, aliados aqueles de liberação de L-glu e de lactato desidrogenase, indicam mais uma vez, que o principal mecanismo de ação da peçonha e da fração 31 sobre a liberação de L-glu deve-se muito provavelmente, às suas atividades fosfolipásicas. Em relação à fração 20, o teste comprovou a natureza não fosfolipásica de suas toxinas, corroborada pela análise das massas (dados do trabalho de Micheline Donato).

Testes com lipossomos também foram desenvolvidos com a peçonha (10µg/ml), a fração 20 (10µg/ml) e a fração 31 (0,1µg/ml). Embora a fração 31 tenha sido utilizada em uma concentração inferior à concentração mínima em que induz liberação de L-glu pelos sinaptosomas, uma pequena porcentagem de lise (10%) foi verificada em relação ao controle. A fração 20, assim como observado nos testes de fosfolipase e LDH, não promoveu a ruptura dos lipossomos. O resultado obtido para a peçonha está de acordo com o descrito por Cecchini et al. (2005), em que a peçonha de *M. lemniscatus* também induziu a ruptura dos lipossomos; porém nesse caso, de forma tempo e temperatura-dependente.

Algumas toxinas de três-dígitos com massa em torno de 6.000 Da, presentes na peçonha de alguns elapídeos são conhecidas como citotoxinas ou cardiotoxinas. Essas toxinas causam despolarização de nervos e contração das musculaturas cardíaca, esquelética e lisa. Essas mesmas toxinas são agentes formadores de poros nas membranas (FOROUHAR et al., 2003; KOH, ARMUGAN, JEYASEELAN, 2006), levando à despolarização e à degeneração de células musculares esqueléticas. Uma possibilidade era de que nossa toxina de interesse (presente na fração 20), cuja massa molecular é de 6.675 Da (Fig. 14), fosse uma citotoxina. No entanto, através do seqüenciamento de sua extremidade N-terminal, composta por

21 resíduos de aminoácidos (Fig. 15) e busca por similaridade em bancos de dados, foi confirmado que se trata de uma α -NTx de cadeia curta (dado cedido por Micheline Donato). A extremidade N-terminal desta toxina apresentou 100% de homologia com α -NTxs de cadeia curta das serpentes *M. pirrhocryptus* e *M. laticollaris* (Quadro 4).

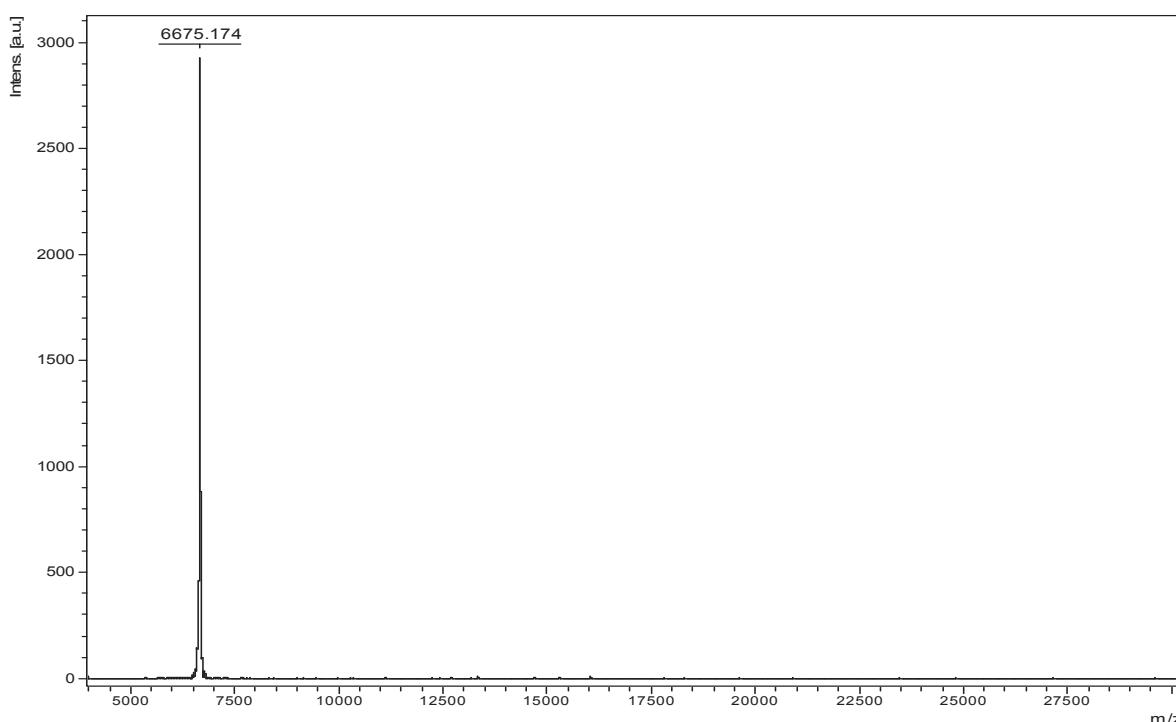


FIGURA 14– Espectro de massas referente à toxina Mltx 20 (MM = 6.675 Da), obtida pelo fracionamento bidimensional da peçonha de *M. lemniscatus*. A amostra (0,7 μ l) foi aplicada na placa MTP Anchor Chip acrescida da solução matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (1:1 v/v). Os espectros de MS foram obtidos em modo positivo/refletido, com a frequência do laser ajustada em 50 Hz. Os dados foram analisados através do programa Flex Analysis 3.3. A presença de apenas um pico de massa 6.675, 174 Da, confirma a pureza da toxina. Fonte: (Cedido pela doutoranda Micheline Donato)

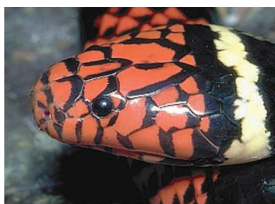
MICYNQQSSQPPTTKTCSEGQ

FIGURA 15 – Sequência N-terminal da toxina Mltx 20 (MM = 6.675 Da). A figura representa os 21 resíduos de aminoácidos (aas) seqüenciados pelo método de Degradação de Edman, utilizando-se o seqüenciador automático de proteínas Shimadzu PPSQ-21[®]. Fonte: (Dado cedido pela doutoranda Micheline Donato)

QUADRO 4 – Similaridade estrutural obtida para a extremidade N-terminal da toxina Mltx 20 (MM = 6.675 Da). A busca por similaridade foi feita através dos bancos de dados Swiss-Prot e Gene Bank, utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). AAS: aminoácidos.

Proteínas	Fonte	Organismo	AAS	Similaridade %	E-value	Classificação
1	α - NTx de cadeia curta NSXD1_MICPY	<i>Micrurus pirrhocryptus</i>	60	100	6.0E-15	Elapidae
2	Toxina de três-dígitos F5CPE7_MICAT	<i>Micrurus altirostris</i>	81	95	4.0E-13	Elapidae
3	α - NTx de cadeia curta A1K9MCH1_MSAUR	<i>Micrurus laticollaris</i>	81	100	6.0E-13	Elapidae
4	α - NTx de cadeia curta MS1NXS1_MICSU	<i>Micrurus surinamensis</i>	59	90	7.0E-13	Elapidae
5	Frontoxina I (FTxI) NXS1_MICFR	<i>Micrurus frontalis</i>	56	90	8.0E-13	Elapidae
6	α - NTx de cadeia curta 1 Mnn-9 NXS1_MICNI	<i>Micrurus nigrocinctus</i>	60	90	2.0E-11	Elapidae
7	α - NTx de cadeia curta 2 (Toxin CM-10a) NXS2_NAJHH	<i>Naja hage hage</i>	61	88	4.0E-7	Elapidae
8	α - NTx de cadeia curta 2 (Toxin CM-14) (Toxin V-N-12)	<i>Naja annulifera</i>	61	88	4.0E-7	Elapidae

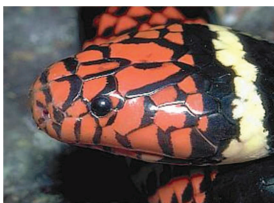
Fonte: (Cedido pela doutoranda Micheline Donato)



Conclusão

6.0- CONCLUSÃO

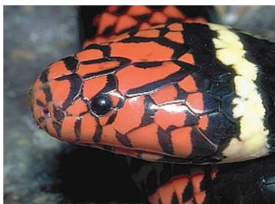
A neurotoxicidade central *in vitro* exercida pela peçonha de *M. lemniscatus* pode estar relacionada ao aumento da liberação cortical de glutamato induzida pela mesma. Os componentes responsáveis por este efeito são em sua maioria fosfolipases, as quais dentre outros mecanismos, promovem a lise das membranas neuronais. Uma vez que estas toxinas aparentemente não atravessam a barreira hemato-encefálica, uma neurotoxina de três-dígitos de massa molecular de 6.675 Da (Mltx 20), presente em duas frações provenientes de corridas cromatográficas diferentes (16 e 20) é sugerida, pelos menos parcialmente, como responsável pela neurotoxicidade central observada em indivíduos envenenados. Seu mecanismo de ação não envolve a lise de membranas e é parcialmente dependente de canais para cálcio voltagem-dependentes. Sugere-se ainda, que esta toxina possua um sítio de ligação para o cálcio, uma vez que sua ação é inibida quando este íon é substituído por estrôncio.



==== *Perspectivas* ====

7.0 – PERSPECTIVAS

- Verificar o envolvimento de receptores glutamatérgicos pré-sinápticos na modulação da liberação de glutamato induzida pela ação da toxina Mltx 20 (MM= 6.675 Da) pura.
- Confirmar o não envolvimento de canais para sódio e potássio por estudos eletrofisiológicos com a toxina Mltx 20 pura.
- Verificar se a ação da toxina Mltx 20 sobre a liberação central de glutamato envolve a reversão do transportador Na⁺/glutamato.
- Verificar se a toxina Mltx 20 atravessa a barreira hematoencefálica.
- Determinar a DL₅₀ para a toxina Mltx 20.
- Determinar a região ativa da toxina Mltx 20 através de estudos de bioinformática.
- Obter o seqüenciamento completo da toxina Mltx 20.
- Sintetizar o peptídeo correspondente a região prevista como responsável pela ação da toxina sob a liberação de glutamato e testar sua eficácia.



Referências

8.0- REFERÊNCIAS

AIRD, S.D.; DA SILVA JR., N.J. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* V. 99B, p. 287-294, 1991.

ÁLAPE-GIRON, A.; LOMONTE, B.; GUSTAFSSON, B.; DA SILVA JR, N.J.; THELESTAM, M. Eletrophoretic and imunochemical studies of *Micrurus* snake venoms. *Toxicon.* V. 32, p. 713-723, 1994.

ALI, A.B.; ROSSIER, J.; STAIGER, J.F.; AUDINAT, E. Kainate receptors regulate unitary IPSCs elicited in pyramidal cells by fast-spiking interneurons in the neocortex. *J. Neurosci.* V. 21(9), p. 2992-2999, 2001.

ALKONDON, M.; ALBUQUERQUE, E.X. A non- α -7 nicotinic acetylcholine receptor modulates excitatory input to hippocampal CA1 interneurons. *J. Neurophysiol.* V. 87(3), p. 1651-1654, 2002.

ALKONDON, M.; ROCHA, E.S.; MAELICKE, A.; ALBUQUERQUE, E.X. Diversity of acetylcholine receptors in rat brain. V. α -Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in olfactory bulb neurons and presynaptic modulation of glutamate release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* V. 278(3), p. 1460-1471, 1996.

ALOULO, A.; ALI, Y.B.; BEZZINE, S.; GARGOURI, Y.; GELB, M.H. Phospholipases: an overview. *Methods Mol. Biol.* V. 861, p. 63-85, 2012.

AMARAL, A. Contribuição à biologia dos ophidios brasileiros (habitat, hábitos e alimentação). 1ª nota prévia. *Collectânea dos Trabalhos do Instituto Butantan*, V. 2, p.175-181, 1927.

ANDERSON, C.M.; SWANSON, R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions. *Glia.* V. 32(1), p. 1-14, 2000.

ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell. Mol. Life. Sci.* V. 61, p. 657-668, 2004.

ASZTÉLY, F.; GUSTAFSSON, B. Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol. Neurobiol.* V. 12(1), p. 1–11, 1996.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; HERING, S.E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. *Medicina Ribeirão Preto.* V. 36, p. 480-489, 2003.

BARAZANGI, N.; ROLE, L.W. Nicotine-induced enhancement of glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the mouse amygdala. *J. Neurophysiol.* V. 86(1), p. 463-474, 2001.

BARNETT, D.; HOWDEN, M.E.H.; SPENCE, I. A neurotoxin of novel structural type from the venom of the Australian common brown snake. *Naturwissenschaften.* V. 67, p. 405-406, 1980.

BARRAVIERA, B. Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. 1. ed. Rio de Janeiro: EPUB, 1999.

BARROS, A.C.S.; FERNANDES, D.P.; FERREIRA, L.C.L.; DOS SANTOS, M.C. Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (coral snake). *Toxicon.* V. 32, p. 445-452, 1994.

BEAL, M.F. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J.* V. 6(15), p. 3338-3344, 1992.

BÉRNILS, R.S.; COSTA, H.C. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Brazilian réptiles: List of species. Disponível em: < <http://sbherpetologia.org.br/> >. Acesso em: 16 jul. 2011.

BIRREL, G.W.; EARL, S.T.H.; WALLIS, T.P.; MASCI, P.P.; DE JERSEY, J.; GORMAN, J.J.; LAVIN, M.F. The Diversity of Bioactive Proteins in Australian Snake Venoms. *Molecular & Celular Proteomics*, V. 6, p. 973-986, 2007.

BIRREL, G.W.; EARL, S.T.H.; WALLIS, T.P.; MASCI, P.P.; DE JERSEY, J.; GORMAN, J.J.; LAVIN, M.F. The Diversity of Bioactive Proteins in Australian Snake Venoms. *Molecular & Celular Proteomics*, V. 6, p. 973-986, 2007.

BLACKMER, T.; LARSEN, E.C.; BARTLESON, C.; KOWALCHYC, J.A.; YOON, E.J.; PREININGER, A.M.; ALFORD, S.; HAMM, H.E.; MARTIN, T.F. G protein betagamma directly regulates SNARE protein fusion machinery for secretory granule exocytosis. *Nat. Neurosci.* V. 8(4), p. 421-425, 2005.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cadernos de Saúde Pública*. V. 19, p. 7-16, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2. ed. Brasília, 2001, 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação: Acidentes por animais peçonhentos. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 20 jun. 2013.

BROAD, A.J.; SUTHERLAND, S.K.; COULTER, A.R. The lethality in mice of dangerous Australia and other snake venom. *Toxicon*. V. 17(6), p. 661-4, 1979.

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism and signaling. *J. Lipid. Res.* V. 50, p. S237- S242, 2009.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. The Venomous Reptiles of Western Hemisphere. Coral snakes and sea snakes. Elapidae Family. *Cornell University Press*, Ithaca, NY, 2004.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MALAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: *Sarvier*, 2003.

CARREDANO, E.; WESTERLUND, B.; PERSSON, B.; SAARINEN, M.; RAMASWAMY, S.; EAKER, D.; EKLUND, H. The Three-dimensional structures of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A₂. *Toxicon*. V. 36(1), p. 75-92, 1998.

CARVALHO, C.M.; ALENCAR, I.C.S.; VILAR, J.C. Serpentes da região de Manaus, Amazônia Central, Brasil. *Biol. Geral Exper*. V. 7(2), p. 41-59, 2007.

CASTOE, T.A.; SMITH, E.N.; BROWN, R.M.; PARKINSON, C.L. Higher-level phylogeny of Asian and American coral snakes, their placement within the Elapidae (Squamata) and the systematic affinities of the enigmatic Asian coral snake *Hemibungarus calligaster*. *Zoological Journal of the Linnean Society*. V. 151(4), p. 809-831, 2007.

CECCHINI, A.L.; MARCUSSI, S.; SILVEIRA, L.B.; OLIVEIRA, C.R.B.; SIMIONI, L.R.; AMARA, S.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; ARANTES, E.C.; SOARES, A.M. Biologic and enzymatic activity of *Micrurus sp.* (coral) snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. V. 140, p. 125-134, 2005.

CHALBOT, S.; ZETTERBERG, H.; BLENNOW, K.; FLADBY, T.; ANDREASEN, N.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Blood- cerebrospinal fluid barrier permeability in Alzheimer`s disease. *J. Alzheimers Dis*. V. 25(3), p. 505-15, 2011.

CHANG, C.C.; LEE, C.Y. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Arch. Int. Pharmacodyn*. V. 144, p. 241-257, 1963.

CHANGEUX, J.P. The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* V.11, p. 485-492, 1990.

CHEN, I.L.; LEE, C.Y. Ultrastructural changes in the motor nerve terminals caused by beta-bungarotoxin. *Virchows. Arch. B. Cell. Pathol.* V. 6(4), p. 318-25, 1970.

CHIPPAUX, J.P. Snakebites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ.* V. 76, p. 515–524, 1998.

CITRI, A.; MALENKA, R.C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions and mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* V. 33(1), p. 18-41, 2008.

CULL-CANDY, S.G.; FOHLMAN, J.; GUSTAVSSON, D.; LULLMAN-RAUCH, R.; THESLEFF, S. The effects of taipoxin and notexin on the function and fine structure of the murine neuromuscular junction. *Neuroscience.* V. 1, p. 175-180, 1976.

DA SILVA JR, N.J.; BUCARETCHI, F. Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. In: Animais peçonhentos no Brasil. Cardoso, J.L.C. et al., São Paulo: *Sarvier*, 99-107, 2003.

DA SILVA JR, N.J.; SITES Jr, J.W. Phylogeny of South American Triad Coral Snakes (Elapidae: *Micrurus*) Based on Molecular Characters. *Herpetologica.* V. 57(1), p. 1-22, 2001.

DA SILVA JR, NJ.; AIRD, S.D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* V. 128, p.425-456, 2001.

DAIKHIN, Y.; YUDKOFF, M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *Journal of Nutrition.* V. 130, p. 1026S–1031S, 2000.

DAL BELO, C.A.; TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; MARANGONI, S.; MORENO, F.B.; CAVADA, B.S.; FONTANA, M.D.; HYSLOP, S.; CARNIERO, E.M.;

BOSCHERO, A.C. Determination of the amino acid sequence of a new phospholipase A₂ (MIDCA1) isolated from *Micrurus dumerelli carinicauda* venom. *Prot. J. V.* 24, p. 147-153, 2005.

DALTRY, J.C.; WUSTER, W.; THORPE, R.S. Diet and snake venom evolution. *Nature. V.* 379 (6565), p. 537-40, 1996.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology. V.* 65, p. 1-105, 2001.

DEBANNE D.; DAOUDAL, G.; SOURDET, V.; RUSSIER. Brain plasticity and ion channels. *J. Physiol. Paris. V.* 97 (4-6), p. 403-14, 2003.

DI-BERNARDO, M.; BORGES-MARTINS, M.; DA SILVA Jr, N.J. A new specie of coral snake (*Micrurus*: Elapidae) from southern Brazil. *Zootaxa. V.* 1447, p. 1-26, 2007.

DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. The glutamate receptors ion channels. *Pharmacological Reviews. V.* 51(1), 1999.

DIXON, R.W.; HARRIS, J.B. Nerve terminal damage by b-Bungarotoxin: its clinical significance. *Am. J. Pathol. V.* 154, p. 447-455, 1999.

DJORDJEVIC, J. T. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development – lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Front. Microbio. V.*1, p. 125, 2010.

DODGE JR, F.A.; MILEDI, R.; RAHAMIMOFF, R. Strontium and quantal release of transmitter at the neuromuscular junction. *J. Physiol. V.* 200(1), p. 267-283, 1969.

DOKMETIJIAN, J.C.; CANTO, S.; VINZÓN, S.; BONINO, M.B.J. Biochemical characterization of *Micrurus pirrhocryptus* venom. *Toxicon. V.* 53, p. 375-382, 2009.

DONATO, M.F. Purificação, Caracterização Bioquímica e Eletrofisiológica da Toxina Mic6c7NYX da Peçonha da Serpente *Micrurus Ibiboboca* (Merrem, 1820).

Dissertação. (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia).
Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

DORANDEU, F., ANTIER, D., PERNOT-MARINO, I., LAPEYRE, P., LALLEMENT, G.
Venom phospholipase A₂-induced impairment of glutamate uptake: An indirect and nonselective effect related to phospholipid hydrolysis. *Journal of Neuroscience Research*. V. 51, p. 349-359, 1998.

DUBINSKY, J.M. Intracellular calcium levels during the period of delayed excitotoxicity. *J. Neurosci*. V. 13(2), p. 623-631, 1993.

DUNKLEY, P.R.; HEATH, J.W.; HARRISON, S.M.; JARVIE, P.E.; GLENFIELD, P.J. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain. Res*. V. 441, p. 59-71, 1988.

DUNKLEY, P.R.; JARVIE, P.E.; ROBINSON, P.J. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nature Protocols*. V. 3(11), p. 1718-1728, 2008.

ERECINSKA, M.; SILVER, I.A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol*. V. 35, p. 245-96, 1990.

FAROOQUI, A.A.; ONG, W.Y.; HORROCKS, L.A. Inhibitors of brain phospholipase A₂ activity: their pharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol. Rev*. V. 58(3), p. 591-620, 2006.

FIX, J.D. Venom yield of the North American coral snake and its clinical significance. *South. Med. J*. V. 73(6), p. 737-738, 1980.

FOHLMAN, J.; EAKER, D.; KARLSSON, E.; THESLEFF, S. Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake taipan. *Eur. J. Biochem*. V. 68, p. 457-469, 1976.

FOROUHAR, F.; HUANG, W.N.; LIU, J.H.; CHIEN, K.Y.; WU, W.G.; HSIAO, C.D. Structural basis of membrane-induced cardiotoxin A3 oligomerization. *J. Biol. Chem.* V. 278(24), p. 21980-8, 2003.

FRANCIS, B.R., JORGE DA SILVA, N., SEEBART, C., CASAIS E SILVA, L.L., SCHMIDT, J., KAISER, I.I. Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipase A₂ and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon*. V.35, p.1193-1203, 1997.

FRANCO, F.L. Origem e diversidade das serpentes. In: Animais peçonhentos no Brasil. Cardoso, J. L. C. et al., São Paulo: *Sarvier*, p. 33-61, 2003.

FREMEAU JR, R.T.; VOGLMAIER, S.; SEAL, R.P.; EDWARDS, R.H. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci.* V. 27, p. 98-103, 2004.

FRY, B.G.; WICKRAMARATANA, J.C.; LEMME, S.; BEUVE, A.; GARBERS, D.; HODGSON, W.C.; ALEWOOD, P. Novel natriuretic peptides from the venom of the inland taipan (*Oxyuranus microlepidotus*: isolation, chemical and biological characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V. 327, p. 1011-1015, 2005.

FUNAHASHI, M.; MITOH, Y.; MATSUO, R. Activation of presynaptic 5-HT₃ receptors facilitates glutamatergic synaptic inputs to area postrema neurons in rat brain slices. *Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* V. 26(8), p. 615-622, 2004.

GANDOLFO, G.; LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M.; GOTTESMANN, C. Effects on behavior and EEG of single chain phospholipases A₂ from snake and bee venoms injected into rat brain: search for a functional antagonism. *Pharmacol. Toxicol.* V. 78(5), p. 341-347, 1996.

GAYWOOD, M.; SPELLERBERG, I. Snakes. USA: *WorldLifeLibrary*, 1999.

GERACHSHENKO, T.; BLACKMER, T.; YOON, E.J.; BARTLESON, C.; HAMM, H.E.; ALFORD, S. Gbetagamma acts at the C-terminus of SNAP-25 to mediate presynaptic inhibition. *Nat. Neurosci.* V. 8(5), p. 597-605, 2005.

GONZÁLEZ, M.I.; ROBINSON, M.B. Protein kinase C-dependent remodeling of glutamate transporter function. *Molecular Interventions*, V. 4(1), p. 48-58, 2004.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, B.J. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. *Toxicon*. V. 22(5), p. 791-804, 1984.

GOTO, H.; WATANABE, K.; ARARAGI, N.; KAGEYAMA, R.; TANAKA, K.; KUROKI, Y.; TOYODA, A.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; FUJIYAMA, A.; FUKUMAKI, Y.; SHIBATA, H. The identification and functional implications of human-specific "fixed" amino acid substitutions in the glutamate receptor family. *BMC Evol. Biol.* V. 9, p. 224, 2009.

GOULARTE, F.C.; CRUZ-HOFLING, M.A.; COGO, J.C.; GUTIÉRREZ, J.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L. The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and the neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. *Toxicon*. V. 33, p. 679-689, 1995.

GRAY R.; RAJAN, A.S.; RADCLIFFE, K.A.; YAKEHIRO, M.; DANI, J.A. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*. V. 383, p. 713–16, 1996.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; PORTILLA, E.; CERDAS, L.; ROJAS, E. Local effects induced by coral snake venom: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. *Toxicon*. V. 26, p. 777-783, 1983.

GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; JORGE DA SILVA, N.; NUNES, J. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). *Toxicon*. V.30, p. 1299-1302, 1992.

GUTIÉRREZ, J.M.; WILLIAMS, D.; FAN, H.W.; WARRELL, D.A. Snakebite envenoming from a global perspective: towards an integrated approach. *Toxicon*. V. 56, p.1223–1235, 2010.

HABERMANN, E.; NEUMANN, W. Die Hemmung der Hitzekoagulation von Eigelbdurch Bienengift - ein phospholipase-effekt. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* V. 297, p. 179-193. 1954.

HANLEY, M.R.; EMSON, P.C. Neuronal degeneration induced by stereotaxic injection of β -bungarotoxin into rat brain. *Neurosci. Lett.* V. 11, p. 143-148, 1979.

HARRIS, J.B.; GRUBB, B.D.; MALTIN, C.A.; DIXON, R. The Neurotoxicity of the Venom Phospholipases A2, Notexin and Taipoxin. *Experimental Neurology*. V. 161, p. 517-526, 2000.

HARVEY, A.L.; ROBERTSON, B. Dendrotoxins: structure-activity relationships and effects on potassium ion channels. *Curr. Med. Chem.* V. 23, p. 3065-72, 2004.

HARVEY, M.B.; APARICIO E.J.; GONZALEZ A.L. Revision of the venomous snakes of Bolívia: Part I. The coralsnakes (Elapidae: *Micrurus*). *Annals of Carnegie Museum*. V. 72, p. 1-52, 2003.

HICKMAN JR, C.P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. Princípios integrados de zoologia, 11 ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, 2004.

HODGSON, W.C.; WICKRAMARATNA, J.C. Snake venoms and their toxins: An Australian perspective. *Toxicon*. V. 48, p. 931-940, 2006.

HUETTNER, J.E. Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* V. 70(5), p. 387-407, 2003.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in the snake venoms. *Handbook of experimental pharmacology (snake venom)*. V. 52, p. 75-84, 1979.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. Principles of neuroscience. 3 ed. New York: Elsevier Publishing Co., 1991.

KARDONG, K.V. Snake toxins and venoms: An evolutionary perspective. *Herpetologica*. V. 52(1), p. 36-46, 1996.

KARDONG, K.V. The evolution of the venom apparatus in snakes from Colubrids to Viperids & Elapids. *Mem. Inst. Butantan*. V. 46, p. 106-118, 1982.

KARLSSON, E., EAKER, D., RYDEN, L., 1972. Purification of a presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. *Toxicon*. V. 10, p. 405-413.

KARLSSON, E.; EAKER, D.; RYDEN, L. Purification of a presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian Tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. *Toxicon*. V. 10, p. 405-413, 1972.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D.G.; DE SILVA, H.J. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Med*. V. 5 (11), e 218, 2008.

KELLY, R.B.; OBERG, S.G.; STRONG, P.N.; WAGNER, G.M. Beta-bungarotoxin, a phospholipase that stimulates transmitter release. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol*. V. 40, p. 117-125, 1976.

KEOGH, J.S. Elapidae. *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. Detroit: Thomson-Gale, 2004.

KEOGH, J.S. Molecular Phylogeny of elapid snakes and a consideration of their biogeographic history. *Biol.J. Linnean Soc.* V. 63, p. 177-203, 1998.

KIM, D.Y.; KIM, S.H.; CHOI, H.B.; MIN, C.; GWAG, B.J. High abundance of GluR1 mRNA and reduced Q/R editing of GluR2 mRNA in individual NADPH-diaphorase neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* V.17(6), p. 1025–33, 2001.

KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzyme. *Toxicon.* V. 42, p. 827-840, 2003.

KINI, R.M. Molecular moulds with multiple missions: functions sites in three-finger toxins. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology.* V. 29, p. 815-22, 2002.

KOH, D.C.I.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cel. Mol. Life. Sci.* V. 63, p. 3030-3041, 2006.

KOLKO, M., RODRIGUEZ DE TURCO, E.B.; DIEMER, N.H.; BAZAN, N.G. Neuronal damage by secretory phospholipase A₂: modulation by cytosolic phospholipase A₂, platelet activating factor, and cyclooxygenase- 2 in neuronal cells in culture. *Neurosci. Lett.* V. 338(2), p. 164-168, 2003.

KOLKO, M.; DE COSTER, M.A.; DE TURCO, E.B.; BAZAN, N.G. Synergy by secretory phospholipase A₂ and glutamate on inducing cell death and sustained arachidonic acid metabolic changes in primary cortical neuronal cultures. *J. Biol. Chem.* V. 271(51), p. 32722-32728, 1996.

KUBOWISTZ, F.; OTT, C. Isolierung and krystallisation eines garugferments aus tumoren. *Biochem Z.* V. 319, p. 94-117, 1943.

LAMBEAU, G.; BARHANIN, J.; SCHWEITZ, H.; QAR, J.; LAZDUNSKI, M. Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *J. Biol. Chem.* V. 264(19), p. 11503-10, 1989.

LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. *Trends Pharmacol Sci.* V. 20(4), p. 162-70, 1999.

LEE, C.Y.; TSAI, M.C.; CHEN, Y.M.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. Mode of neuromuscular blocking action of toxic phospholipases A₂ from *Vipera ammodytes* venom. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* V. 268, p. 313–324, 1984.

LEE, M.S.Y. The phylogeny of varanoid lizards and the affinities of snakes. *Phil. Trans. R. Soc. London.* V. 352, p. 53-91, 1997.

LENDVAI, B.; SERSHEN, H.; LAJTHA, A.; SANTHA, E.; BARANYI, N.; VIZI, E.S. Differential mechanisms involved in the effect of nicotinic agonists DMPP and lobeline to release [³H]5-HT from rat hippocampal slices. *Neuropharmacology.* V. 35 (12), p. 1769-1777, 1996.

LI, S.; WANG, J.; ZHANG, X.; REN, Y.; WANG, N.; ZHAO, K.; CHEN, X.; ZHAO, C.; LI, X.; SHAO, J.; YIN, J.; WEST, M.B.; XU, N.; LIU, S. Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. *Journal of Biochemistry.* V. 384, p. 119-27, 2004.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* V. 193(1), p. 265-75, 1951.

LYSZ, T.W.; ROSENBERG, P. Convulsant activity of *Naja naja* venom and its phospholipase A component. *Toxicon.* V. 12(3), p. 253-265, 1974.

MANEV, H.; FAVARON, M.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E. Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol. Pharmacol.* V. 36 (1), p. 106–12, 1989.

MARCHI, M.; RAITERI, M. Interaction acetylcholine-glutamate in rat hippocampus: involvement of two subtypes of M-2 muscarinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* V. 248(3), p. 1255-1260, 1989.

MARQUES, O.A.V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; RODRIGUES, M. G. Activity patterns in Coralsnakes, genus *Micrurus* (Elapidae), in South and Southeastern Brazil. *South Amer. J. Herpetol.* V. 1(2), p. 99-105, 2006.

MARTIN, J.L.; FINSTERWALD, C. Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. *Communicative & Integrative Biology.* V. 4(1), p. 14-16, 2011.

MARTINS, M.; OLIVEIRA, M.E. Natural history of snakes in forests of the Manaus region Central Amazonia Brazil. *Herpetol. Nat. Hist.* V. 6(2), p. 78-150, 1998.

MAYER, M.L. Glutamate receptor ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* V. 15(3), p. 282-288, 2005.

MCGEHEE, D.S.; HEATH, M.J.; GELBER, S.; DEVAY, P.; ROLE, L.W. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science.* V. 269, p. 1692–1696, 1995.

MEIR, A.; GINSBURG, S.; BUTKEVICH, A.; KACHALSKY, S.G.; KAISERMAN, I.; AHDUT, R.; DEMIRGOREN, S.; RAHAMIMOFF, R. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiological Reviews.* V. 79(3), p. 1019-88, 1999.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutri.* V. 130 (4S Suppl), p. 1007S-15S, 2000.

MELDRUM, B.S.; AKBAR, M.T.; CHAPMAN, A.G. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res.* V. 36, p.189–204, 1999.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Animais peçonhentos no Brasil. Cardoso, J. L. C. et al., São Paulo: *Sarvier*, p. 33-61, 2003.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life. Sci.* V. 65(18), p. 2897-912, 2008.

MONTECUCCO, C.; ROSSETO, O. How do presynaptic phospholipase A₂ neurotoxins block nerve terminals? *TIBS.* V. 25, p. 266-270, 2000.

MORAES, F.V.; SOUZA- E- SILVA, M.C.C.; BARBARO, K.C.; LEITÃO, M.A.; FURTADO, F M.C. Biological and Imunochemical characterization of *Micrurus altirostris* venom and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon.* V. 49, p. 71-79, 2003.

MUSAZZI, L.; MILANESE, M.; FARISELLO, P.; ZAPPETTINI, S.; TARDITO, D.; BARBIERO, V.S.; BONIFACINO, T.; MALLEI, A.; BALDELLI, P.; RACAGNI, G.; RAITERI, M.; BENFENATI, F.; BONANNO, G.; POPOLI, M. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS One.* V. 5(1), e8566, 2010.

NICHOLLS, D.G.; SIHRA, T.S.; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium-dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.* V. 49, p. 50-57, 1987.

NICIU, M.J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* V. 100, p. 656-664, 2012.

NIRTHANAN, S.; GWEE, M.C.E. Three-finger α -neurotoxins and nicotinic acetylcholine receptors, forty years on. *J. Pharmacol. Sci.* V.94, p. 1-17, 2004.

NISHIZAWA, Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life. Sci.* V. 69(4), p. 369-381, 2001.

NORTHOFF, G.; RICHTER, A.; BERMPOHL, F.; GRIMM, S.; MARTIN, E.; MARCAR, V.L.; WAHL, C.; HELL, D.; BOEKER, H. *Schizophr. Res.* V. 72(2-3), p. 235-48, 2005.

O'REAGAN, M.H.; SMITH-BARBOUR, M.; PERKINS, L.M.; PHILLIS, J.W. A possible role for phospholipases in the release of neurotransmitter amino acids from ischemic rat cerebral cortex. *Neuroscience Letters.* V. 185, p. 191-194, 1995.

OLAMENDI-PORTUGAL, T.; BATISTA, C.V.F.; RESTANO-CASULINI, F.; PANDO, V.; VILLA-HERNADEZ, O.; ZAVALETA-MARTÍNEZ-VARGAS, A.; SALAS-ARRUZ, M.C.; VEJA, R.C.R.; BECERRIL, B.; POSSANI, L.D. Proteomic analysis of the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: Novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics.* V. 8, p. 1919-1932, 2008.

OLIVEIRA, D.A.; HARASAWA, C.; SEIBERT, C.S.; CASAIS E SILVA, L.L.; PIMENTA, D.C.; LEBRUN, I.; SANDOVAL, M.R.L. Phospholipase A₂ isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: Behavioral, eletroencephalographic and neuropathological aspects. *Brain Research Bulletin.* V. 75, p. 629-639, 2008.

OLIVEIRA, J.S.; SILVA, A.R.B.P.; SOARES, M.B.; STEPHANO, M.A.; DIAS, W.O.; RAW, I.; HO, P.L. Cloning and characterization of an α -neurotoxin type protein specific from the coral snake venom *Micrurus corallinus*. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* V. 267(3), p. 887-891, 2000.

O'SHEA, R.D. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* V. 29, p. 1018-23, 2002.

OZAWA, S. [Ca²⁺ permeation through the ionotropic glutamate receptor]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* V. 43(12 Suppl), p. 1.589-1.595, 1998.

PANG, Z.P.; SUDHOF, T.C. Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* V. 22, p. 496–505, 2010.

PARDAL, P.P.; PARDAL, J.S.; GADELHA, M.A.; RODRIGUES, L.S.; FEITOSA, D.T.; PRUDENTE, A.L.; FAN, H.W. Envenomation by *Micrurus* coral snakes in the Brazilian Amazon region: report of two cases. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* V. 52(6), p. 333-7, 2010.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P.J. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist.* V. 10, p. 53-62, 2004.

PEREIRA-FILHO, G.A. Composição Faunística, Ecológica e História Natural de uma Taxocenose de Serpentes de Floresta Atlântica da Paraíba, Brasil. Dissertação de mestrado: UFPB/João Pessoa, 2007, 156 p.

PÉREZ-OTAÑO, I.; EHLERS, M.D. Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci.* V. 28 (5), p. 229–38, 2005.

PETERSON, M.E. Snake bite: Coral Snakes. *Clinical Techniques in Small Animal Practice,* V. 21, p. 183-186, 2006.

PETROFF, O.A. GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist.* V. 8(6), p. 562-73, 2002.

PINHEIRO, P.S.; MULLE, C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanism of action. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 9(6), p. 426-436, 2008.

PLATT, S.R. The role of glutamate in central nervous system health and disease- A review. *The Veterinary Journal.* V. 173, p. 278-286, 2007.

POSSANI, L.D.; ALAGÓN, A.C.; FLETCHER JR., P.L.; VARELA, M.J.; JULIÁ, J.Z. Purification and Characterization of a Phospholipase A₂ from the Venom of the Coral Snake *Micrurus fulvius microgalbineus* (Brown and Smith). *Journal Biochemistry.* V. 179, p. 603-06, 1979.

POUGH, F.H.; HEISER, J.B.; McFARLAND, W.N. A vida dos vertebrados, 2 ed. São Paulo: *Atheneu*, 1999.

QIAN, J.; SAGGAU, P. Presynaptic inhibition of synaptic transmission in the rat hippocampus by activation of muscarinic receptors: involvement of presynaptic calcium influx. *Br. J. Pharmacol.* V. 122, p. 511–519, 1997.

RADCLIFFE, K.A.; DANI, J.A. Nicotinic Stimulation Produces Multiple Forms of Increased Glutamatergic Synaptic Transmission. *The Journal of Neuroscience.* V. 18(18), p. 7075-7083, 1998.

RENO, L.A.; ZAGO, W.; MARKUS, R.P. Release of [(3)-H]-L-glutamate by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in rat cerebellar slices. *Neuroscience.* V. 124(3), p. 647-653, 2004.

RETZ, K.C.; YOUNG, A.C.; COYLE, J.T. Glutamate stimulation of ⁴⁵Ca uptake by rat striatal synaptosomes. *Euro. J. Pharmacol.* V. 79 (3-4), p. 319-22, 1982.

RIGONI, M.; SCHIAVO, G.; WESTON, A.N.; CACCIN, P.; ALLEGRINI, F.; PENNUTO, M.; VALTORTA, F.; MONTECUCCO, C.; ROSSETTO, O. Snake presynaptic neurotoxins with phospholipase A₂ activity induce punctate swellings of neurites and exocytosis of synaptic vesicles. *Journal of Cell Science.* V. 117, p. 2561-2570, 2004.

ROSENMUND, C.; STERN-BACH, Y.; STEVENS, C.F. The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science.* V. 280(5369), p. 1596-9, 1998.

ROSSO, J.P.; VARGAS-ROSSO, O.; GUTIÉRREZ, J.M.; ROCHAT, H.; BOUGIS, E.P. Characterization of alpha-neurotoxin and phospholipase A₂ activities from *Micrurus* venoms. *Eur. J. Biochem.* V. 238, p. 231-239, 1996.

ROZE, J.A. New world coral snakes (Elapidae): a taxonomic and biological summary. *Mem. Inst. Butantan.* V. 46, p. 305-338, 1983.

SATAKE, S.; SAITOW, F.; YAMADA, J.; KONISHI, S. Synaptic activation of AMPA receptors inhibits GABA release from cerebellar interneurons. *Nat Neurosci.* V. 3(6), p. 551-558, 2000.

SATAKE, S.; SONGS, S.Y.; CAO, Q.; SATOH, H.; RUSAKOV, D.A.; YANAGAWA, Y.; LING, E.A.; IMOTO, K., KONISHI, S. Characterization of AMPA receptors targeted by the climbing fiber transmitter mediating presynaptic inhibition of GABAergic transmission at cerebellar interneuron - Purkinje cell synapses. *J. Neurosci.* V. 26(8), p. 2278-2289, 2006.

SAVAGE, J.M.; SLOWINSKI, J.B. The colouration of the venomous coral snakes (family Elapidae) and their mimics (families Aniliidae e Colubridae). *Biological Journal of the Linnean Society.* V. 45, p. 235-254, 1992.

SAZIMA, I.; ABE, A. S. Habits of five Brazilian snakes with coralsnake pattern including a summary of defensive tactics. *Stud. Neotrop. Faun. Environm.* V. 26(3), p. 159-164, 1991.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochem. Biophys. Acta.* V. 1761, p. 1246-59, 2006.

SCHIMITZ, D.; MELLOR, J.; NICOLL, R.A. Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science.* V. 291(5510), p. 1972-1976, 2001.

SERVENT, D.; WINCKLER- DIETRICH, V.; HU, H.Y.; KESSLER, P.; DREVET, P.; BERTRAND, D.; MÉNEZ, A. Only snake curaremimetic toxins with fifth disulfide Bond have high affinity for the neuronal α -7 nicotinic receptor. *J. Biol. Chem.* V. 272 (39), p. 24279-24286, 1997.

SLOWINSKI, J.S.; KNIGHT, A.; ROONEY, A.P. Inferring species trees from genes trees: A phylogenetic analysis of the Elapidae (Serpentes) based on the amino acid sequences of venom proteins. *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 10(1), p. 349-362, 1997.

SOERENSEN, B. Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento. São Paulo: Atheneu, 2000.

SONSALLA, P.K.; ALBERS, D.S.; ZEEVALK, G.D. Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids*. V. 14, p. 69-74, 1998.

STOKER, K.F. Composition of snake venom. In: Medical use of snake venom proteins. Stocker, K. F., *CRC Press, Florida*. p. 33-57, 1990.

STRONG, P.N.; GOERKE, J.; OBERG, S.G.; KELLY, R.B. Beta-Bungarotoxin, a pre-synaptic toxin with enzymatic activity. *PNAS*. V. 73 (1), p. 178-182, 1976.

SU, M.J.; CHANG, C.C. Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A₂ activity (beta-bungarotoxin, taipoxin, crotoxin). *Toxicon*. V. 22(4), p. 631-640, 1984.

SUDHOF, T.C.; ROTHMAN, J.E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*. V. 323, p. 474–7, 2009.

TAKAMORI, S. VGLUTs: “exciting” times for glutamatergic research? *Neurosci. Res*. V. 55, p. 343-51, 2006.

TAMBOURGI, D.V.; SANTOS, M.C.; FURTADO, M.F.D.; FREITAS, M.C.W.; SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. *Brazilian Journal Pharmacology*. V. 112, p. 723-27, 1994.

TANAKA, G.D.; FURTADO, M.F.D.; PORTARO, F.C.V.; SANT`ANNA, O.A.; TAMBOURGI, D.V. Diversity of *Micrurus* Snake Species Related to their Venom Toxic Effects and the Prospective of Antivenom Neutralization. *PLoS. Negl. Trop. Dis*. V. 4(3), p. e622, 2010.

TEDESCO, E.; RIGONI, M.; CACCIN, P.; GRISHIN, E.; ROSSETO, O.; MONTECUCCO, C. Calcium overload in nerve terminals of cultured neurons intoxicated by alpha-latrotoxin and snake PLA₂ neurotoxins. *Toxicon*. V. 54, p. 138-144, 2009.

TSIEN, J.Z.; HUERTA, P.T.; TONEGAWA, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*. V. 87, p. 1327-38, 1996.

VITAL-BRAZIL, O. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo*. V. 29 (3), p. 119-126, 1987.

WEILER, I.J.; GREENOUGH, W.T. Metabotropic glutamate receptors trigger postsynaptic protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* V. 90 (15), p. 7168-71, 1993.

WIEPRECHT, T.; APOSTOLOV, O.; BEYERMANN, M.; SEELIG, J. Interaction of a mitochondrial presequence with lipid membranes: role of helix formation for membrane binding and perturbation. *Biochemistry*. V. 19 (39), p. 15297-305, 2000.

WILENSKY, R.L.; SHI, Y.; MOHLER, E.R 3rd.; HAMAMDZIC, D.; BURGERT, M.E.; LI, J.; POSTLE, A.; FENNING, R.S.; BOLLINGER, J.G.; HOFFMAN, B.E.; PELCHOVITZ, D.J.; YANG, J.; MIRABILE, R.C.; WEBB, C.L.; ZHANG, L.; ZHANG, P.; GELB, M.H.; WALKER, M.C.; ZALEWSKI, A.; MACPHEE, C.H. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A₂ reduces complex coronary atherosclerotic plaque development. *Nat. Med.* V. 14(10), p. 1059-66, 2008.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; HARRISON, R.; WARRELL, D.A.; WHITE, J. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet*. V. 375, p. 89-91, 2010.

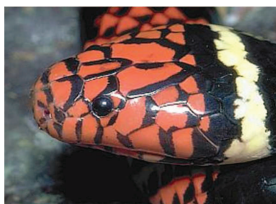
WILTON, D.C.; WAITE, M. Phospholipases. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. V. 11, p. 291-313, 2002.

YANG, C.C. Structure-function relationship of phospholipase A₂ from snake venoms. *J. Toxicol.* V. 13, p. 125-77, 1994.

ZELLERS, E.A. Enzymes of Snake Venoms and their Biological Significance. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology.* V. 8, ed F. F. Nord, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2006.

ZHENG, K.; SCIMEMI, A.; RUSAKOV, D.A. Receptor actions of synaptically released glutamate: the role of transporters on the scale from nanometers to microns. *Biophys. J.* V. 95, p. 4584–96, 2008.

ZUG, G.R. Herpetology: An introductory biology of amphibians and reptiles. San Diego: Academic Press, 1993.



Anexos

RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

MONTANDON, A.C.; DONATO, M.F.; LOMEIO, R.S.; FREITAS, A.C.N.; SANTOS, D.; PIMENTA, A.C.; DE LIMA, M.E. A peçonga da serpente *Micrurus lemniscatus* (coral brasileira), e alguns de seus componentes isolados induzem liberação de L-glutamato no SNC de rato. **XX Encontro de Pesquisa em Fisiologia e Farmacologia. Belo Horizonte/MG, 2012.**

DONATO, M.F.; MONTANDON, A.C.; FREITAS, A.C.N.; FERREIRA, A.F.; SANDOVAL, M.R.L.; CHAVES, M.N.; DE LIMA, M.E. The *Micrurus lemniscatus* venom induces L-glutamate release from rat brain synaptosomes and shows toxicity to cultured neurons. **XLII Encontro Annual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq. Foz do Iguaçu/PR, 2013.**

The *Micrurus lemniscatus* Venom induces L-glutamate Release from Rat Cerebro Cortical Synaptosomes and Shows Toxicity to Cultured Neurons

Donato, M.F.¹; Montandon, A.C.¹; Freitas, A.C.N.²; Ferreira, A.F.²; Sandoval, M.R.L.³; Chaves, M.M.² and De Lima, M.E.².

¹Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, ³Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. ³Laboratório de Farmacologia. Instituto Butantan, SP, Brasil.

Introduction: Human envenomations by coral snakes result in severe neurotoxicity. The accident may lead to death by respiratory paralysis. The treatment includes specific antivenom produced against *M. corallinus* and *M. Frontalis venoms*. Studies on the central neurotoxic effects of these venoms are scarce. This study proposed to evaluate the toxic effect induced by crude venom (CV) of *M. lemniscatus* on cultured hippocampal neurons and in a Neuro-2A cells challenging with a commercial antivenom. We also investigated the effect of this venom on L-glutamate release in rat brain synaptosomes. **Material and Methods:** Crude venom (CV) and commercial antivenom were from FUNED (Belo Horizonte, Brazil). Hippocampal neurons culture was prepared from brain of Wistar neonatal rats. Neurons and Neuro-2A cells were treated with $1 \cdot 10^{-5} \mu\text{g}$ CV for 1, 3 and 24h. Neutralization assays with antivenom were made with $1 \mu\text{g}$ of CV and different concentrations of serum ($3 \cdot 10^{-3} \mu\text{L}$). Cell survival was quantified by MTT, Neutral red and fluorescence assays. Cerebrocortical synaptosomes were prepared, incubated with CV and L-glutamate release was quantified by a fluorescent assay. **Results and Discussion:** The CV shows toxicity to hippocampal neurons, in an independent concentration manner. The chronic assay (24h) showed cellular death with 1 and $10^{-2} \mu\text{g}$ CV, and acute assays show toxicity at lower concentrations. CV ($10^{-2} \mu\text{g}$) induced L-glutamate release in synaptosomes in a time-dependent manner. In Neuro-2A cells the CV promoted significant cell death ($1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}$) and in neutralization tests, the specific antivenom was capable to prevent 50% of the cellular death caused by CV. **Conclusions:** We conclude that the *M. lemniscatus* CV promoted significant central neurons cell death in a not concentration-dependent manner. We suggest that neurotoxicity could be associated with L-glutamate release. The antivenom was ineffective to completely neutralize the neurotoxic effect of crude venom pointing out a challenge to be solved in envenoming by *Micrurus*.

Key-words: *Micrurus lemniscatus*. Hippocampal neurons. Neurotoxicity. L-Glutamate Release. Antivenom.

Support: CAPES, CNPq, FAPEMIG, INCTTOX-Fapesp

A PEÇONHA DA SERPENTE *Micrurus lemniscatus* (CORAL BRASILEIRA), E ALGUNS DE SEUS COMPONENTES ISOLADOS INDUZEM LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO NO SNC DE RATO. 1 Montandon, Alessandra, 1 Donato, Micheline, 1 Lomeo, Rosângela, 2 Freitas, Ana Cristina, 2 Santos, Daniel, 2 Pimenta, Adriano, 2 De Lima, Maria Elena 1 Departamento de Fisiologia e Biofísica, 2 Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG, Belo Horizonte/MG-Brasil.

Introdução: No Brasil ocorrem anualmente cerca de 19 a 22 mil casos de acidentes ofídicos, sendo o gênero *Micrurus* sp., responsável por 0,5% deles. Estes acidentes apesar de raros são extremamente severos e podem levar à morte por parada respiratória. As manifestações clínicas do envenenamento decorrem principalmente, da atividade neurotóxica da peçonha. Isto se dá pela ação das α -neurotoxinas (MM= 6-8 kDa) presentes na peçonha, que atuam no sistema nervoso periférico causando o bloqueio progressivo dos receptores nicotínicos para acetilcolina, na junção neuromuscular. Entretanto, apesar de serem descritos sintomas relacionados a perturbações no sistema nervoso central (SNC) pouco se sabe sobre os mecanismos de indução desta neurotoxicidade. Estudos recentes mostram que fosfolipases A₂ (MM= 11-16 kDa), um dos componentes mais abundantes desta peçonha, estão diretamente relacionadas à degeneração neuronal e liberação de aminoácidos neurotransmissores, como o glutamato.. Adicionalmente, poucos estudos vêm sendo conduzidos com os componentes isolados da peçonha dessas serpentes. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da peçonha bruta e das frações isoladas da serpente *Micrurus lemniscatus* sobre a liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos.

Métodos e Resultados: A peçonha bruta liofilizada de *M. lemniscatus* (10 mg), foi cedida pela Fundação Ezequiel Dias, MG-Brasil e fracionada por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna semi-preparativa de fase reversa Discovery C18 (25x1 cm, 5 μ m), eluída por um gradiente segmentado de acetonitrila (0-100% por 129 min) em 0,1% de ácido trifluoracético (TFA), a 4mL/min, sendo coletado 1mL/tubo. A solução de equilíbrio era composta de 100% de água e 0,1% de TFA. Foram obtidas 34 frações e suas massas moleculares analisadas por espectrometria de massas MALDI-TOF. Para o preparo dos sinaptosomas, ratos machos adultos (200-300 g) foram decapitados, os cérebros retirados e o córtex dissecado. Sinaptosomas cérebro-corticais foram incubados nas seguintes concentrações: peçonha bruta: $8 \cdot 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-2}$ e $6 \cdot 10^{-2}$ μ g/ μ l por 1h; frações: $8 \cdot 10^{-3}$ μ g/ μ l por 1:30 min. Foram analisadas 22 frações isoladas da peçonha (MM= 2-26 kDa). A liberação de L-glutamato foi analisada por método fluorimétrico. Os resultados mostraram que a peçonha bruta e as frações 17,18, 20, 22, 23, 24, 26 e 27 de *M. lemniscatus* aumentaram a liberação de L-glutamato dos sinaptosomas de maneira tempo mas não dose-dependente. Estas frações apresentam massas moleculares na faixa de 12-14 kDa.

Conclusões: A peçonha bruta da serpente *M. lemniscatus* e algumas de suas frações isoladas foram capazes de induzir a liberação de L-glutamato em

sinaptosomas cérebro-corticais de rato. As toxinas responsáveis por esta liberação possuem massas moleculares correspondentes às de fosfolipases A2. Uma das causas da neurotoxicidade central do envenenamento por *Micrurus* sp. pode estar relacionada à excitotoxicidade causada pelo glutamato, ocasionando a morte neuronal.

Apoio: CAPES, CNPq, FAPEMIG, INCTTOX.

