

Peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus lemniscatus* (Roze, 1967), caracterização parcial das propriedades bioquímicas e farmacológicas: neurotoxicidade e atividade pré-sináptica de toxinas três-dígitos.

## **TESE DE DOUTORADO**

**Micheline Freire Donato**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Elena de Lima Perez Garcia**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Christopher Kushmerick**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte – 2014

Micheline Freire Donato

Peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus lemniscatus* (Roze, 1967), caracterização parcial das propriedades bioquímica e farmacológicas: neurotoxicidade e atividade pré sináptica de toxinas três-dígitos.

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências - Fisiologia e Farmacologia.

Área de concentração: Fisiologia

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Elena de Lima Perez Garcia**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Christopher Kushmerick**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte – 2014

43

Donato, Micheline Freire.

Peçonha da serpente *Micrurus l. lemniscatus* (Roze, 1967), caracterização parcial das propriedades bioquímica e farmacológicas: neurotoxicidade e atividade pré sináptica de toxinas três-dígitos [manuscrito] / Micheline Freire Donato. - 2014.

224 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Maria Elena de Lima Perez Garcia. Co-orientador: Christopher Kushmerick.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Fisiologia e Biofísica.

1. *Micrurus lemniscatus* - Teses. 2. Neurotoxicologia - Teses. 3. Neurônio hipocampais. 4. Receptores glutamatérgicos. 5. Atividade pré-sináptica de toxinas. 6. Canais de cálcio - Teses. 7. Fisiologia - Teses. I. Perez- Garcia, Maria Elena de Lima. II. Kushmerick, Christopher. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Fisiologia e Biofísica. IV. Título.

CDU: 612

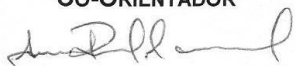
**"PEÇONHA DA SERPENTE *MICRURUS L. LEMNISCATUS* (ROZE, 1967), CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS: NEUROTOXICIDADE E ATIVIDADE PRÉ-SINÁPTICA DE TOXINAS TRÊS-DÍGITOS"**

**MICHELINE FREIRE DONATO**

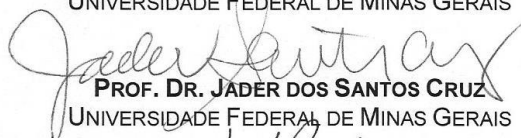
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **20 de outubro de 2014**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



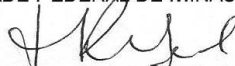
**PROF. DR. CHRISTOPHER KUSHMERICK**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CO-ORIENTADOR



**PROF. DR. ANDRÉ RICARDO MASSENSINI**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROF. DR. JADER DOS SANTOS CRUZ**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**DR.ª MARIA REGINA LOPES SANDOVAL**  
INSTITUTO BUTANTAN



**PROF. DR. WAGNER FERREIRA DOS SANTOS**  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



**PROF.ª DR.ª MARIA ELENA DE LIMA PEREZ GARCIA**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 20 de outubro de 2014**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, no Núcleo de Estudo de Estrutura e Função de Biomoléculas do Departamento de Bioquímica e Imunologia e Laboratório de Eletrofisiologia Celular, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Órgãos financiadores: CNPq, INCTTOX-FAPESP, Fapemig, CAPES, FUNDEP, ICB-UFMG.

*"Tudo que está no plano da realidade já foi sonho um dia."*

*"Uma vez que tenhas experimentado o voo, caminharás pela terra com os olhos postos no céu porque já tinhas lá estado, e queres lá voltar."*

*Leonardo da Vinci*

*Ao Criador do Universo, que a cada manhã nos proporciona o sol que ilumina os nossos dias fornecendo a energia que movimenta todas as coisas. As plantas, os animais, átomos e as moléculas, tudo vibra! Na dança mágica transcendental... e isso é a grande essência da Vida!*

*Aos meus Pais pela grandeza e plenitude do Amor, na essência da palavra, que é o fio condutor da Vida, do entusiasmo e da alegria de viver;*

*A minha filha Gabriella Freire, 'minha menina-moça', cheia de sonhos e sensibilidade... prova de que a Vida é repleta de transformações, metabolismo e doçura;*

*À Ciência e a Todos que laboriosamente vibram no Cosmos todas as invenções e descobertas antes mesmo delas se tornarem reais, e como num passe de mágica, cheio de fofato e alquimia, se debruçam sobre as vidrarias e reagentes tornando o mundo imaginário em mundo real.*

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Maior dos agradecimentos à mestra e amiga professora Dra. **Maria Elena de Lima** pela grande acolhida à casa dos “peçonhentos”, apresentou-me com muita simplicidade e nobreza o universo toxinológico. Por me fazer acreditar na altivez do pensamento, pela oportunidade de ser sua discípula, pelas incontáveis e sólidas lições e, sobretudo, pelo grande exemplo de amor à ciência e ao trabalho.

Ao professor e mestre Dr. **Christopher Kushmerick** pelos ensinamentos eletrofisiológicos e contribuições intelectuais, por mostrar-me que a ciência é muitas vezes, algo artesanalmente feito com criatividade, detalhe e esmero.

A **Fundação Ezequiel Dias** (FUNED), pelo fornecimento da peçonha bruta, um especial agradecimento ao Sr. **Maurício Santos** (Diretoria Industrial) e **Rômulo Toledo** (Serviço de Animais Peçonhentos).

Aos membros da banca professores Dr. **Wagner dos Santos** (USP-Ribeirão Preto), Dra **Maria Regina Sandoval** (Instituto Butantan), Dr. **André Masenssini** por aceitarem partilhar seus conhecimentos, contribuindo intelectualmente nesse trabalho.

À professora Dra. **Míriam Chaves** por ter disponibilizado as células de linhagem Neuro-2A, pelas produtivas discussões acerca dos mecanismos de toxicidade celulares e pela abertura e acesso ao seu laboratório.

Ao Dr. **Marcelo Diniz** e a MsC. **Ana Valentim**, da Fundação Ezequiel Dias, pelo uso do HPLC e laboratório, além das conversas sobre os métodos cromatográficos.

À Dra. **Maria Regina Sandoval**, do Instituto Butantan, pela carinhosa acolhida em seu laboratório, pelos ensinamentos de cultura primária de neurônios hipocâmpais, por partilhar do magnífico universo molecular das toxinas de *Micrurus lemniscatus*;

Ao amigo e colaborador professor Dr. **Adriano Pimenta**, que me proporcionou tantas alegrias acadêmicas, desde a minha vinda pela primeira vez à UFMG (em 2007) trabalhar com as toxinas “*three-fingers*” de *Micrurus ibiboboca* (coral nordestina), me aceitando em seu laboratório e embarcando nesse desafio; pelos primorosos conhecimentos de proteômica e, pela confiança em me entregar o seu “lar paradisíaco” em Lagoa Santa/MG durante a sua estadia de pós-doutoramento no Canadá.

Ao professor e amigo Dr. **Jáder Cruz**, conterrâneo nordestino e grande eletrofisiologista, que entre cafés com prosas e visitas acadêmicas à “cidade onde o sol nasce primeiro” me fez sonhar e acreditar que a UFMG seria algo possível, e por este tenho grande admiração!

Aos professores do Depto de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, em especial ao Dr. **Dawidson Gomes**, pelas análises críticas e tranquilidade durante o desespero das análises de liberação de glutamato, pelos ensaios preliminares de via de morte celular; à Dra **Fabíola Ribeiro**, pela solicitude e disponibilização do microscópio de fluorescência e materiais de cultivo celular; ao Dr. **Rodrigo Resende** pela disponibilização de equipamentos e livre acesso em seu laboratório, algumas vezes com



pitadas de chocolate; à Dra **Santuza Teixeira**, pela confiança em entregar-me as chaves de seu laboratório para o uso da ultracentrífuga onde passei altas horas da madrugada e finais de semana debruçada sobre os sinaptosomas.

Aos professores do Depto de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG, em especial ao Dr. **Steyner Côrtes** e Dr. **Jorge Pesquero** pelas relevantes contribuições e direcionamento do trabalho durante o exame de qualificação; Dra. **Luciene Vieira**, pelas bem-vindas discussões sobre sinaptosoma; Dra. **Lígia Naves** e Dr. **Miguel Lopes** pelas conversas científicas durante as reuniões de laboratório, pelo auxílio na formação acadêmica; Dr. **Ígor Dimitri**, pelos bloqueadores gabaérgicos; à Dra. **Sílvia Guatimosim** por disponibilizar a infraestrutura de cultivo celular de seu laboratório e servindo-me de inspiração como exemplo de orientadora que é.

Aos amigos que puseram a “mão-na-massa” e fizeram as coisas acontecerem: **Anderson Santos**, pelos grandes auxílios nas madrugadas e finais de semana, por queimar muito fosfato nas nossas discussões e execuções experimentais regadas ao chocolate e torrão; MsC. **Andréia Ferreira**, pelo auxílio com as culturas de Neuro-2A; à MsC. **Juliana Doria**, pelo auxílio com os ensaios de fluorescência; à MsC. **Carolina Nunes**, pelos ensinamentos e preparos sinaptosomais; à MsC. **Naiara Silveira** e **Aline Medrado**, pelo auxílio nas culturas de neurônios DRG e ensinamentos eletrofisiológicos; **Hugo Huth**, pelos experimentos preliminares de toxicidade em células tumorais e MsC. **Arthur Dantas**, pelos experimentos preliminares de vias apoptóticas e necróticas; MsC. **Rosângela Lomeo**, pelas discussões produtivas sobre sinaptosomas e experimentos colinérgicos; aos queridos e grandes amigos totalmente “old school”, pós-docs: Dr. **Daniel Santos**, pelo auxílio nas análises de massas, sequenciamento proteico e incontáveis discussões; Dr. **Rodrigo Ferreira**, pelas análises iniciais de massas; Dra. **Catherine Rupert**, uma francesa muito elegante, que tanto me ensinou a enxergar o mundo com mais profissionalismo, pelas discussões de vias de sinalização e experimentos com células tumorais, além é claro de boas risadas.

À Dra **Fernanda Torres**, pelas correções, figuras, madrugadas de discussões da tese, trabalho árduo, contudo muito mais prazeroso e alegre quando compartilhado com essa grande amiga que encontrei nesse plano astral. E como nos parecemos! Quantas bobagens falamos que são motivos de grandes risadas! Tenho a plena certeza que essa amizade nós iremos carregar para sempre!

Aos meus alunos e ex-alunos de iniciação científica, **Arnaldo Figueiredo Jr.**; **Abraham Landry** e em especial a aluna querida, hoje doutoranda **Ana Cristina Freitas**, por terem feito parte dessa grande história de minha vida, pela paciência e resiliência nos momentos de tamanho desânimo e cansaço, por me terem feito partilhar do que há de mais valioso no mundo acadêmico: o conhecimento, a criatividade, ousadia e as “perguntas”. Gratidão, com muito carinho!

Aos colaboradores “micruróides” Dra. **Paula Ciscotto** (UNA/MG); Dr. **Demetrius Araújo** (UFPB), orientador do mestrado; MsC **Alessandra Montandon**, MsC **Marcela Silva** e **Thiago Soares** (UFMG) por confiarem no meu trabalho e por também terem feito dele a própria história de cada um, pelas trocas de conhecimentos.

Aos técnicos, peças-chave para o funcionamento dos laboratórios: **Júlio César** (LVTA), **Jamil** (Enzimologia), **Rose** (Eletrocel) e **Narciso** (LAMEX), um agradecimento

carinhoso pelos sorrisos constantes e animadores nas horas difíceis, pela disponibilidade e ajudas braçais; ao bioterista **Sílvio**, pelos auxílios com os acasalamentos das ratas.

Aos funcionários das secretarias dos programas de Pós-graduação de Bioquímica e Imunologia e Fisiologia e Farmacologia, especialmente ao querido **Orlando** e a **Celise**; a **Cynthia**, **Nilda** e **Rodner**, que sempre facilitam as nossas vidas.

Aos colegas da CTIT/UFMG, pelos ensinamentos de propriedade intelectual durante estágio como analista de PI, “caracterizado por muito estresse, café e gargalhas”... em especial aos “chefes”, professor Dr. **Pedro Vidigal** e **Raissa de Luca** pela compreensão e confiança, e aos analistas (“hard work”) amigos lindos **Guilherme Leal**, **Rodrigo Lacerda**, MsC **Izabela Zeferino** MsC. **Flávia Reis** e Dra. **Maria do Carmo Miraglia**, como já dizíamos: “*missão dada é missão cumprida!*”.

Aos colegas do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (LVTA): **Juliana Cassoli**, **Pablo**, **Joaquim**, **Bruna**, **Natália**, **Luisa**, **Flávia**, **Clárisse**, **David**, **Rodrigo** e do Laboratório de Eletrofisiologia Celular (ELETROCEL), **Everton**, **Ricardo**, **Célio**, **Adriano**, **Wallace**, **Cibele**, **Mariana**, **Felipe**, **Pedro**, **Amanda**, **Sérgio**, **Marina**, pela amizade, alegria e pelos bons momentos.

A **Todos** da minha querida **família**, meu porto-seguro, que sempre me apoiou emocionalmente e financeiramente, especialmente cito alguns pela real importância na minha vida e na conclusão desse objetivo: Dra. **Marinalva Freire** (tia-madrinha, fonte de inspiração e motivação), **Sebastião Filho** (tio querido, fashion, exemplo de sucesso); **Marina Freire** (avó linda, exemplo de grande mulher); **Marinalda Freire** (minha mãe, meu grande amor, exemplo de luta e coragem).

Aos meus irmãos **Leonardo Victor** e **Vinícius Victor**, pelo carinho e amor; a minha madrastra **Vera Lúcia** pelo apoio e carinho e ao meu pai querido, **José Leonardo** pelas oportunidades e amor.

Aos meus queridos cães poodles: **Toy Ramones**, **Janis Joplin** e **Britney Spears**, pela companhia nas madrugadas e por me provarem que há uma real cumplicidade entre homens e animais.

Aos **animais experimentais**, os quais são essenciais ao crescimento e progresso da Ciência.

À **UFMG** e ao **Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia** pelo ensino gratuito e de excelência máxima no país, a **CAPES**, por financiar o meu trabalho e ao **INCT-Tox**, pelo fomento da pesquisa.

## ÍNDICE

<b>EPÍGRAFE</b> .....	<b>VII</b>
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>VIII</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XXII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XXVII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XXVIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 AS SERPENTES ELAPÍDICAS E O GÊNERO <i>Micrurus</i> sp.....	1
1.1.1 <b>O complexo <i>Micrurus lemniscatus</i></b> .....	3
1.2 ACIDENTES OFÍDICOS POR <i>Micrurus</i> sp. (FAMÍLIA ELAPIDAE).....	7
1.2.1 <b>Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos</b> .....	7
1.2.2 <b>Sintomatologia e Terapêutica dos acidentes por <i>Micrurus</i> sp</b> .....	13
1.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DAS PEÇONHAS DAS SERPENTES ELAPÍDICAS e de <i>Micrurus</i> sp.....	16
<b>1.3.1 Atividades farmacológicas promovidas pelas peçonhas das serpentes de <i>Micrurus</i> sp</b> .....	17
<b>1.3.2 Componentes bioquímicos presentes nas peçonhas das serpentes de <i>Micrurus</i> sp</b> .....	19
1.3.2.1 Fosfolipases A <sub>2</sub> secretórias (sPLA <sub>2</sub> ) das serpentes elapídicas.....	25
1.3.2.2 Toxinas Três-dígitos ou “ <i>Three-fingers toxins</i> ” (3-Ftx) .....	30
1.4. O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E A COMUNICAÇÃO SINÁPTICA QUÍMICA .....	37
1.4.1 <b>A neurotransmissão excitatória glutamatérgica e a sua modulação</b> .....	400
1.4.2 <b>Os papéis dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos na neurotransmissão central</b> .....	44
1.5 MECANISMOS MOLECULARES E CELULARES DA EXCITOTOXICIDADE E MORTE NEURONAL .....	48

1.5.1 Células Neuro-2A: uma linhagem com fenótipo neuronal para avaliação de citotoxicidade.....	49
1.5.2 Neurônios piramidais e granulares de hipocampo em cultura: modelos neuronais para avaliação de efeitos neurotóxicos.....	50
1.5.3 Sinaptosomas como modelo de avaliação da atividade pré-sináptica e excitotoxicidade.....	544
1.5.4 A participação do cálcio na neurotransmissão glutamatérgica e excitotoxicidade..	58
1.6 TOXINAS ANIMAIS: novos protótipos de fármacos?.....	60
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>64</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	64
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	64
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
3.1 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DA PEÇONHA BRUTA DA SERPENTE <i>Micrurus l. lemniscatus</i> .....	66
<b>3.1.1 Estratégia 1: Fracionamento unidimensional da peçonha bruta por Fase Reversa.....</b>	<b>66</b>
6	
<b>3.1.2 Estratégia 2: Fracionamento bidimensional da peçonha bruta por cromatografias de Troca Iônica e Fase Reversa (RPC).....</b>	<b>67</b>
<b>3.1.3 Estratégia 3: Fracionamento tridimensional da peçonha bruta por cromatografias de Troca Catiônica e duas Fases Reversas.....</b>	<b>67</b>
<b>3.1.4 Estratégia 4: Fracionamento bidimensional por cromatografias de Fase Reversa e Troca Aniônica.....</b>	<b>68</b>
3.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	68
3.3 SEQUENCIAMENTO N-TERMINAL POR DEGRADAÇÃO DE EDMAN .....	69
3.4 ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS PRIMÁRIAS .....	69
3.5 DOSAGENS DA PEÇONHA BRUTA, FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS E TOXINAS TRÊS-DÍGITOS DA SERPENTE <i>Micrurus l. lemniscatus</i> .....	69
3.6 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	70
3.7 CULTIVOS CELULARES .....	70
<b>3.7.1 Cultura celular de linhagem neuronal Neuro-2A.....</b>	<b>71</b>
<b>3.7.2 Cultura primária de neurônios piramidais de hipocampo de ratos neonatos ....</b>	<b>73</b>

3.8 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE BASAL.....	76
3.8.1 Ensaio de redução do MTT .....	76
3.8.2 Ensaio de captação do Vermelho Neutro.....	77
3.8.3 Ensaio de microscopia de fluorescência para determinação da viabilidade celular.....	80
0	
3.9 LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO EM SINAPTOSOMAS CÉREBRO-CORTICAIS DE RATOS.....	82
3.9.1 Obtenção dos sinaptosomas.....	82
3.9.2 Determinação da concentração das proteínas sinaptosomais.....	83
3.9.3 Avaliação da integridade sinaptosomal por dosagem da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).....	83
3.9.4 Liberação de L-glutamato .....	84
3.9.5 Curva de concentração de L-glutamato .....	85
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	85
3.11 DROGAS ANTAGONISTAS E AGONISTAS FARMACOLÓGICOS.....	86
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
4.1 FRACIONAMENTO DA PEÇONHA BRUTA DA SERPENTE <i>Micrurus l. lemniscatus</i> E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ALGUMAS DE SUAS TOXINAS. ....	87
4.1.1 Cromatografia de Fase Reversa- Estratégia 1.....	87
4.1.2 Espectrometria de massas das frações obtidas na cromatografia de Fase Reversa.....	89
4.1.3 Cromatografias de Troca Catiônica e Fase Reversa.....	95
4.1.4 Determinação da estrutura primária e busca por similaridade em banco de dados das toxinas purificadas da peçonha bruta.....	97
4.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DA REDUÇÃO DO MTT PROMOVIDA PELA PEÇONHA BRUTA E DE SUAS FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS. ....	101
4.2.1 Avaliação da citotoxicidade promovida pela peçonha bruta em células de linhagem neuronal Neuro-2A.....	101
4.2.1.1 Varredura das frações isoladas da peçonha bruta com potencial citotóxico, em células de linhagem neuronal Neuro-2A .....	102

<b>4.2.2 Avaliação da citotoxicidade promovida pela peçonha bruta em cultura de neurônios hipocampais de ratos neonatos.....</b>	<b>105</b>
<b>4.2.3 Efeito de drogas que atuam no sistema colinérgico, sobre a citotoxicidade promovida pela peçonha bruta em cultura de neurônios hipocampais de ratos neonatos.....</b>	<b>107</b>
<b>4.2.4 Efeito de drogas que atuam no sistema glutamatérgico, sobre a citotoxicidade promovida pela peçonha bruta em cultura de neurônios hipocampais de ratos neonatos.....</b>	<b>109</b>
<b>4.2.5 Efeito da tetrodotoxina, um bloqueador de canais para sódio dependentes de voltagem, sobre a citotoxicidade promovida pela peçonha bruta em cultura de neurônios hipocampais de ratos neonatos.....</b>	<b>110</b>
<b>4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PROMOVIDA PELA PEÇONHA BRUTA EM EM CULTURA DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS DE RATOS NEONATOS POR CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO .....</b>	<b>112</b>
<b>4.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE/MORTE CELULAR PROMOVIDA PELA PEÇONHA BRUTA EM CULTURA DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS DE RATOS NEONATOS, POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....</b>	<b>113</b>
<b>4.5 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO PROMOVIDA PELA PEÇONHA BRUTA, SUAS FRAÇÕES E TOXINAS PURIFICADAS .....</b>	<b>115</b>
<b>4.5.1 Liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato, induzida pela peçonha bruta (PB), por frações semi-puras e pela toxina MI 7294_NTX .....</b>	<b>115</b>
4.5.1.1 Controle da viabilidade sinaptosomal pela determinação da atividade da enzima lactado desidrogenase (LDH).....	117
4.5.1.2 Liberação de L-glutamato - Controles.....	117
4.5.1.3 Liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos induzida pela Fração 22 é concentração-depende .....	119
4.5.1.4 Investigação da participação do cálcio mediado por canais iônicos na liberação de L-glutamato induzida pela Fração 22 .....	121
4.5.1.5 Efeito de quelantes de cálcio na liberação de L-glutamato induzida pela Fração 22.....	125
4.5.1.6 Efeito de bloqueadores dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos induzida pela Fração 22.....	127
4.5.1.7 Contribuição efetiva dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos de NMDA e AMPA/Cainato na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos induzida pela Fração 22.....	129

4.5.1.8 Efeito da variação do potencial de membrana na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos induzida pela Fração 22.....	131
4.5.1.9 Liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos induzida pelas toxinas MI7294_NTX e MI7256_NTX isoladas da Fração 22.....	133
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>134</b>
5.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA PEÇONHA, FRAÇÕES E TOXINAS ISOLADAS DA SERPENTE <i>Micrurus l. lemniscatus</i> .....	134
5.2 ESTUDOS DE NEUROTOXICIDADE E EXCITOTOXICIDADE PROMOVIDOS PELA PEÇONHA BRUTA, FRAÇÕES E TOXINAS MI7294_NTX E MI7256_NTX.....	148
8	
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>162</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>166</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>167</b>

## ABSTRACT

Accidents with snakes are a serious public health problem and were included as “neglected tropical diseases” by the World Health Organization (WHO). *Micrurus sp* is responsible for only 0.5% of the snake accidents. Clinical manifestations of envenoming by this snake consist primarily of the neurotoxic activity in the peripheral nervous system, mainly by the action of the three-finger toxins (3-Ftx) (6-8 KDa), present in the venom, that cause progressive blockade of nAChR, at the motor endplate. Previous studies showed that  $\beta$ -neurotoxins (phospholipase A<sub>2</sub>) isolated from elapidic venoms, including coral snakes, induce cortical neurons death and promote glutamatergic excitotoxicity, causing neuronal degeneration. L-glutamate, the main excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS), when released in excess induces  $[Ca^{2+}]_i$  increase through the activation of ionotropic glutamate receptors, mainly post-synaptic NMDA receptors. Moreover, in pathological conditions as epilepsy and brain ischemia, there is a massive release of glutamate, leading to neurotoxicity. Although some symptoms associated to disorders in the CNS related with three-finger toxins have been described, little is known about their mechanisms of neurotoxicity. In the present PhD thesis, we proposed to evaluate the neurotoxic effects of *M. lemniscatus* crude venom and its fractions obtained through RPC-HPLC on neuroblastoma cells (Neuro-2A), using MTT assays, after 24 hours of exposure. We observed that the crude venom (in a dose-dependent manner) and most of its fractions caused toxicity (40-80 %). In comparison, hippocampal neurons from newborn rats (P<sub>0</sub>-P<sub>5</sub>) were treated with the crude venom, at different concentrations ( $5 \times 10^{-5}$  –  $50 \times 10^{-1}$   $\mu$ g/mL) and at different times (1, 3 and 24 h). Neurotoxicity was observed after 3 hours of exposure. Fluorescence assays with calcein-AM and 1-homodimer ethidium confirmed this result, when neurons were exposed for 24 h. We investigated the possible pharmacological targets involved in neurotoxicity of the crude venom. Our results indicated that NMDA and nACh receptors were involved in the toxic effects. These effects were also observed for fraction 22 (F22). The venom, fraction F22, as well as two 3Ftxs (MI7294\_NTX and MI7256\_NTX) increased L-glutamate release in rat cortical brain synaptosomes. This release was time and concentration-dependent, in the case of the venom and F22. The contribution of N, L and P/Q calcium channels, ionotropic glutamatergic receptors (NMDA and AMPA/kainate), as well as the external and internal calcium concentration



(evaluated using calcium chelators, EGTA and BAPTA-AM) was also evaluated. The results showed that calcium influx is involved in the L-glutamate release promoted by F22, and that this effect was abolished in the presence of glutamate ionotropic antagonists. These studies could lead to a better understanding of the neurotoxic effects of *Micrurus lemniscatus* venom on the CNS and showed for the first time the pre-synaptic activity of three-finger toxins.

**Keyword:**– *Micrurus lemniscatus* – neurotoxicity - Neuro-2A cells – hippocampal neurons – cortical brain synaptosomes – L-glutamate release – Ca<sub>v</sub> channels N, L and P/Q types - AMPA/kainate and NMDA receptors - presynaptic activity - three-finger toxins.

**Financial support:** CAPES, CNPq, INCTTOX. Special thanks to FUNED for providing the snake venom.

## RESUMEN

Los accidentes con serpientes son serios problemas de salud pública, siendo incluidos como enfermedades tropicales negligenciadas por la OMS (Organización Mundial de la Salud). Accidentes con *Micrurus sp.* sólo corresponden al 0,5% del total de accidentes con serpientes. Las manifestaciones clínicas del envenamamiento con esa serpiente resultan primariamente de una neurotoxicidad activa en el sistema nervioso periférico, principalmente por la acción de las toxinas tres- dígitos (3-Ftx) (6-8 KDa) presentes en esa ponzoña, provocando un progresivo bloqueo de receptores nicotínicos (nAChR) de la placa motora. Algunos estudios muestran que las  $\beta$ -neurotoxinas (tipo fosfolipasas A<sub>2</sub>) aisladas de ponzoñas elapídicas, incluyendo serpientes corales, inducen muerte en neuronios corticales por promover excitotoxicidad glutamatérgica. El L-glutamato, principal neurotransmisor excitatorio en el SNC (sistema nervioso central) cuando liberado en exceso induce un aumento del  $[Ca^{2+}]_i$  por activación de receptores glutamatérgicos, principalmente del tipo NMDA postsináptico. Por lo tanto, en condiciones patológicas como epilepsia e isquemia cerebral, hay una maciza liberación de glutamato, llevando a la neurotoxicidad. Aunque los síntomas asociados con las desórdenes en el SNC relatadas a las toxinas 3-Ftx ha sido descritos, poco se sabe respecto a dicho mecanismo de neurotoxicidad. En el presente estudio, nosotros propusimos evaluar los efectos neurotóxicos de la ponzoña bruta de la serpiente *M. lemniscatus* y de las fracciones obtenidas por RPC-HPLC, en células de neuroblastoma (Neuro-2A) por ensayo de MTT, tras 24 horas de exposición. Fue observado que la ponzoña bruta, y muchas de sus fracciones, de manera dose-dependiente, causó toxicidad (40-80 %). Para comparación, neuronios hipocampales de ratones neonatos (P<sub>0</sub>-P<sub>5</sub>) fueron tratados con el veneno crudo en distintas concentraciones ( $5 \times 10^{-5}$  –  $50 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/mL}$ ), tiempos distintos de exposición (1, 3 y 24 h). Se observó que dicha neurotoxicidad ocurrió tras 3 h de exposición. Ensayos de fluorescencia con calceína-AM y homodímero-1 de etidio confirmaron esos resultados cuando los neuronios fueron expuestos por 24 horas. Investigamos aún los posibles blancos farmacológicos envueltos en la neurotoxicidad del veneno crudo. Los resultados indicaron que los receptores glutamatérgicos y nicotínicos del tipo NMDA y nAChR, respectivamente están envueltos en los efectos tóxicos. Ese efecto fue observado también para la fracción 22 (F22) y otras. El veneno crudo, la F22, como también dos toxinas 3-Ftx (MI7294\_NTX y MI7256\_NTX) indujeron el aumento de la liberación de L-glutamato en

sinaptosomas cerebros corticales de ratóns. Analizando los albos farmacológicos envueltos en la toxicidad de esas moléculas, los resultados mostraron que el influjo de calcio y el calcio intracelular están envueltos en la liberación de L-glutamato promovida por F22. Dicho efecto fue abolido en la presencia de los antagonistas ionotrópicos glutamatérgicos. Esos estudios pueden llevar a un mejor entendimiento de los efectos neurotóxicos del veneno crudo de *Micrurus lemniscatus* en el SNC así como revela por primeira vez la actividad pre sináptica de una toxina tres-dígitos.

**Palabras claves:** toxinas tres-dígitos- *Micrurus lemniscatus*- neurotoxicidad- células Neuro-2A- neuronios hipocampales- sinaptosomas cerebro corticales- liberación de L-glutamato – canales del calcio - receptores AMPA/Cainato e NMDA – actividad pre sináptica.

**Suporte financeiro:** CAPES, CNPq, INCTTOX. Un agradecimiento especial a la FUNED por la donación del veneno crudo

## RESUMO

Os acidentes com serpentes são sérios problemas de saúde pública, sendo incluídos como doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). As serpentes *Micrurus* sp. são popularmente conhecidas no Brasil como “cobras corais” e fazem parte do grupo das serpentes elapídicas, que apresentam as peçonhas potencialmente mais tóxicas no mundo. Apesar dos acidentes com *Micrurus* sp. corresponderem somente a 0,5% do total de casos, as manifestações clínicas do envenenamento resultam em uma neurotoxicidade aguda no sistema nervoso periférico, devido principalmente à ação das toxinas três-dígitos (3-Ftx) (6-8 kDa) presentes na peçonha, causando bloqueio progressivo dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) da junção neuromuscular, o que pode levar a uma parada respiratória e óbito. Alguns estudos mostram que as  $\beta$ -neurotoxinas (tipo fosfolipases A<sub>2</sub>) isoladas de peçonhas elapídicas, incluindo serpentes corais, induzem morte em neurônios corticais por promover excitotoxicidade glutamatérgica. O L-glutamato (L-Glu), principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC), quando liberado em excesso induz um aumento da concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) via ativação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, principalmente do tipo NMDA pós-sinápticos. Em contrapartida, a ativação pré-sináptica dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos (iGluR) do tipo AMPA e/ou Cainato induzem a abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem (Ca<sub>v</sub>) o que aumenta a liberação desse neurotransmissor. Portanto, em condições patológicas como epilepsia e isquemia cerebral, há uma liberação exacerbada de glutamato, levando à excitotoxicidade. Embora sejam relatados sintomas associados aos distúrbios do SNC oriundos do envenenamento por *Micrurus* sp., pouco se sabe sobre esses mecanismos de neurotoxicidade. No presente estudo, nós propusemos avaliar os efeitos neurotóxicos da peçonha bruta (PB) da serpente *Micrurus lemniscatus* e das frações contendo toxinas 3-Ftx obtidas por RPC-HPLC, em células de neuroblastoma (Neuro-2A) por ensaio de MTT após 24 horas de exposição. Foi observado que a PB e muitas de suas frações causaram citotoxicidade (40-80 %) de modo dose-dependente. Para comparação, neurônios hipocámpais de ratos neonatos (P<sub>0</sub>-P<sub>5</sub>) foram tratados com a PB em diferentes concentrações ( $5 \times 10^{-5}$  –  $50 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/mL}$ ) e em diferentes tempos de exposição aguda e crônica (1, 3 e 24 h, respectivamente) e foi observado que essa neurotoxicidade ocorreu a partir de 3 h de exposição. Foram realizados ensaios de fluorescência utilizando

calceína-AM e homodímero-1 de etídio nos neurônios hipocampais expostos à PB por 24 h, e esse resultado demonstrou citotoxicidade de modo concentração-dependente. Investigamos também os possíveis alvos farmacológicos envolvidos na neurotoxicidade da PB. Os resultados indicaram que o iGluR do tipo NMDA e nAChR estão envolvidos nos efeitos tóxicos em neurônios hipocampais de ratos neonatos (P<sub>0</sub>-P<sub>5</sub>) em cultura. Esse efeito também foi observado com a fração 22 (F22) e outras. Adicionalmente, visando elucidar se o efeito neurotóxico da PB envolveria a liberação pré-sináptica de L-Glu e consequente ativação dos iGluR pós-sinápticos, foi testada a atividade da PB, F22 e de duas toxinas 3-Ftx isoladas presentes na F22 (MI7294\_NTX e MI7256\_NTX) em preparação pré-sináptica de sinaptosoma cérebro cortical de rato. Observou-se que ambas induziram o aumento da liberação de L-Glu. Analisando os possíveis alvos farmacológicos envolvidos nesse evento de excitotoxicidade induzido pelas moléculas, os resultados mostraram que o influxo de cálcio via canais para cálcio dependentes de voltagem (Ca<sub>v</sub>) do tipo N, L e P/Q, o [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> e a ativação de iGluR, especialmente AMPA e/ou Cainato estão envolvidos na liberação de L-Glu promovida pela F22. Esse efeito foi abolido na presença de drogas antagonistas desses receptores e canais iônicos. Esses estudos podem levar a um melhor entendimento dos efeitos neurotóxicos centrais ocasionados pela PB e toxinas isoladas da serpente *Micrurus lemniscatus*, assim como revela pela primeira vez a atividade pré-sináptica de toxinas 3-Ftx.

**Palavras-chave:** *Micrurus lemniscatus* - neurotoxicidade central - células Neuro-2A-neurônios hipocampais - sinaptosomas cérebro corticais - liberação de L-glutamato - canais Ca<sub>v</sub> do tipo N, L e P/Q - receptores ionotrópicos glutamatérgicos de AMPA/Cainato e NMDA – atividade pré-sináptica de toxinas 3-Ftx.

**Suporte financeiro:** CAPES, CNPq, INCTTOX. Agradecimento especial à FUNED pelo fornecimento da peçonha bruta.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principais espécies de serpentes coral de importância médica presentes no território brasileiro.....	3
<b>Figura 2:</b> Serpente elapídica americana <i>Micrurus l. lemniscatus</i> (Linnaeus, 1758). .....	4
<b>Figura 3:</b> Representação de um exemplar macho de <i>Micrurus l. lemniscatus</i> (Linnaeus, 1758). .....	5
<b>Figura 4:</b> Notificação dos acidentes por animais peçonhentos no Brasil no período de 2010 a 2012.. .....	8
<b>Figura 5:</b> Notificação dos acidentes ofídicos no Brasil, por gêneros de serpentes, no período de 2010 a 2012.. .....	11
<b>Figura 6:</b> Aspectos clínicos do envenenamento por <i>Micrurus frontalis</i> .. .....	15
<b>Figura 7:</b> Modelo representativo da ligação dos fosfolipídeos de membrana com uma sPLA2 do grupo IA da serpente elapídica <i>Naja m. mossambica</i> .....	26
<b>Figura 8:</b> Estrutura tridimensional de toxinas três-dígitos (3-Ftx) mostrando as alças (dígitos) e as pontes dissulfeto.....	32
<b>Figura 9:</b> Modelagem molecular de toxinas three-fingers que formam dímeros. ....	33
<b>Figura 10:</b> Imagem de microscopia eletrônica de uma sinapse excitatória em hipocampo. ....	39
<b>Figura 11:</b> Representação do ciclo glutamato-glutamina em neuônio e célula da glia. ....	41
<b>Figura 12:</b> Representação esquemática da liberação de L-glutamato e ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos pelo neurotransmissor. ....	43
<b>Figura 13:</b> Representação da transmissão excitatória glutamatérgica.....	47
<b>Figura 14:</b> Neurotransmissão excitatória em hipocampo.....	51
<b>Figura 15:</b> Representação esquemática da neurotransmissão colinérgica na região CA1 do hipocampo enfatizando a modulação associada a outros neurotransmissores. ....	52
<b>Figura 16:</b> Eletromicrografia das frações subcelulares sinaptosomais da área do estriado de ratos após o gradiente de percol (0 a 23 %). .....	56

<b>Figura 17:</b> Esquema do cultivo celular de células de linhagem Neuro-2A (ATCC: CCL131).....	72
<b>Figura 18:</b> Esquema do cultivo celular de neurônios piramidais de ratos neonatos. ....	75
<b>Figura 19:</b> Esquema dos ensaios de citotoxicidade por MTT ou VN em neurônios hipocâmpais e linhagem Neuro-2A. ....	79
<b>Figura 20:</b> Esquema dos ensaios de citotoxicidade por microscopia de fluorescência em neurônios hipocâmpais. ....	81
<b>Figura 21:</b> Representação da reação catalisada pela enzima citoplasmática Lactato desidrogenase (LDH).....	83
<b>Figura 22:</b> Representação da reação catalisada pela enzima Glutamato desidrogenase (GDH).....	84
<b>Figura 23:</b> Cromatografia de fase reversa da peçonha bruta da serpente <i>Micrurus l. lemniscatus</i> .....	88
<b>Figura 24:</b> Distribuição das massas moleculares em relação a porcentagem de ACN dos peptídeos e proteínas presentes na peçonha bruta de <i>Micrurus l. lemniscatus</i> obtidos após o primeiro passo cromatográfico.....	93
<b>Figura 25:</b> Frequência das massas moleculares, encontradas na peçonha da <i>Micrurus l. lemniscatus</i> , obtidas por cromatografia líquida de fase reversa. ....	94
<b>Figura 26:</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida da peçonha bruta de <i>Micrurus l. lemniscatus</i> .....	95
<b>Figura 27:</b> Cromatografia de troca catiônica da peçonha bruta de <i>Micrurus l. lemniscatus</i> . ....	96
<b>Figura 28:</b> Cromatografia de fase reversa da Fração 7 proveniente da cromatografia de troca catiônica.....	97
<b>Figura 29:</b> Efeito concentração-dependente da peçonha de <i>Micrurus l. lemniscatus</i> , na viabilidade celular, em linhagem neuronal NEURO-2A. ....	102
<b>Figura 30:</b> Efeito citotóxico de frações semipurificadas da peçonha de <i>Micrurus l. lemniscatus</i> em células de linhagem neuronal Neuro-2A (neuroblastoma de camundongo). ....	103
<b>Figura 31:</b> Perfil de toxicidade desencadeada por frações semipurificadas da peçonha de <i>Micrurus l. lemniscatus</i> em células de linhagem neuronal Neuro-2A.....	104

<b>Figura 32:</b> Citotoxicidade da peçonha bruta de <i>Micrurus l. lemniscatus</i> em cultura de neurônios hipocâmpais de ratos neonatos. ....	106
<b>Figura 33:</b> Citotoxicidade tempo-dependente de neurônios hipocâmpais em cultura, tratados com a peçonha bruta de <i>Micrurus l. lemniscatus</i> .....	107
<b>Figura 34:</b> Efeito de drogas que atuam no sistema colinérgico D-tubocurarina (curare), piridostigmina e atropina na citotoxicidade induzida pela peçonha bruta de <i>Micrurus l. lemniscatus</i> em cultura de neurônios hipocâmpais de ratos neonatos. ....	108
<b>Figura 35:</b> Efeito dos bloqueadores dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos, na citotoxicidade induzida pela peçonha bruta de <i>Micrurus l. Lemniscatus</i> , em cultura de neurônios hipocâmpais de ratos neonatos. ....	110
<b>Figura 36:</b> Efeito da TTX, um bloqueador de canal para sódio dependente de voltagem, na citotoxicidade induzida pela peçonha bruta de <i>Micrurus l. Lemniscatus</i> , em cultura de neurônios hipocâmpais de ratos neonatos. ....	111
<b>Figura 37:</b> Efeito da peçonha bruta de <i>Micrurus l. lemniscatus</i> na viabilidade da cultura de neurônios hipocâmpais de ratos neonatos.....	112
<b>Figura 38:</b> Citotoxicidade em neurônios hipocâmpais, induzida pela peçonha bruta da serpente <i>M. lemniscatus</i> .....	115
<b>Figura 39:</b> Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase.....	117
<b>Figura 40:</b> Curva representativa de L-glutamato.....	118
<b>Figura 41:</b> Controles de liberação de L-glutamato nos sinaptosomas cérebro corticais de rato. ....	118
<b>Figura 42:</b> Liberação de L-glutamato, concentração-dependente, induzida pela Fração 22 em sinaptosomas cerebrocorticais.. ....	120
<b>Figura 43:</b> Efeito dos bloqueadores de canais para cálcio dependentes de voltagem, na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais induzida pela Fração 22. ....	122
<b>Figura 44:</b> Efeito dos bloqueadores de canais para cálcio dependentes de voltagem, na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato induzida pela Fração 22.. ....	124
<b>Figura 45:</b> Efeito dos quelantes de cálcio na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais induzida pela Fração 22. ....	1266



- Figura 46:** Efeito de bloqueadores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos sobre a liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato induzida pela Fração 22.. ..... 128
- Figura 47:** Contribuição dos receptores ionotrópicos de glutamato de NMDA e de AMPA/Cainato na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos induzida pela Fração 22. .... 130
- Figura 48:** Efeito do potencial de membrana de sinaptosomas cérebro corticais de ratos na liberação de L-glutamato induzida pela Fração 22. .... 132
- Figura 49:** Liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos por duas toxinas purificadas a partir da Fração 22. .... 133
- Figura 50:** Provável mecanismo de ação da peçonha bruta de *Micrurus lemniscatus* e das toxinas MI7294\_NTX e MI7256\_NTX. .... 165

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Toxicidade das peçonhas das serpentes do complexo <i>M. lemniscatus</i> presentes no Brasil associada aos hábitos alimentares. ....	6
<b>Tabela 2:</b> Número de casos de ofidismo notificados pelo SINAN/MS/Brasil nos últimos doze anos. ....	10
<b>Tabela 3:</b> Comparação entre o conteúdo enzimático das peçonhas de <i>Micrurus</i> sp. ...	21
<b>Tabela 4:</b> Fármacos comercializados produzidos a partir de toxinas de serpentes. ....	611
<b>Tabela 5:</b> Porcentagem de eluição, concentração proteica, rendimento e massas moleculares das frações provenientes da cromatografia em fase reversa da peçonha da serpente <i>Micrurus l. lemniscatus</i> . ....	90
<b>Tabela 6:</b> Sequências primárias parciais obtidas pelo método de Degradação de Edman, e números de aminoácidos de cinco toxinas isoladas da peçonha bruta da serpente <i>Micrurus l. lemniscatus</i> . ....	98
<b>Tabela 7:</b> Alinhamento das sequências parciais das cinco toxinas (6-8 kDa) isoladas de <i>Micrurus l. lemniscatus</i> . ....	99
<b>Tabela 8:</b> Alinhamento da sequência primária parcial da toxina MI7294_NTX com toxinas de serpentes elapídicas que apresentaram maior similaridade nas sequências. ....	101

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- A<sub>260</sub>: Absorbância no comprimento de onda 260 nanômetros
- ACh: acetilcolina;
- ω-Agtx IVA: ω-agatoxina IVA:
- AIEX: cromatografia de troca iônica – do inglês *Anion ion exchange chromatography*
- AMPA: Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
- BSA: soroalbumina bovina
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
- CIEX: cromatografia de troca iônica – do inglês *Cation ion exchange chromatography*
- Ca<sub>v</sub>: Canais para cálcio dependentes de voltagem
- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>int</sub>: concentração de cálcio intracelular
- ω-Cntx GVIA: ω-Conotoxina GVIA:
- cPLA<sub>2</sub>: Fosfolipase do tipo A2 citoplasmática
- CVN: corante vermelho neutro
- Cur: curare ou D-tubocurarina
- DL<sub>50</sub>: dose letal 50
- DMEM: do inglês *Dubelcco's modified Eagle médium*
- DTT: Ditiotreitól
- EDTA: Ácido tetracético etilenodiamino
- EGTA: ácido tetraacético etilenoglicol
- FPLC: cromatografia líquida de baixa pressão
- 3-Ftx: toxinas três-dígitos (*“three-finger toxins”*)
- F22: Fração 22
- GABA: ácido γ-aminobutírico
- GDH: glutamato desidrogenase
- HEPES: Ácido-N-[2-Hidroxietyl]-Piperazina-N'-[2-Etanosulfônico]
- HPLC: cromatografia líquida de alta pressão;
- i.c.v: intracérebro ventricular
- i.p.: intraperitoneal
- i.v.: intravenoso
- IC<sub>50</sub>: Concentração inibitória mediana
- iGluR: Receptor ionotrópico de glutamato

KRH: Krebs- Ringer- Hepes  
K<sub>v</sub>: Canais para potássio dependentes de voltagem  
LDH: Lactato desidrogenase  
LDP: depressão de longa duração  
L-Glu: L-glutamato  
LTP: potenciação de longa duração  
MALDI TOF: do inglês *matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight MS*  
mAChR: Receptor muscarínico de acetilcolina  
mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato  
MS: Espectrometria de massas  
MT: toxina muscarínica  
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol brometo  
Na<sub>v</sub>: Canais para sódio dependentes de voltagem  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina  
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto  
NADP: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
Nif: Nifedipina  
NO: óxido nítrico  
NOS: Óxido nítrico sintase constitutiva  
N-terminal: Extremidade aminoterminal de proteínas  
NT: não tratados  
α-NTX: α-Neurotoxina  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida  
PB: Peçonha bruta  
PBS: solução tampão fosfato  
PITC: Fenilisotiocianato  
PLA<sub>2</sub>: Fosfolipase A<sub>2</sub>  
PSA: persulfato de amônio;  
PTH: Phenylthiohydantoin  
Pirid: Piridostigmina  
RPC: cromatografia de fase reversa – do inglês *Reverse phase chromatography*  
s.c: via subcutânea

SDS: dodecil sulfato de sódio

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

sPLA<sub>2</sub>: Fosfolipase do tipo A2 secretória

TEMED: N N N' N' tetrametiletileno diamino

TFA: Ácido trifluoroacético

Tris-HCl: tris (hidroximetil) aminometano acidificado com ácido clorídrico

TTX: Tetrodotoxina

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. AS SERPENTES ELAPÍDICAS E O GÊNERO *Micrurus* sp.

As peçonhas das serpentes são uma mistura complexa de biomoléculas ativas, tais como peptídeos e proteínas com diferentes propriedades farmacológicas de interesse médico por serem responsáveis pela sintomatologia clínica dos acidentes (SAHA et al. 2006). Dentre as serpentes de maior importância médica estão as elapídicas (família Elapidae), que possuem espécimes com as peçonhas, do ponto de vista de toxicidade, mais potentes do mundo (HODGSON e WICKRAMARATNA, 2006; FRY, 1999).

A família Elapidae é amplamente distribuída pelo mundo com aproximadamente 250 espécies (CARDOSO et al., 2003). Filogeneticamente, essa família é classificada em seis subfamílias, tais como a Hydrophiinae (serpentes marinhas e elapídicas australianas), Bungarinae (cobras, kraits e mambas, que são as elapídicas africanas e asiáticas), Laticaudinae, Calliophiinae, Maticorinae (serpentes elapídicas asiáticas) e Elapinae (serpentes elapídicas americanas) (ALAPE-GIRÓN, STILES, et al. 1996). A principal característica morfológica, dessa família, é a presença de um aparelho inoculador do tipo proteróglifo (*protero* = dianteiro, *glyphé* = sulco), ou seja, um par de presas anterior bem desenvolvido, possuindo um sulco central e sem dentes posteriores (HODGSON e WICKRAMARATNA, 2006; HARVEY, et al., 2003; SOURENSE, 2000).

Os gêneros *Micrurus*, *Micruroides* e *Leptomicrurus* pertencem à subfamília Elapinae (FERNÁNDEZ et al., 2011; SOURENSE, 2000; VITAL-BRAZIL, 1987). As serpentes *Micrurus*, particularmente conhecidas como “corais” abrangem apenas os dois primeiros gêneros, *Micrurus* e *Micruroides*, sendo o primeiro com ampla distribuição nas Américas do Norte, Central e do Sul, e o segundo, com três espécies conhecidas distribuídas no sudoeste dos Estados Unidos e oeste do México (VITAL-BRAZIL, 1987; ROZE, 1982).

As corais fazem parte de um grupo taxonômico do Novo Mundo composto por 120 espécies e subespécies, sendo o gênero *Micrurus* sp. o principal representante das Américas (SERAFIM et al., 2002; DA SILVA JR, 2001), com grande abundância, diversidade de espécies e habitats que variam do deserto às florestas (OLIVEIRA et al., 2000; ALAPE-GIRÓN et al., 1994).

Em 2004, Campbell e Lamar publicaram uma nova classificação morfológica para o gênero *Micrurus*, na qual esse foi dividido em quatro grupos. O primeiro compreende um grupo monodal, com espécies que apresentam uma cauda longa, com um único anel preto separando os anéis brancos e vermelhos (como exemplo, a *M. corallinus*); um segundo grupo denominado bicolor, com espécies contendo cauda curta com anéis brancos ou vermelhos separados por anéis pretos (por exemplo, *M. multifasciatus*); o terceiro e quarto grupos são chamados de grupos das tríades, sendo o terceiro o grupo da América Central, com cauda longa, três anéis pretos separados por anéis brancos entre os anéis vermelhos (por exemplo, *M. laticollaris*); e o quarto, o grupo da América Latina, com cauda curta e padrão de coloração idêntico ao anterior, porém restrito ao continente Sul americano (como exemplo, a *M. lemniscatus*) (PIRES, DA SILVA JR. et al., 2014).

No Brasil, as serpentes corais incluem organismos pequenos (menores que 700 mm) ou grandes (com até 1,5 m) (HARVEY e APARICIO, 2003) (figuras 1a-d). Muitas espécies possuem uma coloração padrão com algumas combinações de vermelho (ou laranja), branco (ou amarelo) e preto, disposta em anéis que circundam todo o corpo do animal (HARVEY, et al., 2003; DA SILVA JR e SITES JR, 2001). Apresentam uma biologia caracterizada por hábitos fossoriais e semi-fossoriais, vespertinos e noturnos (SOURENSE, 2000; AIRD e DA SILVA JR, 1991). São ovíparas e colocam de 3 a 12 ovos. Morfologicamente, as corais apresentam a cabeça oval, recoberta por grandes placas simétricas (referência habitual para serpentes não-peçonhentas), não apresentam fosseta loreal, os olhos são pequenos e pretos com pupilas elípticas verticais e quase sempre focalizadas numa faixa preta da cabeça (HARVEY e APARICIO, 2003). O pescoço não é bem pronunciado devido ao desenvolvimento da musculatura cervical adaptada para a escavação e os ossos cranianos são fortes. O corpo cilíndrico é recoberto por escamas lisas e a cauda curta dá nome ao principal gênero *Micrurus* (*grego* = pequena cauda) (SOURENSE, 2000).

São descritas 22 espécies de *Micrurus* que estão distribuídas por toda a América do Sul e dentre essas, as principais presentes no território brasileiro são: *M. albicinctus*, *M. altirostris*, *M. brasiliensis*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. hemprichii*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus*, *M. surinamensis*, *M. filiformis* e *M. spixii* (PARDAL et al., 2010; CARDOSO et al., 2003; DA SILVA JR e SITES JR, 2001; SOURENSE, 2000). Recentemente, PIRES e col. (2014) descobriram uma nova espécie exclusiva da região Nordeste (estados de PE, PB e RN), a *M. potyguara*. Entretanto, são as espécies *M.*

*corallinus*, *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. spixii*, *M. surinamensis* e *M. lemniscatus* (Figuras 1 e 2) as maiores responsáveis pelos acidentes ofídicos com humanos nesse gênero (PARDAL et al., 2010; TANAKA et al., 2010; BUCHARETCHI et al., 2006; HIGASHI et al., 1995).



(a) *Micrurus ibiboboca* (Merrem, 1820).  
Distribuição geográfica: Nordeste, MA a BA.  
Mata do Buraquinho JP/PB (Fonte: PEREIRA-FILHO, 2007, 182f).



(b) *Micrurus spixii* (Wagler, 1824).  
Distribuição geográfica: Norte (Fonte: [http://www.luar.dcc.ufmg.br/bravesdb/index.php?lan=pt\\_br&op=specsheat&specieid=53](http://www.luar.dcc.ufmg.br/bravesdb/index.php?lan=pt_br&op=specsheat&specieid=53))



(c) *Micrurus corallinus* (Merrem).  
Distribuição geográfica: região Sul e Sudeste  
(faixa litorânea). (Fonte: [www.saudeanimal.com.br/imagens/coral\\_da\\_mata](http://www.saudeanimal.com.br/imagens/coral_da_mata)).



(d) *Micrurus frontalis* (Duméril, Bibron e Duméril). Distribuição geográfica: MG, SP, MT, MS. Serra da Canastra / MG (Fonte: [www.Arthurgrosset.com](http://www.Arthurgrosset.com)).

**Figura 1: Principais espécies de serpentes corais de importância médica presentes no território brasileiro. (a) *Micrurus ibiboboca*; (b) *Micrurus spixii*; (c) *Micrurus corallinus*; (d) *Micrurus frontalis*.**

### 1.1.1. O complexo *Micrurus lemniscatus*

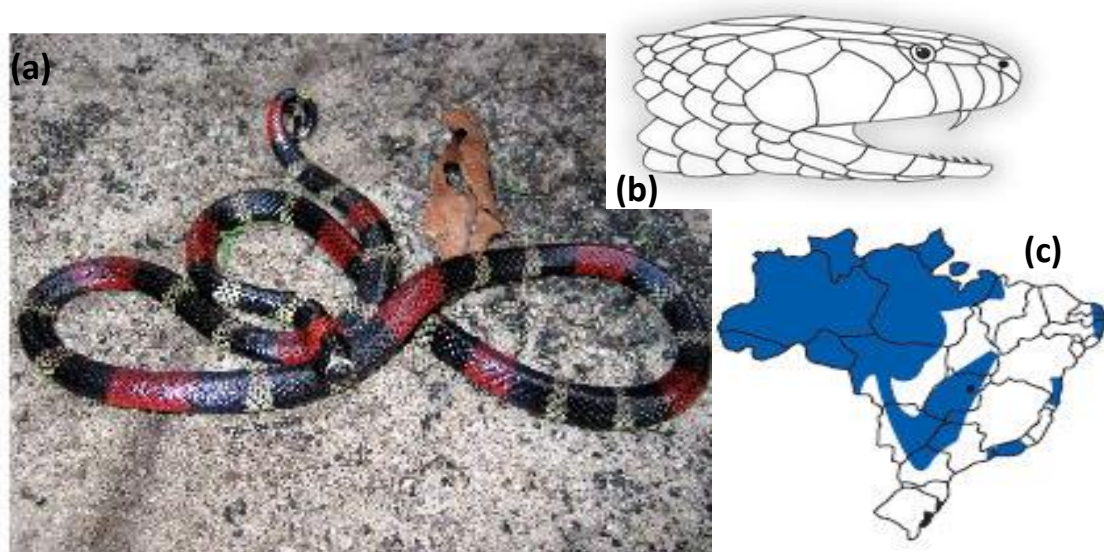
A serpente elapídica americana *M. lemniscatus* (Linnaeus, 1758) apresenta-se como um complexo constituído de quatro subespécies: *M. lemniscatus diutius* (Burger, 1955), *M. lemniscatus lemniscatus* (Roze, 1967), *M. lemniscatus carvalhoi* (Roze,



1967) e *M. lemniscatus helleri* (Schmidt e Schmidt, 1925) (PIRES, 2011; CARVALHO, et al., 2007; VITAL-BRAZIL, 1987).

Relatos científicos e históricos mostram que os primeiros registros da espécie *M. lemniscatus* estão presentes em ilustrações nos volumes um e dois da obra de Albertus Seba, intitulada “*Locupletissimi rerum naturalium thesauri...*”, datados de 1734 e 1735, respectivamente. Em 1749, foram publicadas as primeiras descrições literárias de serpentes desse Complexo e só em 1925 é que houve a fragmentação em subespécies, com a descrição de *M. l. helleri* (Schmidt e Schmidt) (PIRES, 2011).

Esta espécie é amplamente distribuída pela América do Sul, sendo encontrada na Venezuela, Colômbia, Equador, Bolívia e Brasil (VITAL-BRAZIL, 1987; ROZE, 1982). No Brasil está mais presente no vale amazônico, litoral atlântico e cerrado. Das quatro subespécies, apenas as três últimas estão distribuídas geograficamente no território brasileiro, sendo a *M. l. carvalhoi* localizada no sudeste do país, no estado de São Paulo; *M. l. helleri* localizada no norte, na região amazônica; *M. l. lemniscatus*, nas regiões nordeste e sudeste, no litoral atlântico e cerrado (Figura 2-a, 2-c) (SOURENSE, 2000).

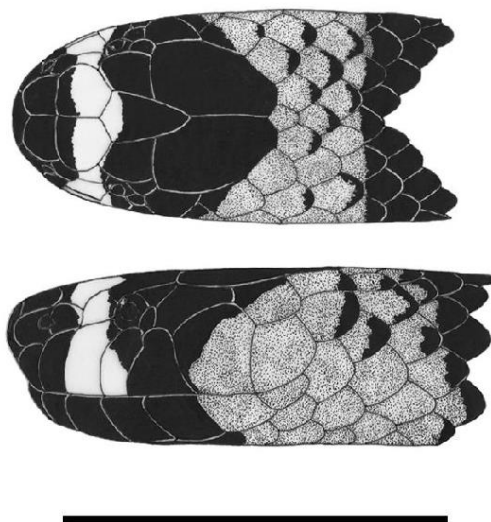


**Figura 2:** Serpente elapídica americana *Micrurus l. lemniscatus* (Linnaeus, 1758). (a) Exemplar coletado na Mata do Buraquinho JP/PB. (b) Dentição proteróglifa característica das serpentes elapídicas. (c) Distribuição geográfica no território brasileiro do complexo *M. lemniscatus*, que se localiza desde o vale amazônico, passando pelos cerrados do Brasil central e no litoral atlântico (nordeste e sudeste) (Adaptado de: PEREIRA-FILHO, 2007, p.90,182f).

Como características morfológicas e filogenéticas do complexo *M. lemniscatus*, no corpo apresentam tríades de anéis pretos separados por vermelhos, sendo a primeira tríade completa acima de 27 escamas subcaudais, em geral mais do que 30. Há presença

de manchas brancas no focinho, com ausência de faixa branca internasal, e, se presente, apresenta-se irregular e estreita, manchada de preto, cobrindo parte da pré-frontal (DA SILVA JR & SITES JR, 2001).

Todas as escamas parietais ou pelo menos as da parte posterior são pretas. As três subespécies presentes no território brasileiro apresentam em comum mais de 226 escamas ventrais no macho e mais do que 243 nas fêmeas, entretanto, as diferenças intraespecíficas consistem em: *M. l. carvalhoi* apresenta entre 27 e 33 escamas subcaudais na fêmea, escamas vermelhas com poucas manchas pretas irregulares ou ápices pretos e faixas brancas estreitas limitadas a 1 ou 2 escamas; as outras duas subespécies possuem em comum mais do que 33 escamas subcaudais nas fêmeas, ausência de manchas nas escamas vermelhas ou apenas com ápices pretos irregulares e faixas brancas geralmente em mais do que 4 escamas. As diferenças morfológicas aparentemente estão restritas ao número de tríades no corpo, sendo de 9 a 11 em *M. l. helleri* e entre 11 e 14 em *M. l. lemniscatus* (Figura 3) (SOURENSE, 2000).



**Figura 3: Representação de um exemplar macho de *Micrurus l. lemniscatus* (Linnaeu, 1758). Mata do Buraquinho/João Pessoa/PB. Observa-se a presença de escamas vermelhas (representadas em cinza) com ápices pretos irregulares e faixa branca em mais do que 4 escamas (Fonte: PEREIRA-FILHO, 2007, p. 42, 182f).**

Sobre a biologia da *M. lemniscatus*, essa, em sua maioria habita florestas de várzeas ou florestas tropicais, onde pode viver em troncos de árvores (PARDAL et al., 2010; MANOCK et al., 2008). Apresenta uma dieta específica e restrita a exemplo de outras serpentes, como anfisbenídeos e peixes. O trabalho de Da Silva Jr e Aird (2001)

apontou que a *M. l. lemniscatus* e *M. l. helleri* possuem alimentação composta preferencialmente, por peixes (*Symbranchus marmoratus*) e anfisbenídios (*Amphisbaena* sp.); a *M. l. carvalhoi* alimenta-se de anfisbenídios (*Amphisbaena* sp. e *Leposternon* sp.) e de outras serpentes (*Liophis typhlus* e *Tantilla melanocephala*). Esses autores mostraram que a dieta alimentar diferenciada entre as subespécies acrescida das diferenças entre sexo, idade e isolamento geográfico, refletem na potência, toxicidade e nas características bioquímicas das peçonhas. A Tabela 1 mostra a dose letal que causa morte em 50% das presas (DL<sub>50</sub>) associada à via de administração e aos hábitos alimentares das serpentes destas sub-espécies.

**Tabela 1: Toxicidade das peçonhas das serpentes do complexo *M. lemniscatus* presentes no Brasil associada aos hábitos alimentares. DL<sub>50</sub> relacionada às vias de administração intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.) e intramuscular (i.m.) com os hábitos alimentares de cada subespécie (Adaptado de: DA SILVA JR. e AIRD, 2001).**

	Hábitos alimentares											
	Mamífero: camundongo ( <i>Mus musculus</i> )			Peixe ( <i>Symbranchus marmoratus</i> )			Anfisbenídios ( <i>Amphisbaena</i> sp.)			Serpente Colubridae ( <i>Liophis typhlus</i> )		
	i.v. (µg/g)	i.p. (µg/g)	i.m. (µg/g)	i.v. (µg/g)	i.p. (µg/g)	i.m. (µg/g)	i.v. (µg/g)	i.p. (µg/g)	i.m. (µg/g)	i.v. (µg/g)	i.p. (µg/g)	i.m. (µg/g)
<i>M. l. lemn.</i>	0,2	0,4	0,5	—	0,03	0,2	—	0,4	0,7	—	0,5	0,7
<i>M. l. carv.</i>	0,3	0,5	0,7	—	0,06	0,3	—	0,4	0,5	—	0,4	0,6
<i>M. l. hell.</i>	0,1	0,2	0,4	—	0,02	0,1	—	0,5	0,7	—	0,6	0,7

Tanaka e col. (2010) mostraram que a DL<sub>50</sub> da peçonha de *M. lemniscatus*, avaliada em camundongos (*Mus musculus*), por via intraperitoneal (i.p.), corresponde a aproximadamente 0,59 µg/g (13 µg/animal entre 18-22 g), corroborando com o valor encontrado na tabela acima para *M. l. carvalhoi*. De acordo com a tabela pode-se observar ainda que, em mamíferos, a toxicidade da peçonha, representada pela DL<sub>50</sub> apresenta-se em ordem decrescente de: *M. l. helleri* > *M. l. lemniscatus* > *M. l. carvalhoi* relacionada às vias de administração (i.v. > i.p. > i.m.).

No que concerne às peculiaridades das peçonhas de cada espécie e subespécies de serpentes do gênero *Micrurus*, torna-se necessária a caracterização bioquímica e farmacológica das peçonhas brutas, isoladamente. Dessa forma, espera-se auxiliar de

forma mais dirigida, na terapêutica dos envenenamentos, atenuando o agravamento dos quadros clínicos, bem como, na elucidação dos mecanismos toxicológicos promovidos pelas toxinas isoladas, ou pelo sinergismo entre elas, refletido nos sintomas manifestados pelas vítimas.

## **1.2. ACIDENTES OFÍDICOS POR *Micrurus* sp. (FAMÍLIA ELAPIDAE)**

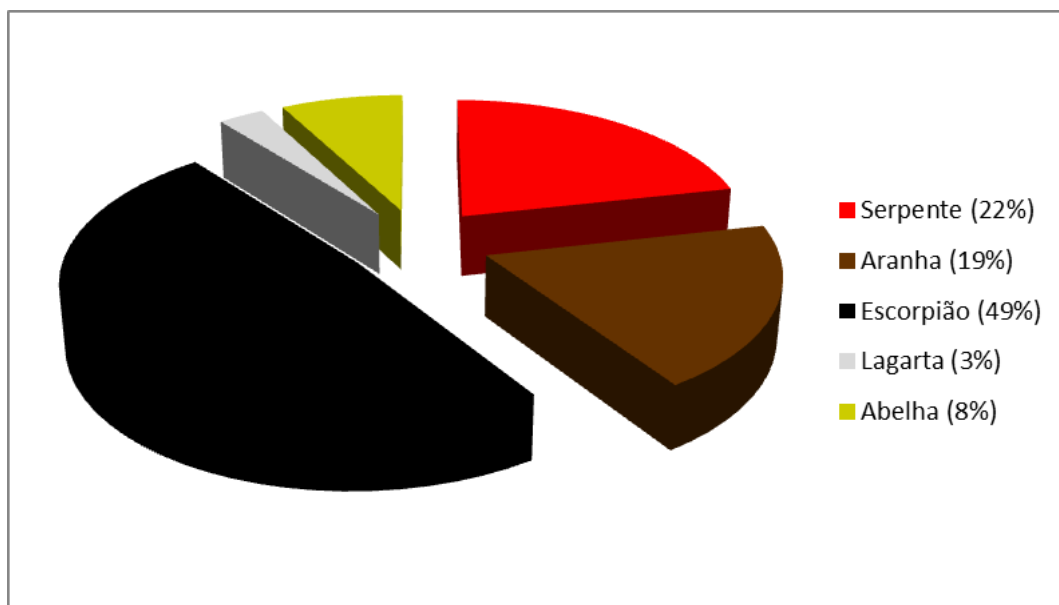
### **1.2.1. Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos**

Envenenamentos por mordidas de serpentes são considerados importantes problemas de saúde pública em áreas rurais de países tropicais e subtropicais situados na África, Ásia, Oceania e América Latina. Dados recentes divulgados pela World Health Organization (WHO) estimam que anualmente no mundo ocorram cerca de 421 mil casos de acidentes ofídicos, com 20 mil óbitos (4,75%), sendo o maior número de casos ocasionados por serpentes elapídicas (cobras, kraits, mambas, etc.), viperídicas e, em algumas regiões, serpentes marinhas (WHO, 2014). Apesar dos dados mundiais de casos de ofidismo serem alarmantes, proporcionalmente parece ter havido uma redução no número de acidentes ofídicos com óbitos, uma vez que em 2010 fora estimado que no mundo ocorreria mais de 500 mil casos de ofidismo com cerca de 130 mil óbitos (26%) por ano (DE SOUZA, 2010).

Os acidentes ofídicos são, em grande parte, negligenciados pela saúde pública, afetando principalmente populações rurais pobres que vivem de atividades agrícolas. E, devido à limitação de assistência à saúde aos acidentados, falta de acesso aos antivenenos (soros anti-ofídicos) ou retardo na sua administração, uso incorreto desses aliados à gravidade dos casos, muitas vezes, mesmo não havendo óbitos, as vítimas sobrevivem com sequelas irreversíveis com danos teciduais e/ou psicológicos.. Entretanto, esses acidentes ainda são considerados um caso de morbi-mortalidade em muitos países e em consequência, a WHO incorporou desde 2010 o ofidismo na lista de doenças negligenciadas (WHO, 2014; DE SOUZA, 2010).

Na América do Sul, o Brasil é o país com maior número de acidentes ofídicos, com cerca de 20-30 mil casos por ano, seguido pelo Peru (4.500), Venezuela (2.500-3.000), Colômbia (2.675), Equador (1.200-1.400) e Argentina (1.150-1.250) (ROJAS et al., 2007). No Brasil, no período de 2010 a 2012, o número de acidentes por animais peçonhentos registrados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação

(SINAN), do Ministério da Saúde (MS), foi de 141.158 casos, com 253 óbitos registrados em 2012. Desses casos notificados, 28.244 casos foram de acidentes ofídicos, ocupando o segundo lugar nas notificações (Figura 4) e perdendo apenas para os acidentes por escorpião, com registro de 63.857 casos (SAÚDE 2014).



**Figura 4: Notificação dos acidentes por animais peçonhentos no Brasil no período de 2010 a 2012. Os dados foram divulgados pelo Ministério da Saúde/SINAN Net, 2014 (SAÚDE 2014).**

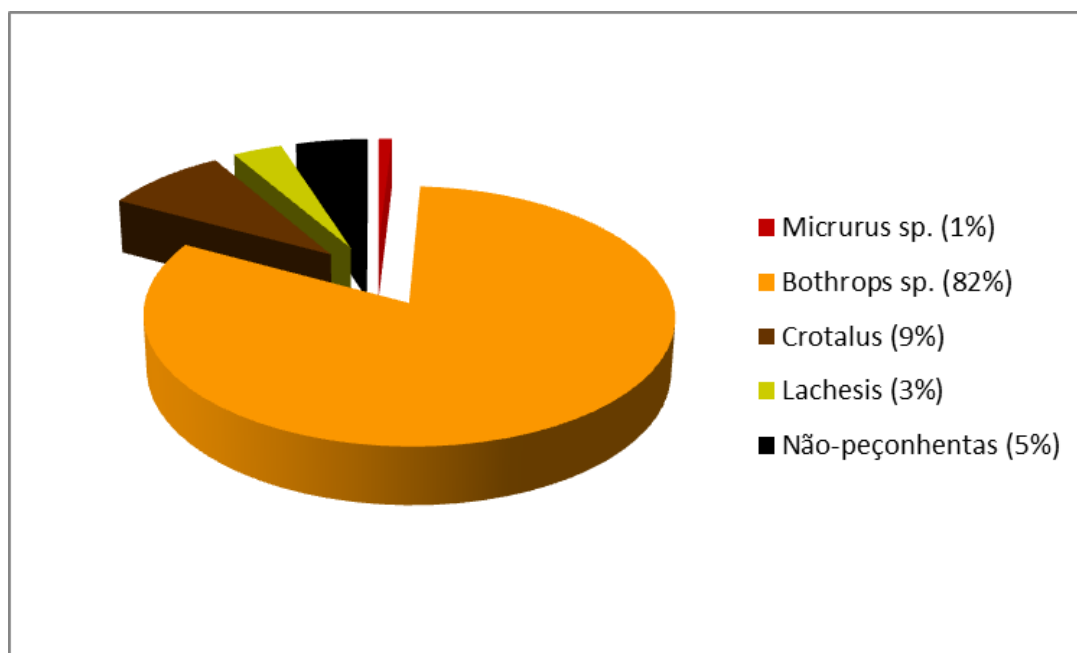
Além do mais, de acordo com as últimas estatísticas do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX)- Fiocruz/MS, no ano de 2011 os acidentes por animais peçonhentos (26.296 casos) ocuparam o segundo lugar nas intoxicações humanas, sendo apenas ultrapassados pelos medicamentos (31.756 casos), (SINITOX/FIOCRUZ/MS 2014) fato que se repete há alguns anos (ROJAS et al., 2007; PINHO et al., 2004).

Em 2008, no Brasil, na maior parte dos acidentes causados por serpentes peçonhentas verificou-se que o predomínio de acidentes envolveu a família Viperidae: gênero botrópico (jararaca), que correspondeu a 73,5% dos casos de ofidismo notificados no país, seguidos pelo gênero crotálico (cascavel) com 7,5%, gênero laquético (surucucu) com 3,0%; e, por último representando a família Elapidae, o gênero Micrurus (coral verdadeira) com 0,7%, havendo pequenas variações, de acordo com a região e a distribuição geográfica das serpentes. O maior índice de acidentes ocorreu nas regiões Norte e Centro-oeste (MS e [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual\\_aap.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_aap.pdf). 2012).

Dados divulgados pelo Ministério da Saúde/Brasil das notificações dos casos de ofidismo em doze anos (2000-2012) mostram, de modo geral, um aumento do número de registros pelo SINAN (Tabela 2). Além disso, dentre as serpentes de importância médica, o gênero *Bothrops* sp. continua sendo o que mais causou vítimas (Tabela 2 e Figura 5).

**Tabela 2: Número de casos de ofidismo notificados pelo SINAN/MS/Brasil nos últimos doze anos. Os dados estão categorizados pelo gênero de serpente. Divulgação pelo Ministério da Saúde/SINAN Net, 2014 (SAÚDE 2014).**

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<i>Micrurus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	2	203	0	1	232
<i>Bothrops</i>	6	1	0	1	2	1	8	2	105	21733	3	112	20263
<i>Crotalus</i>	1	0	0	0	0	0	2	1	11	2160	0	16	2135
<i>Lachesis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3	946	0	5	859
Não-peçonhentas	0	0	0	0	0	0	1	0	8	1227	0	10	1241
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>129</b>	<b>26269</b>	<b>3</b>	<b>144</b>	<b>24730</b>



**Figura 5:** Notificação dos acidentes ofídicos no Brasil, por gêneros de serpentes, no período de 2010 a 2012. Os dados foram divulgados pelo Ministério da Saúde/SINAN Net, 2014 (SAÚDE 2014).

Historicamente, o primeiro estudo epidemiológico de acidentes ofídicos no Brasil foi realizado por Vital Brazil, em 1901, quando levantou-se o número de óbitos por mordidas de serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo. Neste mesmo ano, Vital Brazil entregou as primeiras ampolas de soro antiofídico para o consumo e junto a essas passou a distribuir o *Boletim para Observação de Accidente Ophidico* para ser preenchido com os dados referentes ao acidente, que levou ao uso do antiveneno (BOCHNER e STRUCHINER, 2003). Esta foi a primeira forma de notificação dos acidentes ofídicos no país. Ao longo de 113 anos, outros modelos de fichas e sistemas de notificação dos acidentes foram empregados até chegar-se aos utilizados atualmente pelo SINAN, SINITOX e outros.

Contudo, mesmo com a iniciativa de Vital Brazil no início do século XX, os atuais sistemas nacionais de informação responsáveis pelas notificações dos acidentes por animais peçonhentos só começaram a surgir em 1986, quando foi implantado o Programa Nacional de Ofidismo na antiga Secretaria Nacional de Ações Básicas em Saúde (SNABS), do Ministério da Saúde. Nesse momento, os acidentes ofídicos passaram a ser de notificação obrigatória no país, sendo o SINAN/MS com cobertura universal, responsável pelos registros de doenças de diferentes naturezas crônicas e agudas, sendo essas transmissíveis ou não, e o SINITOX/FIOCRUZ/MS, restrito a



alguns centros, registrando casos de intoxicação e envenenamento humano dividido em categorias (BOCHNER, 2002).

Apesar da baixíssima incidência de acidentes ofídicos por serpentes do gênero *Micrurus* sp. (PETERSON e DVM, 2006), esses apresentam um alto coeficiente de letalidade de 0,36% (MORAES et al., 2003), e com frequência são extremamente sérios. A severidade dos envenenamentos por *Micrurus* sp. pode variar de trivial a extremamente grave dependendo de alguns fatores, como: o tamanho da serpente, a quantidade de peçonha injetada e a idade da vítima (ALAPE-GIRÓN et al., 1994). A dose letal para humanos adultos é em torno de 4 a 5 mg de peçonha injetada, sendo uma serpente adulta capaz de injetar até 20 mg por mordida (PETERSON e DVM, 2006), o que mostra a alta potência destas peçonhas.

As corais são serpentes relativamente dóceis, em geral respondem agressivamente com uma mordida se provocadas ou sentirem-se ameaçadas (MOREIRA et al., 2010; PETERSON et al., 2006; VITAL-BRAZIL, 1987). Em caso de acidentes com essas serpentes, as regiões anatômicas mais frequentemente acometidas são os membros inferiores (pé e perna) e os membros superiores (mão e punho/antebraço) (ROJAS et al., 2007; PINHO et al., 2004), o que provavelmente deve-se ao fato de apresentarem uma denticção do tipo proteróglifa com pequenas presas frontais e fixas, pouco desenvolvidas para injeção da peçonha, o que necessita de uma ação de mastigação (SOURENSE, 2000).

Levantamentos epidemiológicos realizados em estados de distintas regiões do país, tais como no Amapá (LIMA, CAMPOS e RIBEIRO, 2009), nordeste de São Paulo (ROJAS e GONÇALVES, 2007), Goiás (PINHO e OLIVEIRA, 2004), Paraíba (ALBUQUERQUE, DA COSTA e CAVALCANTI, 2004), Ceará (FEITOSA, MELO e MONTEIRO, 1997) apontaram que, nos casos de ofidismo, a faixa etária mais acometida foi entre 20-39 anos de idade, sendo a maior prevalência em indivíduos do sexo masculino.

No estado de Minas Gerais/Brasil, o número de casos de ofidismo notificados no SINAN no período de 1991 a 1993 foi de 10.403, ocupando o primeiro lugar no país, e entre 2001 e 2003, foi de 9.645 casos, ocupando o segundo lugar, perdendo apenas para o estado do Pará (Saúde, 2004). Um estudo epidemiológico realizado na região norte do estado mostrou um número elevado de casos de ofidismo notificados (10.553) entre os anos de 2002 a 2006, sendo o município de Montes Claros/Bocaiúva o de maior incidência, na área urbana (LIMA et al. 2009). Nenhum outro estudo epidemiológico

sobre ofidismo no estado de Minas Gerais foi encontrado, o que sugere a grande necessidade de um levantamento da atual situação epidemiológica de acidentes ofídicos no estado.

### **1.2.2. Sintomatologia e Terapêutica dos acidentes por *Micrurus* sp.**

As peçonhas das corais são primariamente neurotóxicas, com pequena reação tecidual local ou dor na região da mordida. Ocasionalmente, pode ocorrer dor local e parestesia na região afetada. A vítima apresenta alterações no estado mental, fraqueza generalizada e fasciculação muscular, seguida de uma paralisia progressiva dos membros e músculos respiratórios, o que pode levar à morte por insuficiência respiratória (VITAL-BRAZIL, 1987; KITCHENS e VAN MIEROP, 1987). Os sinais são consistentes com disfunção bulbar, ptose palpebral, oftalmoplegia, paralisia dos músculos do pescoço, mandíbula, laringe e faringe; bem como espasmos faríngeais, hipersalivação (sialorréia), cianose e trismus (PETERSON e DVM, 2006; VITAL-BRAZIL, 1987).

O conjunto de efeitos da neurotoxicidade é como a Síndrome Curariforme, que induz depressão do sistema nervoso central (SNC), paralisia muscular e instabilidade vasomotora (PETERSON e DVM, 2006). Outras serpentes elapídicas (cobra, king cobra, kraits, serpentes marinhas) também causam em suas vítimas sintomas neurotóxicos similares, tais como paralisia, pouca ou ausência de dor local, ptose, trismus, paralisia facial e, em casos mais severos, necessitam de ventilação artificial devido à paralisia respiratória (WARREL, 2010). Entretanto, em acidentes com *Micrurus* na vítima acidentada não ocorre necrose tecidual, assim como hemorragia ou distúrbios na coagulação sanguínea (VITAL-BRAZIL, 1987).

A terapêutica adotada em caso de acidentes é a soroterapia caracterizada pelo uso do soro comercial antielapídico polivalente, produzido a partir de duas espécies de serpentes, a *M. corallinus* e a *M. frontalis* (RAW et al., 1991), sendo 1 ml do soro capaz de neutralizar 1,5 mg de peçonha. Isto porque o uso do soro monovalente não é capaz de neutralizar as peçonhas das diferentes espécies de *Micrurus*, indicando que há diferenças imunogênicas relevantes entre as peçonhas desse gênero (ALAPE-GIRÓN et al., 1994). Os antivenenos são produzidos e distribuídos no Brasil pela Fundação Ezequiel Diaz/MG (FUNED) e pelo Instituto Butantan/SP (PARDAL, et al. 2010).

Um levantamento soroterápico realizado no Brasil, nos anos de 2001 a 2003 mostrou que, do total de acidentes notificados nesse período, 81 % dos pacientes fez uso de antiveneno. Dos cinco tipos de antivenenos disponíveis, o menor número de ampolas utilizadas foi a de Soro antielapídico (SAEL), isto se deve ao menor número de incidentes por estas espécies de serpentes (Saúde, 2004).

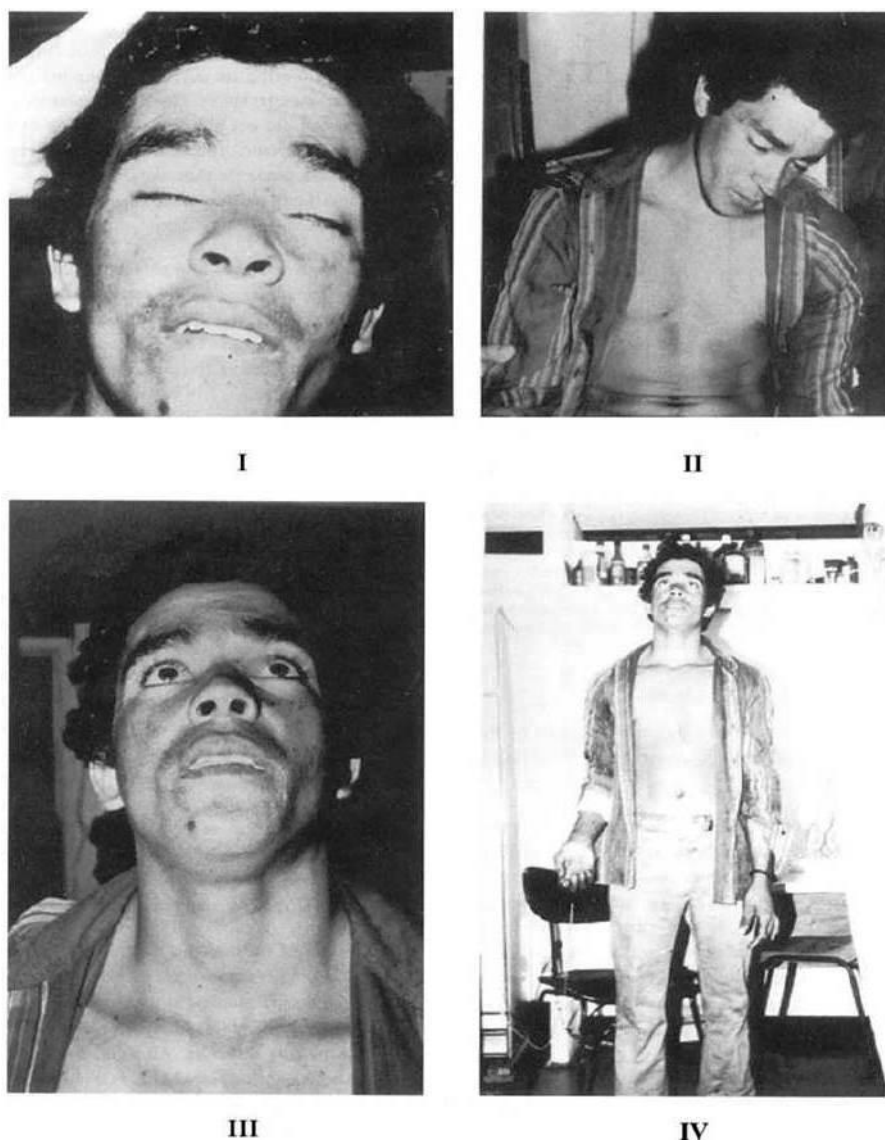
A recomendação para a soroterapia consiste na aplicação de 5 a 10 ampolas por via endovenosa, quantidade suficiente para neutralizar até 150 mg da peçonha (MARQUES et al., 2003). O soro é administrado e várias outras medidas paliativas são também utilizadas, tais como injeção concomitante de outros fármacos do tipo anticolinérgicos, anticolinesterásicos, analgésicos, dentre outros.

Um caso clínico envolvendo um paciente de 20 anos, mordido por *M. frontalis*, mostrou que 2 horas após o envenenamento este apresentava sintomas como franqueza muscular, dificuldade em andar e falar, parestesia no membro acometido e visão turva, ptose bilateral (Figura 6-I), oftalmoplegia, dificuldade de se manter em postura ereta (Figura 6-II) e respiratória. Entretanto, após a administração de fármacos (i.v.) como betasona (8 mg), maleato de feniramina (45 mg), sulfato de atropina (0,5 mg) e metilsulfato de neostigmina (1 mg) alguns sintomas foram parcialmente revertidos (Figura 6-III; IV). Além dos fármacos foi feito uso do soro antielapídico (100 ml) produzido pelo Butantan (VITAL BRAZIL e VIEIRA 1996).

O início dos sinais de envenenamento pode ser demorado, levando um tempo de 10 a 18 horas (MARKS et al., 1990; KITCHENS e VAN MIEROP, 1987). Relatos de casos de envenenamentos, tais como um ocasionado pela *M. lemniscatus helleri* descreveram sintomas clínicos iniciais (até 7 h após o acidente) como ptose palpebral, disfunções neurológicas (ansiedade, disartria, disfagia, nistagmo, decréscimo da acuidade visual, paralisia facial), taquipnéia, dor e parestesia locais, tendo sido necessária a soroterapia e administração endovenosa (i.v.) de fármacos comerciais como diazepam (20 mg), cetocorolaco (60 mg) e morfina (3 mg). Tardiamente (até 110 h) alguns pacientes apresentaram progressiva paralisia motora, insuficiência respiratória e hipóxia leve, sendo necessárias intubação e ventilação artificial (MANOCK et al., 2008).

Outros dois relatos de acidentes por outras espécies como a *M. surinamensis* também mostrou que o paciente após 20 min do acidente apresentou parestesia por todo o membro, disartria, disfagia, hipersalivação, visão turva e faces miastêmica, porém com ausência de dor local. A frequência cardíaca e pressão arterial encontravam-se

normais, entretanto houve necessidade de ventilação artificial e administração i.v. de fármacos como neostigmina (0,5 ml= 5 mg) e atropina (1 ml= 0,25 mg), além da soroterapia (10 ampolas= 100 ml). Já no acidente com a *M. filiformis*, o paciente apresentou apenas leve dor local e edema, com ausência das manifestações neurológicas, e apenas foi feito o uso da soroterapia (100 ml) (PARDAL et al., 2010).



**Figura 6:** Aspectos clínicos do envenenamento por *Micrurus frontalis*. I) Ptose bilateral; II) Faces miastêmicas e dificuldade em ficar de pé. III e IV) Reversão parcial dos sintomas após 10 min de injeção de neostigmina e atropina (1 e 0,5 mg, respectivamente) (VITAL BRAZIL e VIEIRA 1996).

Um estudo sobre os acidentes ocasionados por *Micrurus tener*, no Texas (EUA), apontou que os sintomas apresentados pelas vítimas são similares à sintomatologia de espécimes do território brasileiro. Foram analisados 82 casos entre os anos de 2000-

2004. Em geral, 90 % das vítimas apresentou dor, parestesia, edema e eritema no local; 7,3 % apresentou efeitos sistêmicos como náuseas, vômitos, tontura, letargia, salivação, euforia, tremor, disartria, ptose, diplopia, dispnéia, disfagia, fraqueza muscular, depressão respiratória ou convulsão (MORGAN et al., 2007).

Clinicamente, as variações de sinais e sintomas apresentados nos quadros de envenenamento por *Micrurus* sp. sugerem diferenças sutis toxinológicas dos constituintes de cada peçonha (DA SILVA JR. 2001).

### **1.3. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DAS PEÇONHAS DAS SERPENTES ELAPÍDICAS e de *Micrurus* sp.**

Os venenos são estratégias evolutivas importantes para uma ampla gama filogenética de animais, e possibilitam uma variedade de vantagens para os mesmos, tais como, habilidade para captura e digestão eficiente da presa, defesa contra os predadores, competição e dissuasão, ou ainda a combinação entre essas estratégias (FRY, et al., 2009; MENEZ, et al., 2006). Em geral, os venenos em todo o Reino Animal são caracterizados por serem misturas complexas, que incluem uma variada combinação de proteínas (estruturalmente compostas por subunidades polipeptídicas formando enzimas globulares, até simples e pequenos peptídeos), sais inorgânicos e moléculas orgânicas, como poliaminas, aminoácidos e neurotransmissores (FRY, ROELANTS et al., 2009).

O termo peçonha é utilizado para designar toda substância tóxica (veneno) produzida e injetada por aparato inoculatório presente no organismo peçonhento. As peçonhas ofídicas apresentam cerca de 90% de peso seco constituído por proteínas, que compreendem centenas de diferentes toxinas. Em peçonhas de serpentes viperídicas 80 a 90 % são enzimas e em serpentes elapídicas, entre 25-70 %, havendo também toxinas polipeptídicas não-enzimáticas e proteínas atóxicas como fator de crescimento de nervo (NGF) (WARREL, 2010). Essa combinação confere uma ordem formidável nas propriedades tóxicas de cada peçonha em que proteínas e peptídeos são majoritários (KOH e ARMUGAM, 2006).

A evolução das funções das peçonhas das serpentes e a diversificação dessas toxinas tem sido uma fonte de pesquisa interessante para a compreensão dos processos

evolutivos e filogenéticos. Os estudos destes processos também são úteis na clínica para elucidar os eventos fisiopatológicos desencadeados pelo envenenamento.

### **1.3.1. Atividades farmacológicas promovidas pelas peçonhas das serpentes de *Micrurus* sp.**

Os estudos com a peçonha e as toxinas das serpentes têm como foco um ou mais objetivos: (i) determinar o modo e o mecanismo de ação das toxinas; (ii) encontrar formas de neutralizar a toxicidade e os efeitos adversos do envenenamento pelas serpentes; (iii) desenvolver ferramentas de pesquisa específicas que sejam úteis ao entendimento dos processos fisiológicos normais em níveis celular e molecular; (iv) desenvolver protótipos de agentes farmacológicos baseados nas estruturas das toxinas (KINI, 2002).

Estudos experimentais sugerem uma variedade de atividades farmacológicas das diferentes peçonhas das corais, como neurotóxica (MOREIRA et al., 2010; CECCHINI et al., 2005; VITAL-BRAZIL, 1987); hemolítica e pró-inflamatória (TAMBOURGI et al., 1994); cardiotoxica e miotóxica (GUTIÉRREZ, ROJAS e DA SILVA JR, 1992, BARROS, FERNANDES e FERREIRA, 1994); edematogênica (CECCHINI et al., 2005; BARROS et al., 1994); muscarínica (DA SILVA et al., 2011); nociceptiva (BOHLEN et al., 2011); antiagregante plaquetária (SALAZAR et al., 2011); citotóxica (CARVALHO et al., 2014).

Em 1992, Gutiérrez e col. analisaram a atividade mionecrótica induzida pela peçonha bruta de 11 espécies de *Micrurus*, dentre essas espécies estava a *M. lemniscatus helleri*. Todas as peçonhas exceto a *M. surinamensis* apresentaram atividade de proteína cinase plasmática, sendo a peçonha de *M. lemniscatus* a segunda com maior atividade.

Ensaio com a PB de cinco espécies de *Micrurus* sp. (*M. averyi*, *M. spixii*, *M. surinamensis*, *M. hemprichii* e *M. lemniscatus*) para a investigação da atividade coagulante e fosfolipásica *in vitro* e as atividades hemorrágica, miotóxica e edematogênica *in vivo* dessas peçonhas. Os resultados mostraram que todas as peçonhas apresentaram intensa atividade edematogênica e miotóxica, exceto a peçonha de *M. surinamensis*, e apenas a peçonha de *M. averyi* apresentou atividade hemorrágica. Relacionada a peçonha de *M. lemniscatus* foi observado que após 24 h de administração

no músculo gastrocnêmico de camundongo ocorreu angionecrose com proeminentes infiltrados polimorfonucleares com histiócitos, e intenso efeito edematogênico (DOS SANTOS et al., 1994). No mesmo ano, Tambourgi e col. (1994) publicaram um estudo com as espécies *M. ibiboboca* e *M. spixii* avaliando a atividade pró-inflamatória e hemorrágica dessas peçonhas mostrando que ambas promoveram lise em hemácias (com 30 ng/ml) e que a peçonha de *M. spixii* apresentou atividade similar à trombina. Quando testadas em pele de camundongos, as peçonhas induziram um aumento da permeabilidade vascular e edema indicando a presença de substâncias pró-inflamatórias.

Serafim e col. (2002), avaliou a atividade da PB da serpente *Micrurus d. carinicauda* na junção neuromuscular de mamíferos. Foi observado que na concentração de 5 µg/ml causou danos a 52% das fibras musculares do nervo frênico diafragmático de ratos, indicando que essa peçonha apresenta efeitos neurotóxicos e miotóxicos com atividade predominante pós-sináptica.

Avaliando as atividades necróticas, coagulante, edematogênica, hemorrágica, necrótica e miotóxica da peçonha de *M. altirostris* e a neutralização dessas atividades pelo anti-veneno produzido pelo Butantan/SP, Moraes e col. (2003) observaram que as atividades hemolíticas e miotóxicas foram neutralizadas, entretanto, o soro não foi capaz de neutralizar a atividade letal apresentada pela PB.

Outro estudo, desenvolvido por Cecchine e col. (2005), avaliou algumas atividades enzimáticas e biológicas com a PB de quatro corais: *M. lemniscatus carvalhoi* (Mlc), *M. frontalis* (Mf), *M. surinamensis* (Ms) e *M. nigrocinctus* (Mn). Os resultados mostraram que as peçonhas de Mf e Mn demonstraram alta atividade anticoagulante e fosfolipásica. Em relação a ruptura da membrana lipossômica, todas as peçonhas apresentaram ruptura acima de 50 %, exceto Ms (37 %). Quanto à taxa de letalidade, a peçonha de Mlc apresentou-se como sendo a menos tóxica quando administrada i.m. ou i.p. em todas as concentrações (5-20 µg/camundongo). Na junção neuromuscular do nervo frênico e diafragma de mamíferos e no músculo biventer cervicis de pintainho, a peçonha de Mlc reduziu a tensão muscular de modo concentração e tempo dependentes. Além disso, essa mesma peçonha apresentou reação cruzada contra anticorpos de  $\alpha$ -NTX de cadeia curta e longa, e reagiu com menor intensidade aos anticorpos contra miotoxinas fosfolipásicas, apresentando alta atividade miotóxica e neurotóxica.

Similar ao estudo anterior, Dokmetjian e col. (2009) investigou várias atividades farmacológicas da PB de *M. pyrrhocryptus* e apontou que esta não

apresentou atividades hemorrágica, necrótica ou coagulante, entretanto, mostrou-se com alta atividade hemolítica (em torno de 50 %) e miotóxica.

Um trabalho recente com a peçonha bruta da *M. lemniscatus* utilizando modelos comportamentais para a nocicepção em camundongos apontou uma atividade antinociceptiva da peçonha (v.o. 19,7-1.600 µg/kg), com efeito mais prolongado e maior potência que a morfina, sendo avaliados pelos testes comportamentais de Campo aberto, Formalina, de Contorção e de Retirada da cauda, sem comprometimento da atividade motora, o que sugeriu a participação de receptores opióides (DOS SANTOS, et al., 2012).

Até o presente momento estudos revelavam que a peçonha de *M. lemniscatus* possuía apenas NTXs ativas em receptores pós-sinápticos (VITAL BRAZIL, 1987; CECCHINI et al., 2005). Todavia, Montandon (2013) demonstrou a atividade pré-sináptica da PB e frações isoladas da *M. lemniscatus* induzindo a liberação de glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos.

Relacionado à peçonha de *M. lemniscatus*, Silva (2013) investigou a atividade da PB sobre o sistema colinérgico muscarínico do músculo liso longitudinal de íleo de cobaia, demonstrando que a PB (3 µg/ml) apresentou efeito contrátil sobre o íleo, e que uma toxina denominada de MT MI (7.233 Da) apresentou atividade muscarínica cem vezes mais potente do que a peçonha nessa concentração. Farmacologicamente, a atividade dessa toxina foi antagonizada parcialmente pela atropina, um antagonista inespecífico dos receptores muscarínicos.

### **1.3.2. Componentes bioquímicos presentes nas peçonhas das serpentes de *Micrurus* sp.**

A biblioteca natural de toxinas está estimada em milhões de toxinas diferentes (SIEW et al., 2004). A complexidade desses compostos frente à diversidade de peptídeos e proteínas, juntamente com o número de espécimes peçonhentas conhecidas, indica que apenas uma inconspícua fração (menos de 1%) das moléculas bioativas foi identificada e caracterizada biologicamente (MENEZ e STÖCKLIN, 2006)

De modo geral, as classes enzimáticas que podem estar presentes nas peçonhas ofídicas são: hidrolases digestivas; hialuronidases; inativador ou ativador de processos fisiológicos, como cininogenases; L-aminoácido oxidase; fosfomonoesterase e fosfodiesterase; 5'-nucleotidase; DNase; NAD-nucleotidase; fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>); peptidases (WARREL 2010), sendo a maior parte delas de natureza hidrolítica.



Os constituintes bioquímicos das peçonhas elapídicas, quando comparados aos das peçonhas viperídicas, apresentam uma maior diversidade, principalmente em classes de proteínas. Os principais componentes das peçonhas elapídicas são neurotoxinas pós-sinápticas, neurotoxinas pré-sinápticas e cardiotoxinas. Entre os componentes majoritários das peçonhas elapídicas, encontram-se as enzimas, principalmente as PLA<sub>2</sub>, moléculas que causam mionecrose ou efeito similar às cardiotoxinas ou, em algumas espécies, atuam como neurotoxinas pré-sinápticas (VITAL-BRAZIL, 1987), e as toxinas protéicas do tipo três-dígitos ou três-alças (“*three-finger toxins*” ou 3-Ftx), grupo de toxinas exclusivas de serpentes elapídicas (FRY, ROELANTS et al. 2009). Além desses, outros componentes protéicos e peptídicos compõem essa diversidade de constituintes, em menor proporção.

As serpentes elapídicas australianas, cujas peçonhas são potencialmente consideradas as mais tóxicas do mundo, apresentam três principais componentes nas suas peçonhas, que são as enzimas ativadoras de protrombina, PLA<sub>2</sub> tóxicas com inúmeras atividades e neurotoxinas 3-Ftx (FRY, 1999; HODGSON e WICKRAMARATNA, 2006).

As serpentes elapídicas asiáticas apresentam como principais constituintes das peçonhas as PLA<sub>2</sub>, toxinas 3-Ftx e os inibidores de serino protease do tipo kunitz (SIANG et al. 2010). Já as serpentes elapídicas africanas possuem as 3-Ftx do tipo citotoxinas e neurotoxinas, os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), peptídeo natriurético e inibidor de bradicinina como componentes mais abundantes (MUNAWAR et al., 2014).

As serpentes elapídicas americanas possuem como componentes majoritários das suas peçonhas as toxinas 3-Ftx do tipo  $\alpha$ -neurotoxinas de cadeias curta e longa, com diversas isoformas, e as PLA<sub>2</sub> do tipo IA (CISCOTTO et al., 2011).

Grande parte das proteínas presentes nas peçonhas é resultante de um recrutamento de eventos bioquímicos, em que um gene de uma proteína que está envolvida em um processo regulador chave é repetido, e esse novo gene é expresso seletivamente na glândula de veneno. Em muitos casos, os genes da toxina são amplificados para se obter famílias multigênicas com novas funcionalidades, contudo, preservando a estrutura molecular básica, inclusive a estrutura terciária da proteína ancestral e alterando os grupos funcionais principais para adquirir uma ampla gama de atividades farmacológicas (FRY et al., 2009).

Um estudo comparativo do conteúdo enzimático das peçonhas das *Micrurus* presentes no Brasil foi desenvolvido por Aird e Silva Jr (1991), com as espécies: *M. albicinctus*, *M. corallinus*, *M. frontalis altirostris*, *M. frontalis brasiliensis*, *M. frontalis frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus*, *M. rondonianus*, *M. spixii spixii* e *M. surinamensis surinamensis*, *M. fulvius fulvius*, em que foram investigadas a presença de várias enzimas distintas. Esse estudo mostrou graus de similaridades e diferenças bioquímicas entre as espécies do gênero *Micrurus* (tabela 3).

**Tabela 3: Comparação entre o conteúdo enzimático das peçonhas de *Micrurus* sp. As abreviações dos nomes das enzimas correspondem a: Acetil= acetilcolinesterase; Hialuron= hialuronidase; L-aminodes= L-aminodesidrogenase; 5-nucleo= 5-nucleotidase; Fosfodies= fosfodiesterase; PLA<sub>2</sub>= fosfolipase A<sub>2</sub>; Prote= protease; Leu= leucina aminopeptidase.**

Espécies de <i>Micrurus</i> sp.	ENZIMAS							
	Acetil	Hialuron	L-aminodes	5-nucleo	Fosfodies	PLA <sub>2</sub>	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: AIRD e DA SILVA JR, 1991 (adaptado).

Várias classes de peptídeos e toxinas já foram isoladas a partir da peçonha de serpentes elapídicas.

Peptídeos com a modelagem AVIT fazem parte do arsenal molecular do veneno dos répteis e também estão presentes na pele de *Bombina* sp. Estes foram isolados pela primeira vez da PB da elapídica africana *Dendroaspis polylepis* (black mamba), sendo denominada de MIT-1 (mamba intestinal toxin 1) toxina. Os peptídeos AVIT possuem 10 resíduos conservados de cisteína e são agonistas potentes dos receptores procineticina de mamíferos (PKR1 e PKR2). Os efeitos fisiofarmacológicos ocasionados por essas toxinas são contrações da musculatura lisa gástrica e hiperalgesia (SCHWEITZ et al., 1999).

As proteínas secretórias ricas em cisteínas (CRISP – *cysteine-rich secretory protein*) foram encontradas em peçonhas de algumas serpentes elapídicas, tais como em *Naja naja* e *Oxyuranus scutellatus*. O motivo CRD (domínio rico em cisteína do C-terminal) dessas toxinas inibe alguns canais iônicos para cálcio e potássio, além do receptor de rianodina (HERRERA et al., 2012; SUZUKI et al., 2010).

A enzima hialuronidase foi isolada da peçonha de algumas serpentes elapídicas americanas, como na *M. albicinctus*, *M. corallinus* e *M. ibiboboca*. (DA SILVA JR., 2001) e da africana *Naja naja* (GIRISH et al., 2004). Essa enzima atua primariamente como fator de difusão, aumentando a permeabilidade tecidual às demais toxinas da peçonha (FRY, ROELANTS et al., 2009).

Algumas serpentes elapídicas, como a *Pseudonaja textilis* (brown snake), possuem nas suas peçonhas toxinas inibidoras de serinoproteases do tipo kunitz, a toxina textilinina-1 e da *M. mipartitus* foi isolada uma toxina com massa molecular 11, 94 kDa (REY-SUÁREZ et al., 2011). Fisiologicamente, essas proteínas atuam inibindo fatores de coagulação como plasmina e trombina, inibindo o processo de coagulação sanguínea. Algumas apresentam atividade neurotóxica bloqueando os canais para cálcio voltagem-dependentes ( $Ca_v$ ) do tipo L e os canais para potássio voltagem-dependentes ( $K_v$ ) (MILLERS, et al. 2013).

Foram identificadas quatro proteínas do tipo Lectina-C na peçonha da elapídica americana *M. fulvius* (VERGARA et al., 2014); uma de *M. mipartitus* (REY-SUÁREZ et al. 2011); uma de *M. spiixi* (CISCOTTO et al., 2011); três de *M. nigrocinctus* (FERNÁNDEZ et al., 2011). Essas toxinas atuam no sistema de coagulação sanguínea com indução ou inibição da agregação plaquetária, e inibição dos fatores de coagulação

(OGAWA, CHIJIWA e ODA-UEDA, 2005, ABREU, ALBUQUERQUE e RODRIGUES, 2006).

Os Peptídeos natriuréticos são uma outra classe de componentes presentes na peçonha de algumas espécies de serpentes elapídicas e atuam como potentes hipotensores. Os BPPs (peptídeos potenciadores de bradicinina) são encontrados na peçonha de *Naja m. mossambica* com MM= 1,2 kDa, aparecem em número de cinco em uma fração isolada dessa peçonha. Outro peptídeo isolado da mesma fração dessa peçonha é uma toxina inibidora de bradicinina com MM = 1 kDa. A serpente *Notechis s. scutatus* apresenta dois peptídeos natriuréticos de MM= 3,3 kDa (MUNAWAR, et al. 2014).

Outro constituinte bioquímico de peçonhas elapídicas são as peptidases S1, representadas pelas serino proteases. São toxinas encontradas em venenos de répteis com estrutura molecular similar a calicreína, e que atuam numa diversidade de componentes da cascata de coagulação no sistema calicreína-cinina e no sistema fibrinolítico nas células do sistema hemostático causando um desequilíbrio (FRY et al., 2009; SERRANO e MAROUN, 2005) Essas proteínas aparecem nas peçonhas de algumas *Micrurus*, entre elas *M. nigrocinctus*, representada por uma toxina com MM= 43, 14 kDa (FERNÁNDEZ et al., 2011); em *M. corallinus*, equivalente a 0,16 % da peçonha (LEÃO, HO e JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009); em *M. mipartitus* foram caracterizadas duas toxinas com MM= 15,13 e 25,14 kDa (REY-SUÁREZ et al., 2011).

Um grupo mais recente de proteínas, até então observadas apenas em lagartos, foi identificado nas peçonhas elapídicas, que são as proteínas com domínio PRY/SPRY - Lectinas com ação similar à Concaivalina A, denominadas de Ohanatoxinas, por primeiramente terem sido isoladas da peçonha da serpente *Ophiophagus hannah* (king cobra) (PUNG et al., 2006). A ohanina, isoforma encontrada na serpente, apresenta como características fisiopatológicas a hipolocomoção, hiperalgesia, além de induzir edema, vasorelaxamento endotélio-dependente, agregação plaquetária e miotoxicidade (FRY, ROELANTS et al., 2009). Na peçonha de *M. nigrocinctus* também foram isoladas três toxinas dessa classe (FERNÁNDEZ et al., 2011).

As metaloproteases (SVMPs), proteínas que são os constituintes majoritários das peçonhas das serpentes Viperidae, também compõem o arsenal bioquímico tóxico das peçonhas das serpentes elapídicas. Foram identificadas seis toxinas do tipo metaloproteases na peçonha de *M. nigrocinctus* (FERNÁNDEZ et al., 2011); na peçonha de *M. corallinus* através do transcriptoma da glândula de veneno foi observado

que 0,6% da peçonha é composta por essa classe de toxinas (LEÃO, HO e JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009). Utilizando a mesma técnica, foi observado em outro estudo que na peçonha de *M. fulvius* as metaloproteinases ocupam o quarto lugar dos componentes mais abundantes. Estruturalmente, nessa peçonha apresentam-se como SVMPs do tipo III, com domínio desintegrina e ricas em cisteína (MARGRES et al., 2013). Ciscotto e cols. (2011), mostraram, por espectrometria de massas, com sequenciamento *de novo* (MALDI-TOF-TOF MS) a presença dessas proteínas nas peçonhas de *M. frontalis*, *M. lemniscatus* e *M. ibiboboca*. De modo interessante, as proteínas dessa classe possuem um domínio catalítico conservado, caracterizado pelo motivo HEXXHXXGXXH, correspondendo a um sítio catalítico que se liga ao metal zinco, que vem seguido de um domínio desintegrina, capaz de se ligar às integrinas plaquetárias ou às células endoteliais (LEÃO, HO e JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009). Em serpentes viperídicas as SVMPs são responsáveis pelos edemas locais e sintomas hemorrágicos característicos do envenenamento desse grupo, entretanto, na peçonha de *Micrurus* a atividade farmacológica ainda é pouco esclarecida (MARGRES et al., 2013).

Uma outra classe enzimática, a L-aminoácido oxidase (LAO) também participa da diversidade proteômica das peçonhas elapídicas. Foram caracterizadas várias isoformas de LAO de diferentes espécies de corais, entre elas da *M. corallinus*, *M. nigrocinctus*, *M. lemniscatus* e *M. spixi*, *M. fulvius* (MARGRES et al., 2013; FERNÁNDEZ et al., 2011; CISCOTTO et al., 2011; LEÃO et al., 2009). Essas toxinas são flavoenzimas que catalisam a desaminação oxidativa de aminoácidos produzindo  $\alpha$ -cetoaminoácidos, peróxidos e amônia. São moléculas que desempenham muitas atividades biológicas como indução ou inibição de agregação plaquetária, atividade anticoagulante ou hemorrágica, antibacteriana, leishmanicida, pró-apoptótica, edematogênica. Essas toxinas também foram identificadas na peçonha de *Naja m. mossambica* (MUNAWAR et al. 2014).

Os outros dois componentes presentes nas peçonhas das serpentes elapídicas são as PLA<sub>2</sub> e as toxinas 3-Ftx. Como já citado, esses constituem-se nas moléculas mais abundantes dessas peçonhas, sendo a última classe o objeto de estudo desse trabalho, merecendo destaque.

### 1.3.2.1. Fosfolipases A<sub>2</sub> secretórias das serpentes elapídicas

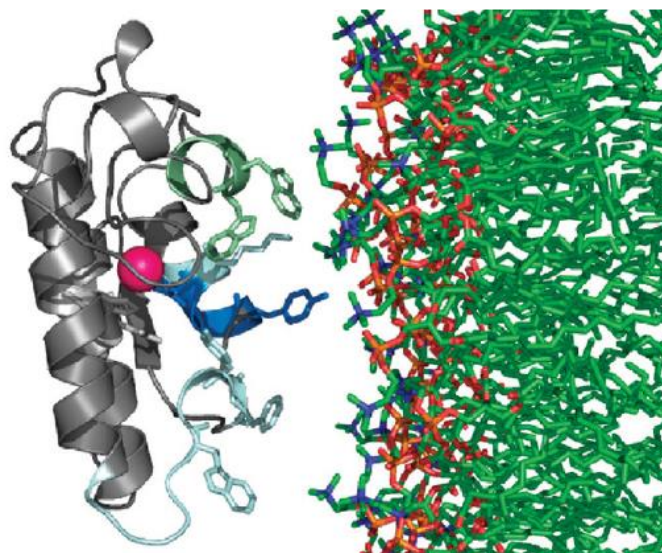
As PLA<sub>2</sub> compreendem uma superfamília de enzimas que hidrolisam os ácidos graxos a partir da posição *sn*-2 dos fosfolipídios de membrana (especificamente na ligação 2-acil éster de fosfolipídios), liberando como produtos os lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (SIX e DENNIS, 2000). Um estudo *in vivo* mostrou que nessa posição, frequentemente estão presentes ácidos graxos poliinsaturados, e que, quando liberados podem ser metabolizados e formar eicosanóides além de outros mediadores lipídicos bioativos (BURKE e DENNIS, 2009). Logo, devido a grande diversidade, estas enzimas podem ser divididas em 15 grupos distintos, agrupados em quatro categorias: PLA<sub>2</sub> secretórias (sPLA<sub>2</sub>), citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), cálcio-independentes e fator de ativação plaquetário (PAF) acetil-hidrolases / lipídeos oxidados associados à lipoproteínas (Lp), que são classificadas de acordo com o mecanismo catalítico e características funcionais e estruturais (BURKE e DENNIS, 2009). Estruturalmente, podem possuir um resíduo de aspartato na posição 49 (D49) ou um resíduo de lisina (K49). As D49 são enzimaticamente ativas e as K49 apresentam atividade enzimática reduzida ou ausência de atividade (OWNBY et al., 1999).

As PLA<sub>2</sub> secretórias foram as primeiras a serem descobertas. Durante muito tempo foram consideradas como enzimas digestórias, todavia, posteriormente foram localizadas em alguns tecidos não-digestórios de mamíferos como pulmão, baço e plasma sanguíneo. Portanto, outras funções celulares foram atribuídas a estas, como atuar na proliferação celular e na contração do músculo liso (LAMBEAU et al., 1995).

Essas enzimas estão presentes em venenos de diferentes clados animais, como nos artrópodes (escorpião e abelha) e serpentes (Viperidae e Elapidae) (MURAMAKI et al., 2011). Nas serpentes as sPLA<sub>2</sub> são sintetizadas nas glândulas de peçonha e aparecem em muitas espécies como componentes majoritários. Nas serpentes elapídicas estão presentes as sPLA<sub>2</sub> do grupo I (GI) diferindo daquelas das serpentes viperídicas, que são do grupo II (GII). sPLA<sub>2</sub> caracterizam-se por possuírem baixa massa molecular (13-18 kDa), um resíduo de histidina no sítio catalítico, um sítio ativo para a ligação ao cálcio (Ca<sup>2+</sup>), assim como seis pontes dissulfeto conservadas, com uma ou duas pontes variáveis (Fig. 7). As sPLA<sub>2</sub> de serpentes apresentam características em comum com as de mamíferos, como o mecanismo catalítico, a dependência de Ca<sup>2+</sup> e as estruturas primária e terciária (HANASAKI, 2004; LAMBEAU et al., 1995).

As sPLA<sub>2</sub> GI das serpentes elapídicas apresentam similaridade estrutural com as enzimas pancreáticas de mamíferos e receberam a classificação de grupo IA e IB, (BURKE e DENNIS, 2009). Por outro lado, as sPLA<sub>2</sub> GII são do tipo inflamatória, por serem expressas e induzidas por agentes pró-inflamatórios como interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral, além de serem inibidas por glicocorticóides (LAMBEAU et al., 1995).

Sobre o mecanismo de ação da categoria sPLA<sub>2</sub> associado à atividade enzimática fosfolipásica, sabe-se que todas catalisam a hidrólise através do mecanismo de captação de um próton a partir de uma molécula de água, seguida por um ataque nucleofílico sobre a ligação *sn*-2. A molécula de água é ativada por uma histidina / ácido aspártico de modo Ca<sup>2+</sup> dependente (YU e DENNIS, 1991 *apud* BURKE et al., 2009).



**Figura 7: Modelo representativo da ligação dos fosfolípidos de membrana com uma sPLA<sub>2</sub> do grupo IA da serpente elapídica *Naja m. mossambica*. Em rosa encontra-se a ligação do Ca<sup>2+</sup> ao sítio ativo da enzima, que contém os resíduos de aminoácidos His-48 e Asp-93. Os resíduos aromáticos da enzima estão representados em azul. Na interface de ligação com a superfície da membrana estão presentes os resíduos Tyr-3, Trp-19, Trp-61, Phe-64 (Fonte: BURKE et al., 2009).**

Apesar do relatado até o momento, não se tem muita clareza sobre a função primária das sPLA<sub>2</sub> na sinalização dos eicosanóides. Entretanto, foi sugerido que o papel pró-inflamatório dessas enzimas é controlado por eventos não dependentes de suas atividades enzimáticas (LAMBEAU et al., 1995). As sPLA<sub>2</sub> encontradas nas serpentes elapídicas australianas na sua maioria são enzimas básicas, com 118 resíduos de aminoácidos, 7 pontes dissulfeto e massa molecular de 13 kDa. Apresentam duas atividades farmacológicas distintas, sendo uma potente atividade tóxica em neurônios pré ou pós-sinápticos, bloqueando a transmissão na junção neuromuscular; e outra

atividade enzimática fosfolipásica não-letal (FRY, 1999). Outro grupo, o terceiro em relação ao tipo de atividade, é composto pelas sPLA<sub>2</sub> hemotóxicas que bloqueiam alguns fatores da cascata de coagulação resultando em um desequilíbrio hemostático. Dessa classe, foram isoladas toxinas de *Austrelaps superbis* (Lowland copperhead) com 15 kDa, Superbins I e II, duas enzimas anticoagulantes. Outras toxinas promotoras de hemorragia e hipotensão foram caracterizadas de *Notechis s. scutatus*, as toxinas Ht<sub>a-1</sub>, estas proteínas ácidas apresentam MM=12-14 kDa, sendo algumas atípicas com MM=18-21 kDa (FRANCIS, WILLIAMS e SEEBART, 1993).

Dessa mesma classe de fosfolipases, Francis e col. (1997) identificaram uma sPLA<sub>2</sub> da elapídica americana *M. f. frontalis*, com MM= 18-22 kDa, característica de PLA<sub>2</sub> que tem uma  $\alpha$ -hélice D, similar às pancreáticas tipo IB, mostrando atividade hemorrágica em camundongo de modo similar ao apresentado pelas toxinas de *N. scutatus*.

O quarto grupo são as sPLA<sub>2</sub> com atividade miotóxica que também foram caracterizadas nas peçonhas das serpentes australianas. Diferente das outras serpentes elapídicas, a peçonha da serpente *Pseudechis australis* é primariamente miotóxica, causando lesões teciduais nas fibras musculares e necrose devido às sPLA<sub>2</sub> presentes (Pa-1G, Pa-5, Pa-12C e Pa-15). Essas são proteínas homólogas, de cadeia única, básicas (exceto a Pa-1G), com atividade pós-sináptica. Algumas toxinas miotóxicas dessa serpente (Pa-3, Pa-8, Pa-9C, Pa-10F, Pa-12B) são isozimas bloqueadoras da condutância ao íon potássio (K<sup>+</sup>) não pela seletividade ao íon, mas pela alteração da condutância de membrana (FATEHI et al, 1994 *apud* FRY, 1999).

O último e quinto grupo mais comum é o que possui as sPLA<sub>2</sub> com atividade neurotóxica. Esse é composto por toxinas de cadeia única ou complexos de multicadeias. Dentre as toxinas de cadeia única, pode ser citada a Notexina, principal sPLA<sub>2</sub> neurotóxica e miotóxica de *Notechis* sp. Das toxinas com multicadeias, a Taipoxina é composta por 03 cadeias peptídicas (alfa, beta e gama) relacionadas à fosfolipase, com MM= 45,6 kDa. A cadeia alfa é uma potente bloqueadora da liberação pré-sináptica de acetilcolina (FOHLMAN et al., 1977 *apud* FRY, 1999).

Essas sPLA<sub>2</sub> que apresentam atividade pré-sináptica são denominadas de  $\beta$ -neurotoxinas (HODGSON, 2006). Das serpentes elapídicas asiáticas, a *Bungarus* sp. (kraits) possui em sua peçonha uma sPLA<sub>2</sub> neurotóxica com ação pré-sináptica, a  $\beta$ -bungarotoxina, compreendendo a sua maior fração e essa é a principal responsável pela



paralisia severa resultante do envenenamento (PRASARNPUN, AWAD e HARRIS, 2005).

Os estudos bioquímicos das peçonhas de algumas corais, possibilitaram a caracterização de sPLA<sub>2</sub>, tais como a de *M. fulvius microgalbineus*, com 119 resíduos de aminoácidos e MM= 13,22 kDa (POSSANI et al., 1979). Rosso e col. (1996) isolaram 05 sPLA<sub>2</sub> das serpentes *M. nigrocinctus*, *M. alleni yatesi* e *M. multifasciatus*. Alape-Girón e cols. (1996) caracterizaram 05 sPLA<sub>2</sub> (Nigroxina A, B, C1, C2 e C3, sendo a última isozima) da peçonha de *M. n. nigrocinctus*.

No século XXI, com o aprimoramento de técnicas e tecnologia de espectrometria de massas, sequenciamento protéico e cromatografias, desenvolveram-se trabalhos no intuito de traçar os perfis proteômicos das peçonhas de diferentes espécies de *Micrurus*. Os resultados mostram a distribuição e a diversidade das sPLA<sub>2</sub> e demais constituintes dessas peçonhas.

Uma sPLA<sub>2</sub> (15,5 kDa) da serpente *M. dumerilii carinicauda* foi caracterizada bioquímica e farmacologicamente mostrando que essa toxina apresenta atividade pré-sináptica bloqueando a atividade neuromuscular de preparos nervo-músculo de vertebrados (DAL BELO et al., 2005).

Duas sPLA<sub>2</sub> (Mlx-8 e Mlx-9), com MM= 13-14 kDa, foram isoladas de *M. lemniscatus* e, de modo pioneiro, estudos farmacológicos foram realizados com estas moléculas no SNC de ratos quando injetadas intrahipocampus de modo que induziram alterações eletroencefalográficas e motoras, além de degenerações neuronais em ratos (OLIVEIRA et al., 2008).

OLAMENDI-PORTUGAL e cols. (2008) estudaram o proteoma da peçonha da *M. surinamensis* e detectaram a presença de 16 moléculas com MM= 12-14 kDa. Dokmetjian e col. (2009) caracterizou o N-terminal de 04 sPLA<sub>2</sub> com MM= 12-14 kDa da peçonha de *M. pyrrhocryptus*. Rey-Suárez e col. (2011) relataram que na peçonha de *M. mipartitus*, 30 % dos componentes são sPLA<sub>2</sub>. Já o nosso grupo estudou o proteoma de quatro espécies distintas, *M. frontalis*, *M. spiixi*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*, mostrando a presença das moléculas com MM= 12-14 kDa; 14-16 kDa; 16-18 kDa em diferentes proporções de maneira distinta, entre as espécies. O sequenciamento parcial de algumas destas moléculas foi realizado (CISCOTTO et al., 2011).

O transcriptoma da glândula de peçonha de *M. n. nigrocinctus* mostrou que essas enzimas representam 48% da peçonha bruta com MM= 14 e 16 kDa, seguida das toxinas de 3-Ftx (38%) (FERNÁNDEZ et al., 2011). Já o transcriptoma da glândula de

*M. corallinus* apontou a presença de 33,3% dessas moléculas na peçonha dessa serpente (LEÃO, HO e JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009). O trabalho de Corrêa-Neto e col. (2011) mostrou que na peçonha de *M. altirostris* foram identificadas 13 sPLA<sub>2</sub>, o que correspondeu a 13,7 % do total da peçonha. Três destas toxinas foram sequenciadas, além de uma nova toxina de *M. corallinus*.

Uma sPLA<sub>2</sub> básica de *M. corallinus* foi clonada a partir da glândula de peçonha da serpente utilizando-se o vetor pRSET-C e expressa em *Escherichia coli* BL21, mostrando a presença de 119 resíduos de aminoácidos e MM= 12,75 kDa. (OLIVEIRA, ASSUI e SILVA, 2003).

Nas serpentes, as sPLA<sub>2</sub> apresentam como função primária a digestão das presas. Todavia, apresentam-se também como potentes toxinas com atividades farmacológicas distintas, descritas anteriormente. A diversidade dos efeitos patológicos dessas moléculas ocorre, provavelmente, devido a um mecanismo farmacológico mediado pela ligação dessas moléculas aos seus receptores específicos de membrana.

O primeiro tipo de receptor de sPLA<sub>2</sub> foi identificado no cérebro, sendo denominando de receptor sPLA<sub>2</sub> do tipo-N (neuronal). Esse receptor reconheceu, com grande afinidade, toxinas dessa categoria, isoladas da serpente elapídica *Oxyuranus scutellatus* (OS2), de abelhas e a neurotoxina de *Naja m. mossambica* (CM-III). Mas, esse receptor não apresentou grande afinidade para a sPLA<sub>2</sub> de pâncreas suíno. O segundo tipo de receptor foi isolado de músculo esquelético de coelho, e portanto denominado de receptor sPLA<sub>2</sub> do tipo-M (músculo). Esse receptor apresentou alta afinidade para as toxinas OS1 e OS2, a sPLA<sub>2</sub> de pâncreas suíno e as GII (LAMBEAU et al., 1995).

Os receptores de sPLA<sub>2</sub> receberam uma nomenclatura universal de PLA<sub>2</sub>R, além de terem sido melhores descritos do ponto de vista bioquímico e farmacológico. Esses receptores foram identificados por se ligarem às sPLA<sub>2</sub> tipo IB (pancreáticas de mamíferos) e são abundantes no trato gastrointestinal em que participam da digestão de glicofosfolípídeos. São glicoproteínas transmembranares do tipo I, com MM= 180 kDa e, estruturalmente, são caracterizados por apresentarem uma grande porção extracelular contendo o N-terminal, rico em resíduos de cisteína, um domínio de fibronectina tipo II e uma repetição em tandem de 8 domínios para reconhecimento de carboidratos (CRDs), além de uma curta região intracelular contendo a porção C-terminal. A arquitetura completa desse receptor está relacionada ao receptor para manose em macrófagos e ao DEC-125 de células dendríticas (ambos membros da família do

receptor para a lectina C animal, subgrupo VI). Adicionalmente, dos oito domínios CRDs, o CRD3 ao CRD5 são os responsáveis pela ligação às sPLA<sub>2</sub> tipo IB (HANASAKI 2004).

Em humanos, os PLA<sub>2</sub>R são expressos em células epiteliais alveolares tipo II, em uma subpopulação de linfócitos esplênicos e os PLA<sub>2</sub>R1 (tipo M) em podócitos. A afinidade das sPLA<sub>2</sub> tipo IB para esses receptores é menor, em torno de 400 nM, quando comparada aos receptores presentes em roedores. Em contraste, ainda não foi observada a ligação das sPLA<sub>2</sub> tipo IIA nesses receptores (SCHLUMBERGER et al., 2014; HANASAKI, 2004).

Entretanto, os mecanismos de interação de sPLA<sub>2</sub> e seus receptores, assim como as atividades farmacológicas que medeiam a sintomatologia do envenenamento ainda estão longe de ser totalmente esclarecidos.

#### 1.3.2.2. Toxinas Três-dígitos ou “*Three-fingers toxins*”

Uma grande parte das toxinas que compõe as peçonhas das serpentes elapídicas (cobras, kraits, mambas e corais) são do tipo “*three-fingers toxins*” ou toxinas três-dígitos (3Ftx), que correspondem a uma família de polipeptídeos não-enzimáticos que contém de 60-74 resíduos de aminoácidos e apresentam massa molecular (MM) entre 6-9 KDa (CHANGEUX, 1990; DUFTON & HIDER, 1988). Também fazem parte do arsenal tóxico das serpentes hidrofídicas (serpentes marinhas), colubridicas (PAWLAK, et al., 2006), além de terem sido reportadas no transcriptoma de viperídicas e crotalídicas (PAHARI, MACKESSY, & KINI, 2007).

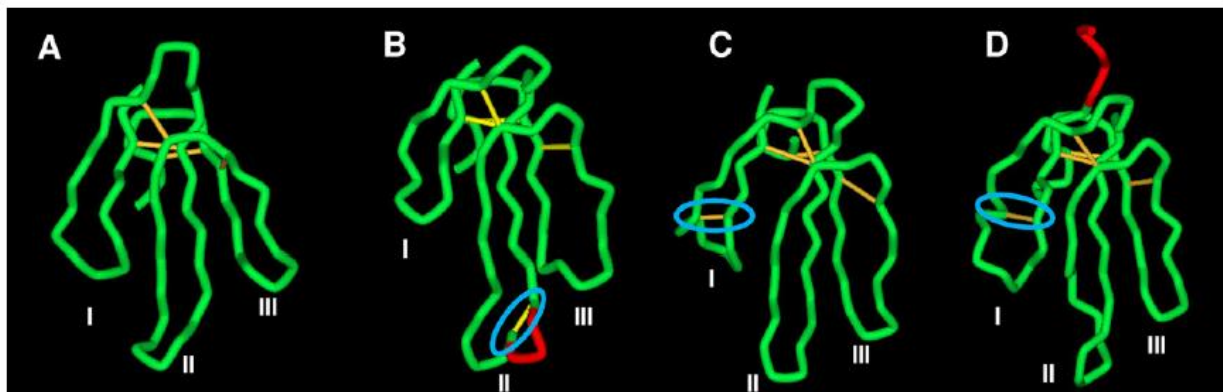
Estruturalmente, as 3-Ftx constituem moléculas planas, apresentando um núcleo hidrofóbico pequeno e globular de onde projetam-se três alças adjacentes, e assim assemelham-se a três dedos esticados da mão, e dessa forma denominadas três-dígitos ou três-dedos (figura 8). O núcleo hidrófobo contém quatro pontes dissulfeto formando uma espécie de “amarração”, que são ligadas de forma cruzada e transversal. Entre as três alças formam-se cinco folhas  $\beta$ , antiparalelas, que juntas constituem uma grande folha  $\beta$ -pregueada (BARBER, ISBISTER, & HODGSON, 2013). Similar a outras proteínas de peçonhas de serpentes são ricas em resíduos de cisteína, apresentando quatro ou cinco pontes dissulfeto, sendo quatro delas conservadas (KINI & DOLEY, 2010). Dos oito resíduos de cisteína conservados, quatro são na região do poro e constituem resíduos aromáticos (Tyr25 ou Phe27), que são importantes para a modelagem e estabilidade da folha antiparalela  $\beta$ -pregueada (TORRES et al., 2001). As

toxinas com quatro pontes dissulfeto representam as neurotoxinas de cadeia curta (figura 8-A) (KINI & DOLEY, 2010).

Algumas 3-Ftx apresentam a quinta ponte dissulfeto na alça (dígito) I ou II. A presença dessa ponte adicional na primeira alça causa torções na molécula e empurra a ponta da mesma para uma posição ortogonal (Fig.8 C-D). Um número de toxinas caracterizadas nessa categoria demonstraram fraca toxicidade, sendo então denominadas de “*weak neurotoxins*”. Apresentando como alvo farmacológicos os receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) periféricos, com afinidade de ligação em micromolar (POH et al., 2002). Contudo, trabalhos mais recentes mostraram toxinas dessa categoria com alta toxicidade e afinidade (nanomolar) aos nAChR (NIRTHANAN, et al., 2002). Essas toxinas exibem seletividade e especificidade diferentes, maiores que as neurotoxinas canônicas. Logo, Nirthanan e col. (2003) propuseram uma classificação alternativa para esse grupo de toxinas, chamando-as de “3-Ftx não-convencionais”. Como exemplo, podem ser citados um estudo *in vivo* com uma *weak* neurotoxina de *Naja kaoutria*, que induz sintomas de intoxicação de agonistas muscarínicos (MORDVINTSEV et al., 2007). E outro estudo, demonstrando que esta mesma toxina interage ortostericamente com os nAChR e alostericamente com os receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR) (MORDVINTSEV et al., 2009).

A quinta ponte dissulfeto ligada na segunda alça, introduz uma volta e a formação de um segmento curto helicoidal, que é típico dessa alça (Fig 8-B) em neurotoxinas (NTXs) de cadeia longa e  $\delta$ -neurotoxinas (KINI & DOLEY, 2010). Essas toxinas são capazes de se ligar aos receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR)  $\alpha 7$ , específicos de neurônios. A remoção dessa ponte dissulfeto afetou a habilidade da toxina em se ligar aos nAChR neuronais, mas não aos periféricos (SERVENT et al., 1997).

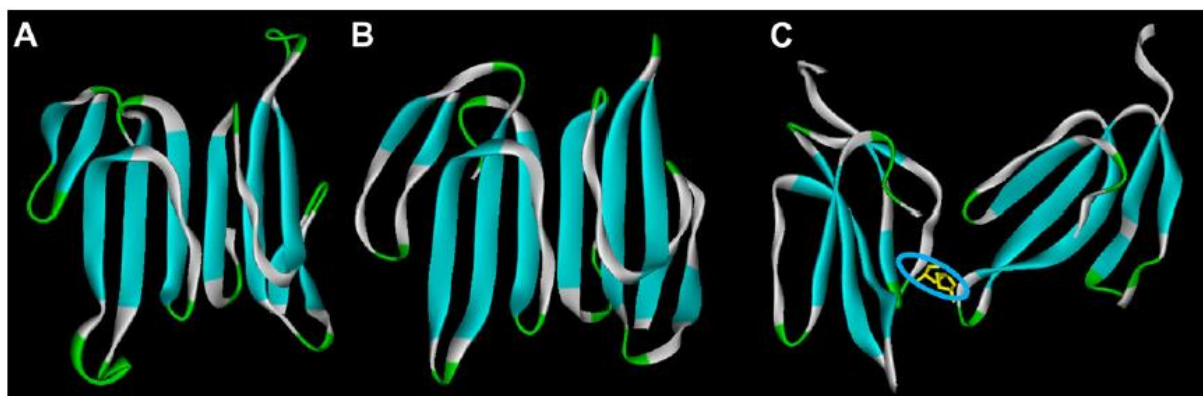
Algumas 3-Ftx possuem um N-terminal longo e uma extensão do C-terminal. Todas as 3-Ftx das serpentes Colubridae apresentam o acréscimo de sete resíduos de aminoácidos no N-terminal protegidos por um ácido piroglutâmico, entretanto, ainda sem descrição funcional (PAWLAK et al., 2006). Todas as NTXs de cadeia longa apresentam de 2 a 9 resíduos de aminoácidos adicionais no C-terminal, que se estende do topo da molécula. Na toxina hannalgesina (isolada de *O. hannah*), por exemplo, apresenta um papel importante para atividade analgésica. Foi demonstrado por modelagem molecular que esse segmento tem formato helicoidal (Figura 8-B) e é rico em resíduos de prolina (KINI & DOLEY, 2010).



**Figura 8:** Estrutura tridimensional de toxinas três-dígitos (3-Ftx) mostrando as alças (dígitos) e as pontes dissulfeto. A) Erabutoxina, 3-Ftx de cadeia curta; B)  $\kappa$ -bungarotoxina, 3-Ftx de cadeia longa com a quinta ponte dissulfeto na segunda alça; C) Cadoxina, 3-Ftx não convencional; D) Denmotoxina, 3-Ftx não convencional com o N-terminal extenso em vermelho (KINI & DOLEY, 2010).

Outras modificações estruturais foram observadas nessa família de toxinas 3-Ftx. Como exemplo, a glicosilação (uma modificação pós-traducional) que ocorre em uma citotoxina do tipo 3, isolada da Thai cobra (*Naja kauthia*), cuja função foi modular a toxicidade *in vivo* apresentada por essa molécula (OSIPOV et al., 2004).

Um outro exemplo seria a presença de 3-Ftx formando dímeros não-covalentes, como foi observado primeiramente com as  $\kappa$ -bungarotoxinas (CHIAPPINELLI, 1983), que formam dímeros antiparalelos entre a folha externa e a terceira alça, em que os aminoácidos Phe e Ile apresentam papel fundamental para a formação do dímero (figura 9-A). Essa toxina se liga aos nAChR  $\alpha_3\beta_2$  neuronais, sendo a formação do dímero crucial para a interação com o receptor (OSIPOV, et al., 2008). Ou ainda dímeros covalentes, como ocorre com a irditoxina (figura 9-C), isolada da peçonha de *Boiga irregularis* (serpente Colubridae), apresentando 11 resíduos de cisteína sendo esse resíduo adicional importante na formação de uma ponte dissulfeto entre as subunidades. Essa toxina atua como uma NTX potente (PAWLAK et al., 2008). Também foram reportados homodímeros de  $\alpha$ -cobrotoxina e heterodímeros de  $\alpha$ -cobrotoxina e citotoxinas (OSIPOV et al., 2008), o que mostra a versatilidade estrutural e conseqüentemente funcional dessas moléculas.



**Figura 9: Modelagem molecular de toxinas three-fingers que formam dímeros. Em A e B, toxinas formando dímeros não-covalentes, com as subunidades anti-paralelas, sendo A)  $\kappa$ -bungarotoxina e B) haditoxina. Em C a irditoxina, formando dímero covalente (KINI & DOLEY, 2010).**

Esse grupo de proteínas apresenta efeitos tóxicos potentes e uma grande diversidade de propriedades biológicas. Em complemento, o estudo com essas toxinas têm contribuído para a compreensão dos mecanismos de toxicidade ocasionados pelo envenenamento de diferentes espécies de serpentes elapídicas.

Os membros dessa família de toxinas incluem as neurotoxinas, que atuam interferindo na transmissão colinérgica em vários sítios pós-sinápticos do SNP e SNC (CHANGEUX, 1990). Baseada na seletividade aos seus receptores, elas podem ser classificadas como curaremiméticas (com sintomas similares à síndrome curariforme) ou  $\alpha$ -neurotoxinas ( $\alpha$ -NTX), que funcionam como antagonistas dos nAChR  $\alpha 1$  muscular, inibindo a ligação da acetilcolina ao receptor (BARBER, ISBISTER, & HODGSON, 2013; CHANGEUX, 1990). Nesse grupo das  $\alpha$ -NTXs fazem parte as duas classes distintas: a classe com 60-62 resíduos de aminoácidos denominadas de “toxinas de cadeia-curta” (*short-chain toxins*), com quatro pontes dissulfeto; outra com 70-74 resíduos de aminoácidos, denominadas de “toxinas de cadeia-longa” (*long-chain toxins*), com cinco pontes dissulfeto (TSETLIN & HUCHO, 2004). As  $\alpha$ -NTXs de cadeia longa ainda podem ser ligar aos nAChR  $\alpha 7$ , neuronais (SERVENT, et al., 1997).

Estudos envolvendo NTXs de diferentes serpentes elapídicas têm sido promissores na medicina, uma vez que NTXs se mostraram com atividade antinociceptiva. Algumas toxinas isoladas das peçonhas de *Naja* sp. demonstrou significativo efeito analgésico em modelos animais. Cobrotoxina ( $\alpha$ -NTX de cadeia curta) e  $\alpha$ -cobratoxina ( $\alpha$ -NTX de cadeia longa) isoladas de *Naja atra* apresentaram efeito analgésico (CHEN, et al., 2006), e uma  $\alpha$ -NTX de *Ophiophagus hannah* (PU & WONG, 1995) está sendo utilizada como potente analgésico e pode substituir a morfina

e suprimir seus efeitos indesejáveis. Um trabalho com as toxinas cobrotoxina e  $\alpha$ -cobrotoxina foi realizado com ensaios *in vivo* em animais roedores utilizando modelos comportamentais para nocicepção, tais como os Testes da Placa quente e do Ácido acético. Os resultados obtidos foram um forte efeito analgésico central, com efeito dose-dependente e independente da via opióide (CHEN et al., 2006).

Outras NTXs são as  $\kappa$ -toxinas, que se ligam especificamente ao nAChR  $\alpha 3\beta 4$  ou aos  $\alpha 4\beta 2$  neuronais, e possuem cinco pontes dissulfeto) (GRANT, 1985 *apud* KINI, 2002). São toxinas que apresentam cinco pontes dissulfeto, similares às toxinas de cadeia longa. Algumas também podem existir em dímeros (BARBER, ISBISTER, & HODGSON, 2013; KINI & DOLEY, 2010)

O último componente do grupo das NTXs são as toxinas muscarínicas (MTs), que se ligam com alta especificidade aos mAChR e são similares às  $\alpha$ -NTX de cadeias curtas (KARLSSON, et al., 2000). As MTs têm sido isoladas principalmente das peçonhas elapídicas africanas e australianas, apresentam uma variedade de funções farmacológicas no sistema colinérgico muscarínico atuando como antagonistas competitivos, moduladores alostéricos ou agonistas, além de possuírem alta afinidade aos subtipos distintos de mAChR (SERVENT & FRUCHART-GAILLARD, 2009; KARLSSON, et al., 2000).

Trabalhos com toxinas muscarínicas (MTs) de peçonhas das serpentes elapídicas australianas com ação sobre os mAChR do SNC (KARLSSON, et al., 2000), como as toxinas  $MT\alpha = 7.543,2$  Da e  $MT\beta = 7.336,7$  Da (JOLKKONEN, et al., 1995) apresentaram grande relevância na compreensão de alguns mecanismos farmacológicos associados a algumas doenças neurodegenerativas. Estudos com MT em hipocampo de pacientes pós-morte com Alzheimer revelaram que o número mAChR do subtipo M4 encontra-se reduzido nas regiões do giro denteado e CA4, o que possivelmente leva ao comprometimento das funções cognitivas na doença de Alzheimer (MULUGUETA et al., 2003). Em complemento, um trabalho anterior com a toxina muscarínica MT3 isolada de *Dendroaspis angusticeps* (green mamba) em ensaios comportamentais mostraram que o bloqueio dos mAChR M4 por essa toxina prejudicou a memória dos animais (JERUSALINSKY et al., 1998).

As fasciculinas compreendem a classe da 3-Ftxs que inibem a atividade da enzima acetilcolinesterase (MARCHOT et al., 1997), impedindo a entrada da acetilcolina no sítio ativo da enzima, e conseqüentemente, disponibilizando mais acetilcolina na junção neuromuscular. Isso provoca a fasciculação no músculo. Essas

toxinas também são isoladas das serpentes *Dendroaspis* sp. (mambas) (KINI & DOLEY, 2010).

A segunda maior classe de 3-Ftx compreende a das cardiotoxinas (citotoxinas). Estruturalmente, assemelham-se às  $\alpha$ -NTXs de cadeia curta, com 59 a 62 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto (BILWES et al., 1994; DUFTON et al. 1988). Farmacologicamente, baixas concentrações de cardiotoxinas aumentam os batimentos cardíacos, enquanto que altas concentrações geram parada cardíaca, causando a morte. Entretanto, não foi identificado um alvo farmacológico dessas toxinas em cardiomiócitos (DUFTON & HIDER, 1988). Um grande número de toxinas dessa classe também causa toxicidade por formar poros na membrana, e dessa forma, recebendo a denominação de citotoxinas (BILWES, et al., 1994).

As  $\beta$ -cardiotoxinas correspondem a uma nova classe de 3-Ftx isolada de *O. hannah* que apresentaram atividade  $\beta$ -bloqueadora. Apresentam similaridade com as cardiotoxinas em cerca de 55 %, causando bradicardia de modo concentração-dependente, além de apresentarem baixa toxicidade. Apresentam como alvo farmacológico os receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  adrenérgicos. (RAJAGOPALAN et al., 2007). Essa classe é muito promissora para a bioprospecção de fármacos.

Outras classes de 3-FTx são as toxinas calciseptina (DE WEILLE et al., 1991) e a FS2, que apresentam similaridade estrutural às -NTXs de cadeia curta e bloqueiam seletivamente os canais  $Ca_v$  do tipo-L, se ligando ao sítio da 1,4 dihidropiridina e impedindo a entrada de cálcio (YASUDA, et al., 1993).

Dois 3-Ftx constituem uma classe de toxinas que inibem a agregação plaquetária. A dendroaspina ou mambina, isolada de *D. jamensoni*, que apresenta uma sequência de três resíduos de aminoácidos Arg-Gly-Asp, envolvida na adesão de algumas proteínas (McDOWELL, et al., 1992). Acredita-se que essa toxina atue interferindo com a interação entre o fibrinogênio e o receptor de glicoproteína IIB-IIIa. Em 2004, Shiu e col. isolou outra toxina dessa classe da peçonha da serpente *B. multicinctus* (SHIU et al., 2004).

Alguns trabalhos com toxinas 3-Ftx isoladas de serpentes elapídicas americanas do gênero *Micrurus* sp. revelaram algumas atividades farmacológicas dessa superfamília de toxinas.

Em 2008, um trabalho com toxinas 3-FTx isoladas de *M. surinamensis* realizou ensaios farmacológicos com seis dessas toxinas, denominadas de Ms 1, 2, 3, 4, 5 e 11 (MM= 6.553; 7.299; 6.938; 7.303; 7.178; 6.671 Da, respectivamente). Apenas as



toxinas Ms 1 e 3 mostraram-se letais quando injetadas em camundongos (1 µg/g). Nos ensaios eletrofisiológicos de *whole cell patch-clamp*, em linhagem celular TE671, de rabdiosarcoma de humanos, as toxinas Ms 1, 3 e 11 caracterizadas como  $\alpha$ -NTXs de cadeia curta inibiram por completo as correntes para sódio geradas na presença de 10 µM de acetilcolina; enquanto que das toxinas Ms 2, 4 e 5 caracterizadas como  $\alpha$ -NTXs de cadeia longa, apenas as toxinas Ms 4 e 5 reduziram essas correntes (OLAMENDI-PORTUGAL et al., 2008).

Na minha dissertação de mestrado, em 2008, trabalhei com a caracterização bioquímica da peçonha de *M. ibiboboca* e isolei uma 3-Ftx denominada Mic6c7NTX, com massa de 7.047 Da, que apresentou similaridade de sequência com outras toxinas elapídicas 3-Ftx do tipo  $\alpha$ -NTXs de cadeia curta. Essa toxina foi avaliada no SNP de ratos através de ensaios eletrofisiológicos pelas técnicas de *single sucrose gap*, com o nervo ciático isolado de rato e *whole cell patch-clamp* em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) de diâmetro pequeno, em cultura. Os resultados observados foram uma redução em 20 % do potencial de ação composto do nervo ciático promovido por 1 µM de toxina. Nos neurônios periféricos DRG essa mesma concentração aboliu completamente a corrente para sódio dos canais sensíveis (Nav 1.1 a 1.7) e resistentes (Nav 1.8 e 1.9) à tetrodotoxina presentes nesses neurônios. A inibição dessas correntes foi dependente de concentração e irreversível, sendo a IC<sub>50</sub> de 30 nM. Os resultados mostraram que essa toxina pode ser uma forte candidata para os estudos relacionados à nocicepção (DONATO, 2008).

Moreira e col. (2010) isolaram seis 3-Ftx da peçonha de *M. frontalis*, denominadas de frontoxinas FTx I, II, III, IV, V e VI (MM= 6.642; 6.548; 7.032; 7.411; 7.166; 7.327 Da, respectivamente). Foram realizados ensaios eletrofisiológicos nos terminais de placa motora da junção neuromuscular de anfíbio (*Rana catesbeiana*) com as toxinas FTx II, III e IV. Os resultados mostraram que as toxinas reduziram os potenciais de placa motora em miniatura (MEPS) de modo concentração-dependente, entretanto, as FTx II e III apresentaram alta toxicidade, quando comparada à FTx IV. Através da análise comparativa das sequências protéicas com outras NTXs, os autores propuseram que FTx I-III correspondem a  $\alpha$ -NTXs de cadeia curta, enquanto que as FTx IV e V corresponderiam às  $\alpha$ -NTXs de cadeia longa.

Um trabalho pioneiro proteômico com a peçonha da *M. nigrocinctus* de FERNÁNDEZ e col. (2011), demonstrou a presença de MTs na peçonha das elapídicas americanas *Micrurus* sp (corais verdadeiras). Através de alinhamentos de sequências de

proteínas em bancos de dados proteômicos, eles identificaram similaridade na estrutura primária de três 3-Ftx isoladas por cromatografia líquida de fase reversa e sequenciadas por espectrometria de massas pelo método de sequenciamento *de novo*, com massas moleculares de 7,99; 7,18; 7,16 kDa.

A primeira MT isolada da peçonha de *M. lemniscatus*, denominada de MT-M1 $\alpha$  (7.048 Da), apresentou resíduos do N-terminal com os aminoácidos *LICFICFSPTAH*, alinhados com toxinas de outras *Micrurus* sp. Ensaio de competição com radioligantes colinérgicos muscarínicos em membrana de hipocampo apontaram que a toxina MT-M1 $\alpha$  nas concentrações de  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$ M apresentou dois sítios de ligação distintos em hipocampo por competir com o [ $^3$ H] QNB, com  $pK_i = 9,08 \pm 0,67$  e  $6,17 \pm 0,19$ , além de causar um bloqueio dose-dependente do acúmulo de [ $^3$ H] fosfato de inositol induzido por  $10^{-5}$ M de carbacol, mostrando um possível antagonismo sobre os mAChR de hipocampo de rato (DA SILVA, et al., 2011).

No trabalho doutorado de Ciscotto (2011) foram realizados ensaios de citotoxicidade com duas toxinas 3-FTx isoladas de *M. lemniscatus* (M16435 e M16504) em formas promastigotas de *Leishmania l. amazonensis* e macrófagos isolados de camundongos BALB/c. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular por MTT. Foram utilizadas duas concentrações de 25 e 50  $\mu$ g/ml de ambas as 3-Ftx, que mostraram-se mais tóxicas às células promastigotas de *Leishmania l. amazonensis* do que aos macrófagos de modo concentração-dependente. Na concentração mais alta a toxina M16435 causou 49 e 14,7% de morte, enquanto que a toxina M16504 foi responsável por 38 e 7,1 % de morte em promastigotas e macrófagos, respectivamente. Isso mostra uma especificidade dessas toxinas às células parasitárias.

Apesar de se mostrar promissora a exploração dessa classe de proteínas presentes nas peçonhas de *Micrurus* sp., poucos trabalhos ainda têm sido desenvolvidos tendo em vista a complexidade para a purificação dessas moléculas em associação ao baixo rendimento após várias etapas de cromatografias.

#### **1.4. O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E A COMUNICAÇÃO SINÁPTICA QUÍMICA**

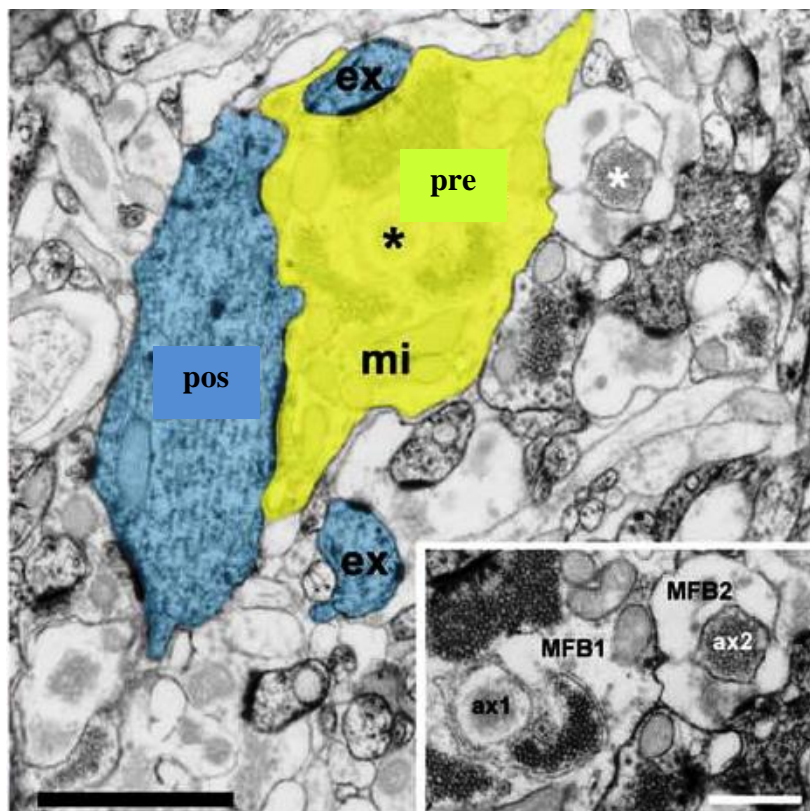
A Neurociência teve os seus primórdios no final do século XIX, quando Camillo Golgi e Santiago Ramón y Cajal fizeram as primeiras descrições detalhadas das células

nervosas. Uma vez que Golgi conseguiu corar os neurônios com sal de prata e por microscopia óptica, descobriu toda a arquitetura neuronal, isto possibilitou a Ramón y Cajal descrever os primórdios dos conceitos-chave para a “doutrina do neurônio”, em que afirmou que os neurônios individuais consistem nos elementos fundamentais de todo o sistema nervoso. Ainda nesse mesmo século, utilizando-se a eletrofisiologia moderna estas células foram estudada por três fisiologistas alemães: Emil DuBois-Reymond, Johannes Müller e Hermann von Helmholtz, que conseguiram provar que a atividade elétrica de uma célula nervosa afeta a atividade elétrica da célula adjacente de modo previsível. E os três farmacologistas: Claude Bernard (França), Paul Ehrlich (Alemanha) e John Langley (Inglaterra) criaram a teoria do receptor que serviu de base química para a comunicação entre células nervosas. Contudo, foi na década de 1920 (século XX), que o embriologista norte americano Ross Harrison forneceu as bases experimentais que complementaram essa doutrina, observando que as projeções principais dos neurônios compreendiam os dendritos e axônio, além de perceber que essas células são isoladas umas das outras, sem haver um contato direto (com exceção das sinapses elétricas que só foram descobertas mais adiante) (KANDELL, SCHUWARTZ, & JESSEL, 2003).

Somente nos últimos 60 anos, com a introdução da microscopia eletrônica e técnicas relacionadas às resoluções subcelulares e celulares é que foi possível realizar uma caracterização refinada da morfofisiologia e neuroquímica dessa comunicação entre neurônios denominada de sinapse (ROLLENHAGEN & LÜBKE, 2006). Durante esse tempo, as sinapses foram objetos de estudos de muitos pesquisadores que exploraram áreas e sinapses específicas do SNC. Os primeiros estudos compreenderam as sinapses hipocâmpais, como as da região CA1 em neurônios piramidais (HARRIS & SULTAN, 1995; HARRIS & STEVENS, 1989) e a dos botões sinápticos das fibras musgosas (CHICUREL & HARRIS, 1992). Logo, morfológicamente, os neurônios passaram a ser caracterizados por quatro regiões, sendo o corpo celular (soma) o centro metabólico de onde se originam os dendritos, curtos; um axônio longo e tubular; e no final do axônio originam-se os terminais pré-sinápticos, que são os locais de sinapses (KANDELL, SCHUWARTZ, & JESSEL, 2003).

O termo “sinapse” foi criado por Charles Sherrington e por Ramón y Cajal. As sinapses compreendem a base da transdução de sinais e plasticidade no cérebro. O complexo sináptico (Figura 10) é caracterizado por um terminal pré-sináptico e um alvo pós-sináptico que implica em um corpo celular de neurônio, eixo ou espinhas

dendríticas. Os terminais pré-sinápticos apresentam algumas estruturas como retículo endoplasmático, mitocôndrias, vesículas sinápticas e especializações de membrana que localizam-se entre as regiões pré e pós-sinápticas e são determinantes para o estabelecimento dessas conexões (ROLLENHAGEN & LÜBKE, 2006).



**Figura 10:** Imagem de microscopia eletrônica de uma sinapse excitatória em hipocampo. A foto mostra os terminais de duas fibras musgosas da região CA3 de hipocampo, sendo MFB2 pré-sináptico (pre) e MFB1 pós-sináptico (pos), com ênfase nos axônios 2 (ax2) e 1 (ax1) representados no inserto e na figura maior pelos asteriscos branco e preto, respectivamente, e nas espinhas dendríticas (ex) e mitocôndrias (mi). Bar 1 µm. *Adaptado de:* (ROLLENHAGEN & LÜBKE, 2006).

As sinapses só ocorrem quando é gerado um potencial de ação (PA) no neurônio pré-sináptico, estes são sinais elétricos pelos quais o sistema nervoso recebe, analisa e transmite informações. Esses PAs são iniciados, geralmente, em uma região de disparo no início do axônio, denominada de segmento inicial, e são conduzidos ao longo dessa região sem falha ou distorção, numa velocidade de 1 a 100 m/s, uma vez que são do tipo tudo-ou-nada (KANDELL, SCHUWARTZ, & JESSEL, 2003).

Quando o PA de ação é deflagrado no neurônio pré-sináptico ocorre a abertura dos canais para sódio voltagem-dependentes ( $Na_v$ ) presentes na membrana, e consequente entrada de íons sódio, que ao atingirem o terminal sináptico desencadeiam a abertura de canais  $Ca_v$  promovendo o aumento transitório da concentração de íons

cálcio. Nas sinapses químicas, o cálcio é essencial para ocorrer a fusão das vesículas sinápticas à membrana pré-sináptica e subsequente exocitose com liberação de moléculas químicas, os neurotransmissores, que são os responsáveis pela continuação da comunicação neuronal (KANDELL, SCHUWARTZ, & JESSEL, 2003; BAJJALIEH & SCHELLER, 1995; KATZ & MILEDI, 1970).

Os aminoácidos constituem a classe predominantemente responsável pela transmissão sináptica rápida no SNC de mamíferos, logo o glutamato, aspartato e glicina desempenham inúmeras funções metabólicas no SNC, sendo o GABA e o glutamato duas ou três vezes mais concentrados no cérebro do que os neurotransmissores (NTs) noradrenalina e acetilcolina (NICHOLLS, 1995).

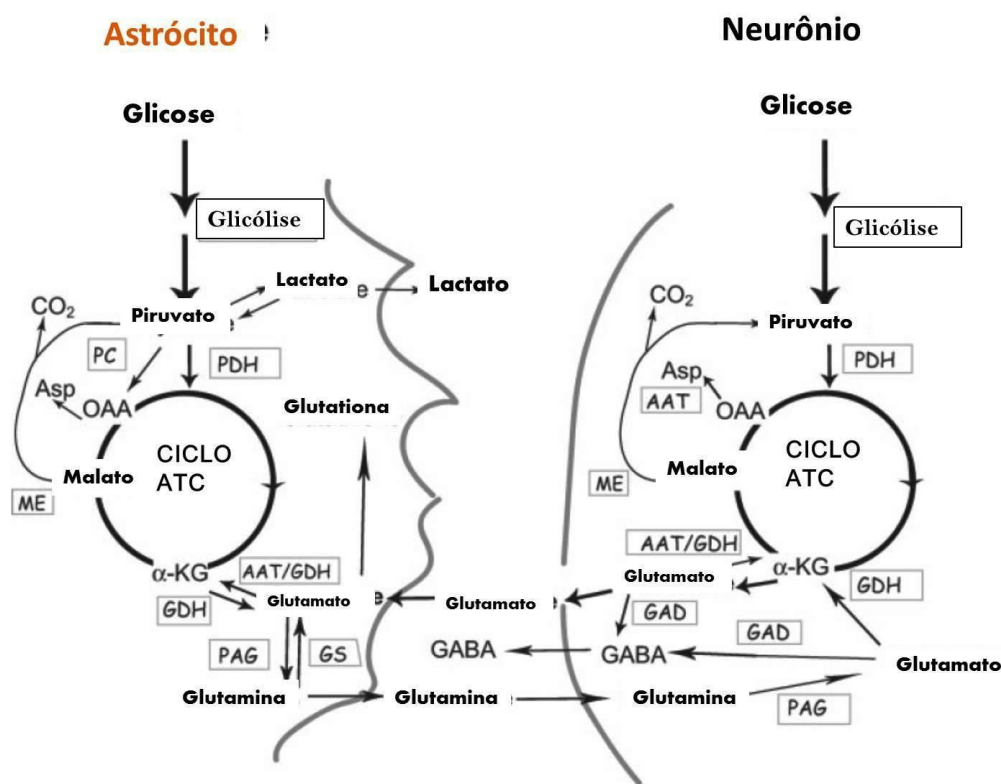
Os NTs podem ser divididos em três grupos, o tipo 1 sendo representado pelos aminoácidos L-glutamato, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e glicina, que estão presentes na concentração de  $\mu\text{mol/g}$  de cérebro de mamíferos. O tipo 2, compreende o grupo dos demais NTs clássicos, como as aminas biogênicas (noradrenalina e dopamina), 5-hidroxitriptamina ou serotonina, acetilcolina e purinas, presentes na concentração de  $\text{nmol/g}$  de cérebro de mamífero. O tipo 3 é constituído pelos neuropeptídeos como a substância P, que atuam como co-transmissores de muitos terminais sinápticos. Os neuropeptídeos existem na concentração de  $\text{nmol}$  ou  $\text{pmol/g}$  de cérebro (MCMAHON & NICHOLLS, 1991).

#### **1.4.1. A neurotransmissão excitatória glutamatérgica e a sua modulação**

O aminoácido L-glutamato (L-Glu) é considerado o principal mediador dos sinais excitatórios no SNC de mamíferos, sendo importante para o desenvolvimento neuronal, plasticidade sináptica, aprendizagem e memória (WANG & QIN, 2010; SUZUKI, et al, 2006; NICHOLLS, 1995). Dessa forma, o L-Glu também desempenha funções relevantes no desenvolvimento do sistema nervoso como a formação, o remodelamento, a eliminação de sinapses (MCKINNEY, 2010), a migração neuronal (MANENT e REPRESA, 2007), a proliferação, a diferenciação (SCHLETT, 2006) e a morte celular (VECINO, HERNÁNDEZ e GARCÍA, 2004).

Sua síntese ocorre por transaminação, a partir do  $\alpha$ -cetoglutarato ou por hidrólise da glutamina pela ação da glutaminase, porque o L-Glu não atravessa a barreira

hematoencefálica, e devido a isso, é sintetizado nos terminais de neurônios pré-sinápticos no cérebro (FONNUM, 1984). O L-Glu é facilmente sintetizado em neurônios a partir da glutamina sintetizada e fornecida pelos astrócitos (Figura 11), o esqueleto de carbono de glutamato pode ser derivado a partir de outros ácidos aminados e diversos substratos energéticos, incluindo glicose, lactato, e 3-hidroxi-butilato. No entanto, o ciclo glutamato-glutamina não é um ciclo estequiométrico, muito pelo contrário, é uma via aberta com várias interfaces com outras vias, dependendo das necessidades celulares e prioridades (McKENNA, 2007).



**Apenas em astrócitos:**  
 GS- glutamina sintetase  
 PC- piruvato carboxilase  
 cME-enzima málica citosólica (abundante)

**Astrócitos e neurônios:**  
 AAT- aspartato aminotransferase  
 GDH- glutamato desidrogenase

**Abundante em neurônios:**  
 PDH- piruvato desidrogenase  
 PAG- glutaminase ativada por fosfato

**Exclusiva de neurônios gabaérgicos:**  
 GAD- ácido glutâmico descarboxilase

**Figura 11: Representação do ciclo glutamato-glutamina em neurônio e célula da glia. O L-Glu é sintetizado no terminal do neurônio pré-sináptico, podendo ser convertido a GABA ou seguir para o astrócito e ser convertido em glutamina. A figura representa os eventos metabólicos na síntese de**

glutamato e glutamina que ocorrem no citoplasma, na fase de glicólise e no ciclo do ácido tricarboxílico (ATC), na mitocôndria. A tabela mostra a maquinaria enzimática relacionada aos eventos metabólicos e suas localizações em neurônios e astrócitos (*Adaptado de: McKenna, 2007*).

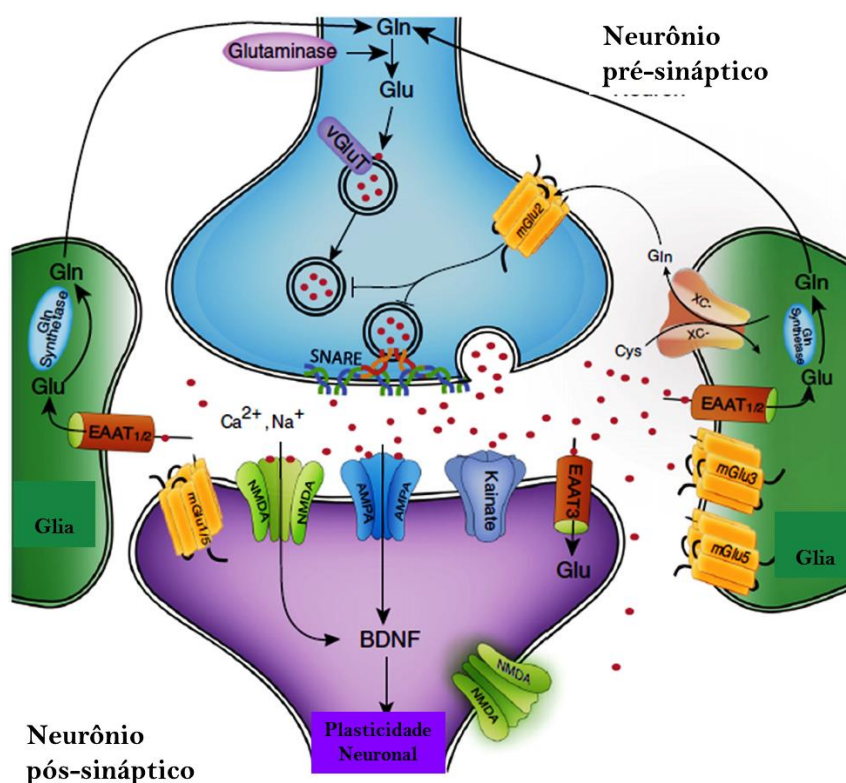
A compartimentalização do L-Glu nas células do cérebro é complexa e modulada pela presença e concentração de glutamato e de outros metabólitos (SONNEWALD & McKENNA, 2002). Tanto astrócitos, quanto os neurônios são capazes de distinguir entre o L-Glu exógeno e o formado endogenamente (FARINELLI & NICKLAS, 1992), sendo a molécula chave do funcionamento do cérebro, constituindo de 80 a 90 % dos NTs das sinapses do SNC (DANBOLT, 2001; McKENNA, 2007), sendo também o precursor para a síntese de GABA nos neurônios, e glutamina em astrócitos (SONNEWALD & McKENNA, 2002; NICHOLLS, 1995; McKENNA, et al., 1993).

Os neurônios glutamatérgicos são caracterizados por conter L-Glu no corpo celular e axônio, em grandes concentrações, todavia, na região pré-sináptica há um número de vesículas carregadas com esse NT para serem liberadas mediante estímulos que ultrapassem o limiar de excitabilidade (NICIU, KELMENDI, & SANACORA, 2010; McKENNA, 2007; FONNUM, 1984). Durante a sinapse química, na fenda sináptica, o L-Glu é liberado por duas formas: mediante exocitose das vesículas carregadas com o NT, evento esse essencialmente dependente do influxo de  $Ca^{2+}$ , ou por uma via independente de cálcio, que ocorre pela reversão do transportador de membrana que libera o L-Glu não encapsulado em vesículas presentes no citoplasma. (NICHOLLS, 1995). Estudos sugerem que a concentração de L-Glu na sinapse, no período pré-liberação é entre 2-5  $\mu\text{mol/L}$ , podendo chegar a 5-100  $\mu\text{mol/L}$ , após estímulo despolarizante (MORALES-VILLAGRAN & TAPIA, 1996).

Para haver a liberação do neurotransmissor L-Glu pela via dependente de cálcio, no evento sináptico, o impulso despolarizante provoca a abertura dos canais  $Na_v$ , ocorrendo o influxo de sódio, despolarizando a membrana pré-sináptica e recrutando a abertura dos canais  $Ca_v$  do tipo N, P/Q e L. A entrada do  $Ca^{2+}$  é essencial para haver a exocitose do neurotransmissor. Nesse processo, inicialmente as vesículas sinápticas são preenchidas com L-Glu através de transporte ativo e formam um agrupamento de vesículas que migram para a zona ativa, se ancorando. Nas zonas ativas, as vesículas tornam-se competentes para fusão, estado chamado "*priming*". Após a abertura do poro de fusão e exocitose, disparado pelo aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular, as vesículas sinápticas sofrem endocitose e reciclagem por vias distintas, como via clatrinadas e/ou endocitose (SÜDHOF, 2004).

O L-Glu liberado na fenda sináptica irá interagir com os seus receptores ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR), e atuando como neurotransmissor excitatório (presentes nos neurônios pós-sinápticos), em receptores pré-sinápticos (autoreceptores), ou ainda ser transportado pelos transportadores específicos, que são dependentes de sódio, e estão presentes nas células gliais, nos neurônios pré e pós-sinápticos, se encarregando de remover o L-Glu da fenda sináptica, uma vez que a presença exacerbada desse neurotransmissor está envolvido em eventos neurodegenerativos associados a uma série de injúrias do SNC. (WANG & QIN, 2010; LAU & TYMIANSKI, 2010; ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003; MATUTE, ALBERIDI, IBARRETXE, & SÁNCHEZ-GÓMEZ, 2002; DANBOLT, 2001).

Na figura 12 os iGluR do tipo NMDA, AMPA/kainato estão presentes no neurônio pós-sináptico; os mGluR estão representados no neurônio pré-sináptico (mGluR2), modulando a liberação de L-Glu, e no neurônio pós-sináptico (mGluR1 e mGluR5) atuando como moduladores das respostas excitatórias ou inibitórias, EAAT representam os transportadores de glutamato, pós-sináptico do tipo EAAT3 e gliais EAAT1 E 2.



**Figura 12:** Representação esquemática da liberação de L-glutamato e ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos pelo neurotransmissor. No neurônio pré-sináptico, observa-se a presença das proteínas do complexo SNARE, que são ativadas pelo  $Ca^{2+}$ , responsáveis



pela fusão das membranas vesiculares e plasmáticas promovendo a exocitose do L-Glu. O esquema mostra também a atividade dos transportadores retirando o L-Glu da fenda sináptica para dentro das células gliais, e a conversão de glutamato em glutamina que é liberada da glia através do trocador glutamina/cisteína por antiporte (*Adaptado de: NICIU, KELMENDI, & SANACORA, 2010*).

#### **1.4.2. Os papéis dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos na neurotransmissão central**

Os receptores glutamatérgicos compreendem duas classes de receptores com ativação e respostas celulares distintas. Os iGluR são canais ativados por ligante, em que o ligante corresponde à molécula de L-Glu. Esses são canais catiônicos seletivos aos íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  com diferentes graus de afinidade e seletividade. Enquanto que os mGluR fazem parte da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR), produzindo segundos mensageiros que participam de cascatas de sinalização intracelulares importantes na modulação de diferentes respostas celulares e fisiológicas (*NICIU, KELMENDI, & SANACORA, 2010*).

Os iGluR do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) são estruturas heteroméricas permeáveis aos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  (zinco) e  $\text{Ca}^{2+}$ . No processo fisiológico normal, durante o potencial de repouso o poro do canal é bloqueado pelo magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (*MATTSON, BARGER, BEGLEY, & MARK, 1995*). Nos neurônios pós-sinápticos, durante eventos despolarizantes e na presença do L-Glu, ocorre o desbloqueio do poro do canal e aumento da condutância ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  e o potencial de ação é gerado (*WANG & QIN, 2010*). Esses receptores requerem a ligação da glicina como um co-agonista para serem ativados, todavia são os que possuem a maior afinidade ao glutamato. Apresentam como características farmacológicas uma ativação lenta e dependente de voltagem (*MAYER, WESTBROOK, & GUTHRIE, 1984*), além de uma dessensibilização fraca e alta permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (*DINGLELINE, BORGES, BOWIE, & TRAYNELIS, 1999*).

São constituídos por três subunidades diferentes (NR1-3). Os receptores do tipo NMDA clássicos são heterotetramérico, compostos por duas subunidades NR1 e duas subunidades NR2, sendo a subunidade NR1 composta por cerca de 938 resíduos de aminoácidos, quando associada a outra subunidade forma o poro do canal e exibem todas as propriedades clássicas do canal incluindo ativação pelo L-Glu, bloqueio pelo  $\text{Mg}^{2+}$ , inativação pelo  $\text{Zn}^{2+}$ , que pode inibir as correntes elicítadas pelo glutamato

(MAYER & VYKLYCKY Jr, 1989), co-ativação pela glicina (JOHNSON & ASCHER, 1987), interação com poliaminas, que reduzem a corrente gerada pela ligação do L-Glu ao receptor (ROCK & MACDONALDO, 1992) e sensibilidade ao pH (LAU & TYMIANSKI, 2010; DINGLEDINE, BORGES, BOWIE, & TRAYNELIS, 1999).

As subunidades NR2 possuem um papel regulatório nas funções associadas aos iGluR NMDA. Há quatro subtipos de NR2 (NR2A-D), sendo NR2A bem distribuído por todo o SNC e o NR2B, particularmente, na região do prosencéfalo, que parece se ligar às proteínas pós-sinápticas, como exemplo a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) aproximando-a espacialmente aos segundos mensageiros, tais como o  $\text{Ca}^{2+}$  gerando danos histológicos (SATTLER, XIONG, & LU, 1999). Enquanto que a subunidade NR3 é expressa em duas isoformas, sendo a NR3A no SNC e NRB3, em neurônios motores (SNP). Parece que essa terceira subunidade associada à NR1 elicitava uma resposta excitatória via glicina (LAU & TYMIANSKI, 2010).

Os receptores glutamatérgicos do tipo ácido  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazoleproprênico (AMPA) e cainato fazem parte de uma superfamília de receptores iGluR e apresentam 25 % de homologia (NICIU, KELMENDI, & SANACORA, 2010).

Os receptores AMPA são constituídos a partir da combinação de quatro subunidades (GluR1-4) e requerem apenas ativação por L-Glu. A especificidade aos cátions é dependente da associação entre as subunidades do receptor, sendo as subunidades GluR1, 3 e 4 com alta permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  e GluR2 promovendo impermeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (GEIGER al., 1995). Fisiologicamente, são altamente permeáveis ao  $\text{Na}^+$  e apresentam um papel essencial na transmissão sináptica rápida além de remover o bloqueio do poro pelo  $\text{Mg}^{2+}$  dos iGluR tipo NMDA (MATTSON, BARGER, BEGLEY, & MARK, 1995). Entretanto, um trabalho com os neurônios motores expressando todas as subunidades de receptores de AMPA, mostrou que uma parcela majoritária dos neurônios que expressaram a subunidade GluR2 demonstraram ser responsáveis pela excitotoxicidade mediada pelo L-Glu dependente do  $\text{Ca}^{2+}$  (GREIG, et. al., 2000).

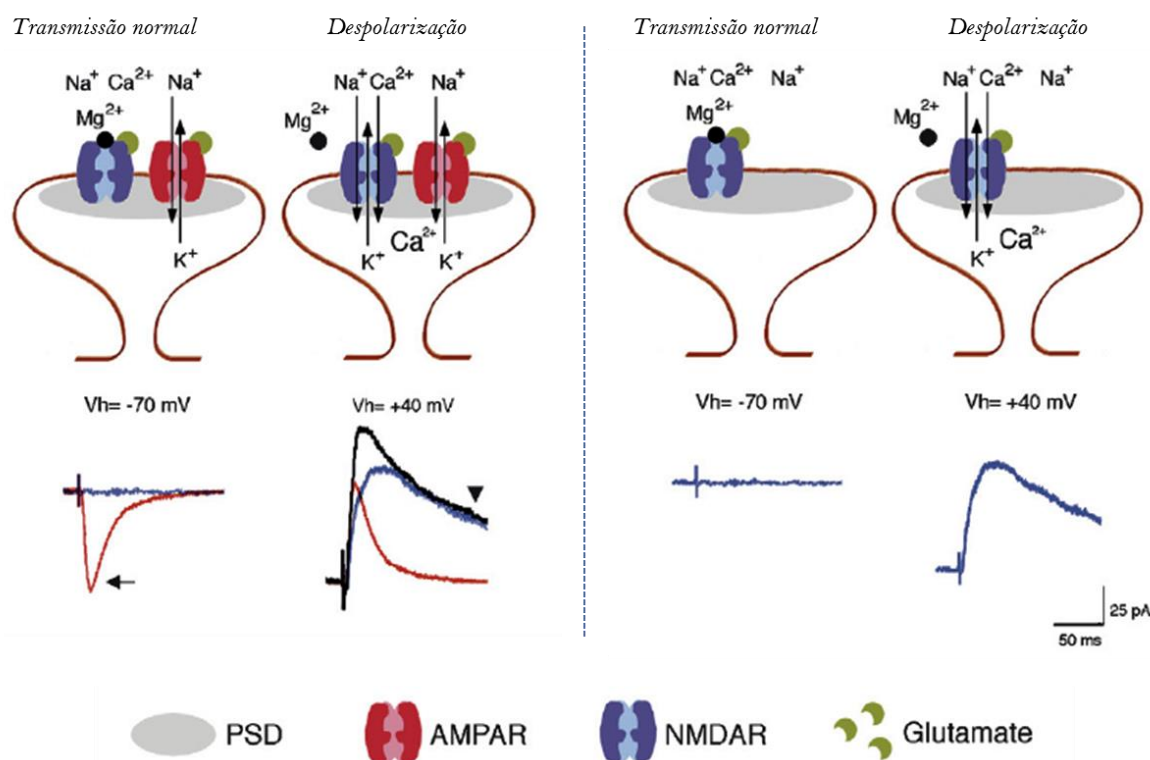
No hipocampo, as sinapses entre os neurônios piramidais das regiões CA3 e CA1 promovem a liberação pré-sináptica do L-Glu dos terminais pré-sinápticos de CA3 ativando os receptores pós-sinápticos AMPA e NMDA, todavia, os receptores AMPA são responsáveis pela maior parte da corrente basal despolarizante da transmissão sináptica, ao passo que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via receptores NMDA é necessário para

desencadear mudanças na força sináptica, ou seja, na plasticidade (ELIAS & NICOLL, 2007).

Em se tratando da ativação dos receptores iGluR relacionado à condução do potencial de ação (figura 13), pode-se observar que o L-Glu liberado pré-sinápticamente ativa principalmente os iGluR do tipo AMPA (vermelho) e NMDA (azul). Ambos os iGluR são permeáveis aos cátions monovalentes ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ), entretanto, os do tipo NMDA também são altamente permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Ao contrário dos iGluR do tipo AMPA, que tem uma tensão de corrente linear, o NMDA exibe uma condutância dependente da voltagem devido à tensão de bloqueio dependente do  $\text{Mg}^{2+}$  durante o potencial de membrana o (**a**, traço azul). Portanto, correntes sinápticas evocadas por potenciais excitatórios pós-sináptico (EPSCS) serão devidas quase inteiramente à condutância catiônica através dos iGluR do tipo AMPA (**a**, traço vermelho à esquerda), no potencial de membrana em torno de  $-70$  mV (**c**, seta preta). Durante a despolarização, os potenciais gerados pelos iGluR do tipo NMDA também contribuem para o EPSC (**a**, preto). Esses dois componentes mediados pelos iGluRs podem ser isolados farmacologicamente, revelando o componente AMPA (**a**, traço vermelho direito) e o componente NMDA (**a**, traço azul à direita). Também, há uma nítida diferença entre a cinética de degradação dos iGluR, em que o receptor do tipo AMPA é 100 vezes mais rápido do que o NMDA (1/100 milissegundos) (ELIAS & NICOLL, 2007). De modo interessante, as sinapses excitatórias que contêm iGluR do tipo NMDA mas não apresentam AMPA são conhecidas como "sinapses silenciosas" (**b**) (ISAAC, NICOLL, & MALENKA, 1995). Essas sinapses não conduzem em potenciais de membrana negativo porque o bloqueio do poro pelo  $\text{Mg}^{2+}$  é dependente de voltagem no iGluR tipo NMDA (**b**, traço azul da esquerda). Quando ocorre a despolarização esses receptores são ativados resultando nos EPSC (**b**, traço azul da direita) (ELIAS & NICOLL, 2007).

## (a) Transmissão excitatória clássica

## (b) Silenciamento sináptico



**Figura 13: Representação da transmissão excitatória glutamatérgica. Ativação dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos pós-sinápticos do tipo NMDA e AMPA na condução dos potenciais excitatórios pós-sinápticos numa sinapse clássica (a) e nas sinapses silenciadas (b) (Adaptado de: ELIAS & NICOLL, 2007)**

Os receptores iGluR do tipo cainato são heteroméricos constituídos por uma complexa interação entre suas subunidades de GluR5-7 e KA1-2. Também são ativados diretamente pelo L-Glu, sendo permeáveis aos íons  $Na^+$  e  $K^+$ , todavia são mais impermeáveis ao  $Ca^{2+}$ . A ativação desse receptor, similar ao AMPA, ativa os receptores do tipo NMDA (NICIU, KELMENDI, & SANACORA, 2010; FERKANY, ZACZEC, & COYLE, 1982).

Estudos mostram que os iGluR do tipo AMPA estão mais localizados em neurônios pós-sinápticos, enquanto que os receptores de cainato estão localizados ubiquamente em neurônios pré e pós-sinápticos (VIGNER & COLLINGRIDGE, 1997). No entanto, após dez anos de pesquisa, estudos mostram atualmente que ambos os receptores glutamatérgicos iGluR (AMPA, cainato e NMDA) estão presentes pré-sinápticamente, além de mGluR e que podem atuar controlando a força de transmissão sináptica e liberação de NTs de forma variável (PINHEIRO & MULLE, 2008).

## 1.5. MECANISMOS MOLECULARES E CELULARES DA EXCITOTOXICIDADE E MORTE NEURONAL

O conceito de excitotoxicidade foi proposto pela primeira vez pelo Dr. Olney (1969) como sendo um efeito tóxico resultante da excessiva ou prolongada ativação dos receptores pelos aminoácidos excitatórios (EAAs) (OLNEY, 1969).

A excitotoxicidade medeia danos neuronais em várias desordens neurológicas, incluindo isquemia e doenças neurodegenerativas. Os mecanismos moleculares sugerem que uma superestimulação dos receptores glutamatérgicos produz múltiplos efeitos adversos incluindo alterações na homeostase do cálcio intracelular, comprometendo as funções de organelas, tais como as mitocôndrias; além do aumento do óxido nítrico produzindo radicais livres. A ativação persistente de proteínas cinases e o aumento de fatores de transcrição pró-apoptóticos também estariam envolvidos neste evento (WANG, et al., 2010).

Sabe-se hoje que a excitotoxicidade promovida pelo glutamato contribui para a lesão neuronal em diversas neuropatologias, incluindo isquemia, epilepsia, traumatismo crânio-encefálico e as doenças neurodegenerativas crônicas, como esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, Doença de Parkinson e Alzheimer (WANG & QIN, 2010; LAU & TYMIANSKI, 2010; ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003; MATUTE, ALBERIDI, IBARRETXE, & SÁNCHEZ-GÓMEZ, 2002; DANBOLT, 2001).

Os iGluR são os grandes alvos farmacológicos dos eventos de excitotoxicidade, mediados pelo L-Glu. A ativação do receptor NMDA leva a um aumento do influxo de cálcio, que pode resultar em uma despolarização da membrana mitocondrial aumentando a produção de radicais livres e ativando as caspases, que são proteínas envolvidas principalmente, em eventos apoptóticos (LIOT, et al., 2009).

Outros iGluR do tipo AMPA, na sua maioria, são impermeáveis ao cálcio e podem causar excitotoxicidade, devido ao aumento do influxo de Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup>, despolarizando a membrana celular e ativando os receptores de NMDA (WANG, et al., 2010).

A excitotoxicidade, resultante da estimulação dos receptores de cainato, pode ser sucedida por vias apoptóticas mais do que necróticas, que em geral são mais onservadas quando o receptor NMDA está envolvido. Além disso, alguns estudos relataram que a estimulação dos receptores de cainato poderia induzir autofagia e atividade de enzimas lisossomais, importante nas injúrias neuronais (WANG, et al., 2006).

### **1.5.1. Células Neuro-2A: uma linhagem com fenótipo neuronal para avaliação de citotoxicidade**

As células Neuro-2A constituem uma linhagem amplamente usada em modelos neuronais *in vitro* que exibem fenótipos morfológico e químico de neurônios (TAMIJI e CRAWFORD, 2010; BASTA-KAIM, et al., 2006; CALDERÓN et al., 1999).

Estudos mostram que nessas células há presença de receptores muscarínicos, opióides, de angiotensina, bradicinina, neurotrofinas e serotoninérgicos, além de transportadores de serotonina, e que essas expressam a proteína 4.1N, que interage com os receptores dopaminérgicos D1 e D2 (BASTA-KAIM, et al., 2006; BINDA et al., 2002; CHATTERJEE et al., 1992; MONSMA JR, BRASSARD, & SIBLEY, 1989).

Ensaio de imunohistoquímica em células Neuro-2A evidenciaram a presença de três proteínas do complexo SNARE neuronal, dois transportadores de monoaminas (VMAT-1 e VMAT-2) e de nucleotídeos vesiculares, o que mostra a atividade na maquinaria de liberação de NTs (GUTIÉRREZ-MARTÍN et al., 2011).

As linhagens celulares comumente são utilizadas como uma alternativa interessante para avaliações de toxicidade de biocompostos ativos de origem animal e vegetal, medicamentos, compostos sintéticos e nanocompostos.

As células Neuro-2A tem sido objeto de estudo também para avaliação de agentes antioxidantes, como o mangiferin, uma substância extraída da manga (*Mangifera indica*), que protegeu essas células contra a toxicidade do MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), substância que induz a síndrome parkinsoniana em humanos e em outros animais (AMAZZAL et al., 2007).

Além de ensaios de toxicidade, muitos trabalhos com linhagens, especificamente com a Neuro-2A, vêm sendo desenvolvidos no intuito de compreender processos farmacodinâmicos, como especificidade de drogas aos receptores e sinalização celular. Como exemplo, um trabalho envolvendo o misoprostol, uma droga análoga da prostaglandina E, que embora tenha sido utilizado na terapêutica para a prevenção e tratamento da úlcera gástrica e indução de contrações uterinas, observou-se que o uso dessa droga no final da gravidez estaria relacionado ao autismo e síndrome de Möbius, ou seja uma provável neurotoxicidade no SNC (SCHULER et al., 1999; GOLDBERG, GREENBERG, & DARNEY, 2001). Visando investigar o possível mecanismo de neurotoxicidade do misoprostol, Tamiji e Crawford (2010) utilizaram células Neuro-2A e observaram que esse medicamento induziu o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  dependente da

atividade da proteína cinase A, similar ao mecanismo desencadeado pela prostaglandina E<sub>2</sub>, o que poderia estar relacionado aos casos de autismo (SPLAWSKI et al., 2004).

Os estudos utilizando essas células têm ajudado a elucidar alguns eventos fisiofarmacológicos que envolvem o sistema nervoso.

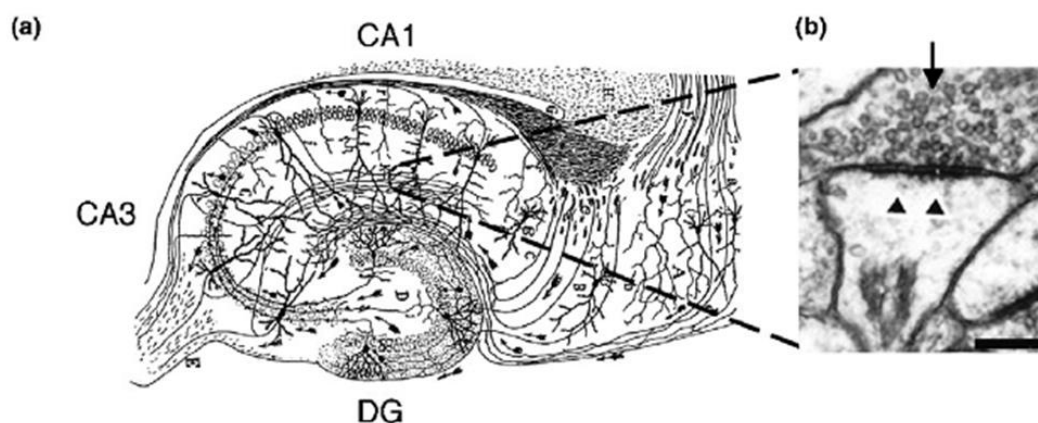
### **1.5.2. Neurônios piramidais e granulares de hipocampo em cultura: modelos neuronais para avaliação de efeitos neurotóxicos**

Estruturalmente, o hipocampo juntamente com o giro denteado e os córtices transicionais associativos (córtex entorhinal e subicular), constituem a formação hipocampal, sendo o hipocampo dividido em regiões denominadas de Corno de Ammon (CA): CA1, CA2 e CA3, constituído majoritariamente por neurônios piramidais e granulares (AMARAL & WITTER, 1989). A estrutura hipocampal ainda pode ser dividida em estratos, sendo esses: Oriens, Piramidal, Radial e Lacunoso-molecular. No estrato Oriens encontram-se os dendritos basais dos neurônios piramidais; no Piramidal estão localizados os somas dessas células; no Radial, os dendritos apicais; no estrato Lacunoso as ramificações dos dendritos apicais. Essa formação apresenta-se como uma unidade morfofuncional do sistema límbico que está interconectada por fibras correspondendo à via tri-sináptica, de natureza predominantemente excitatória (PAXINOS, 2004).

Em neurônios piramidais, algumas aferências chegam através dos feixes perforantes medial e lateral, oriundos do córtex entorhinal, (particularmente em roedores, das regiões medial e lateral, respectivamente), sendo essa a principal via denominada de perforante ou temporodenteada. Já os feixes eferentes dos neurônios piramidais projetam-se do hipocampo via fórnix. Outras vias provenientes do córtex entorhinal adentram a camada molecular do giro denteado e fazem sinapse com os dendritos das células granulares. Os axônios das células granulares estão localizados na camada granular do giro denteado e projetam-se para a região CA3 e hilar, denominadas de fibras musgosas. As células piramidais da região CA3 projetam-se à região CA1, pelas fibras colaterais de Schaffer, sendo a maior via de entrada em CA1 (PAXINOS, 2004; AMARAL & WITTER, 1989).

O hipocampo e regiões corticais associadas formam o assoalho do corno temporal do ventrículo lateral (KANDELL, SCHUWARTZ, & JESSEL, 2003).

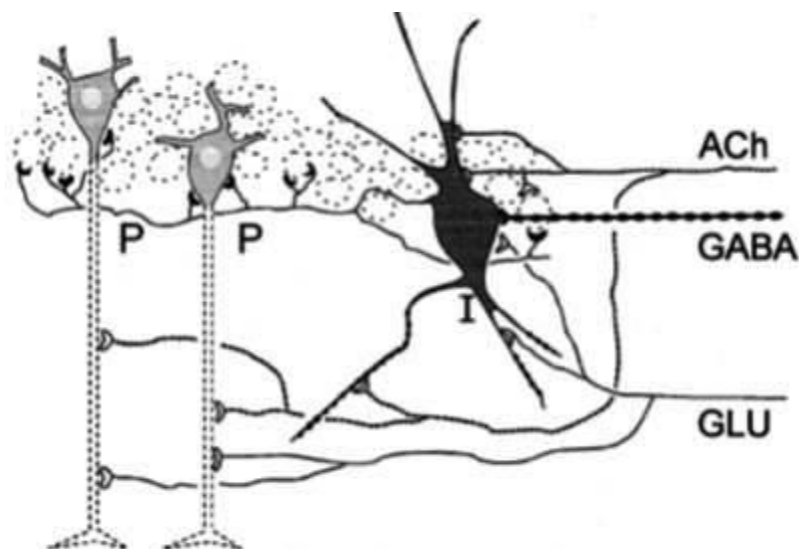
Os neurônios piramidais e granulares compreendem as mais abundantes células do hipocampo, sendo a principal neurotransmissão excitatória mediada nessa região pelo L-Glu, e inibitória mediada por GABA (WANG & QIN, 2010), conforme indicado na figura 14. Estudos recentes mostraram que o NTs glicina apresenta um papel dual na neurotransmissão hipocampal, uma vez que age como neurotransmissor inibitório quando ativa os receptores para estriquina, e excitatório, quando ativa os receptores glutamatérgicos NMDA, juntamente com o L-Glu (ZAPPETTINI, et al., 2012; AMARAL & WITTER, 1989).



**Figura 14: Neurotransmissão excitatória em hipocampo. (a) Sinapse glutamatérgica entre os neurônios piramidais das regiões CA3 (terminais pré-sinápticos) e CA1 (espinhas dendríticas). (b) Liberação de L-Glu na fenda sináptica (ELIAS & NICOLL, 2007).**

Além desses NTs foram identificados por imunocitoquímica a expressão de mAChR no corpo e ápices dendríticos das células piramidais. Dentre os receptores, os subtipos M1 a M4 foram presentes em células piramidais, interneurônios, células granulares e no sistema de fibras, entretanto, com baixa presença do receptor M2 e na região do giro denteado, de M4, revelando a relevância do neurotransmissor ACh nas sinapses moduladoras (VAN DER ZEE & LUITEN, 1999). A presença e localização dos mAChR e o conjunto de circuitos envolvendo a atividade desse neurotransmissor. A distribuição dos mAChR no hipocampo, nos interneurônios e nas células principais, mostra o envolvimento desses neurônios nos circuitos da neurotransmissão colinérgica, podem ser representados simplificadaamente, na figura 15.





**Figura 15:** Representação esquemática da neurotransmissão colinérgica na região CA1 do hipocampo enfatizando a modulação associada a outros neurotransmissores. A inervação colinérgica excitatória (terminais vasados) termina em todos os principais tipos celulares, predominando nos corpos celulares dos interneurônios gabaérgicos (I). A inervação inibitória colinérgica (terminais cheios) finaliza nos terminais gabaérgicos dos interneurônios, que por sua vez, inervam as células piramidais (P). Os neurônios piramidais recebem pouca influência direta enquanto que os interneurônios são fortemente influenciados (VAN DER ZEE & LUITEN, 1999).

Funcionalmente, a formação hipocampal é responsável pela memória de longo prazo acerca das experiências diárias, também denominada de memória explícita ou declarativa. Entretanto, danos no hipocampo levam o indivíduo a não formar novas memórias, mas não prejudica significativamente memórias antigas, o que mostra que essa área medeia as fases iniciais da retenção de longo prazo (KANDELL, SCHUWARTZ, & JESSEL, 2003). Nesse contexto, a neurotransmissão colinérgica na formação hipocampal exerce um papel crucial mediando a atenção e a memória, e portanto, é comprometida em casos de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (PARRI, HERNANDEZ & DINGLEY, 2011; DICKINSON et al., 2009).

Diferentes formas de plasticidade ocorrem, concomitantemente, no sistema nervoso. Enquanto ocorre um monitoramento da homeostase para manter a atividade neuronal dentro de uma faixa funcional, estrategicamente, a potenciação sináptica de longo prazo (LTP) modifica a força relativa das sinapses específicas após pequenas alterações na atividade neuronal, e proporcionam a base celular para o aprendizado e a memória. Estudo recente, com fatias de hipocampo mostrou que bloqueando o potencial de ação e os receptores de NMDA durante 3 h (bloqueio agudo) nessa região foram geradas LTPs de alta magnitude quando comparado aos hipocampos não bloqueados. Fato semelhante ocorreu quando a transmissão gabaérgica foi bloqueada com

microtoxina, o que mostra a estratégia de plasticidade nos circuitos hipocampais (FÉLIX-OLIVEIRA, et al., 2014). Adicionalmente, foi observado que em ratos wistar audiogênicos houve uma diminuição do tônus gabaérgico na região do hipocampo e da amígdala, e que esses animais são mais susceptíveis à indução de LTP na amígdala (DE CARVALHO, 2007).

A depressão sináptica de longo prazo (LTD) é uma forma de plasticidade sináptica tão significativa como a LTP, tanto para o desenvolvimento de circuitos neurais quanto para o armazenamento de memória dependente da atividade em adultos (STANTON, 1996). Danos e alterações em áreas distintas do hipocampo, tais como mudanças na neurotransmissão, de LTP, LTD ou nos receptores glutamatérgicos, afetam a plasticidade neuronal e ocorrem em distúrbios psiquiátricos, como na esquizofrenia, com redução de 4% do volume hipocampal, na densidade de células da glia e espinhais e no tamanho dos neurônios na região do giro (RAJKOWSKA, SELEMON, & GOLDMAN-RAKIC, 1998). O estresse pós-traumático foi o primeiro distúrbio neurológico associado à atrofia do hipocampo, além disso, o excesso de estresse tem mostrado causar atrofia devido à ação exacerbada de glicocorticóides, similar ao que ocorre na síndrome de Cushing's, com aumento da área da amígdala (WATANABE et al., 1992).

Alguns trabalhos evidenciaram o uso de neurônios hipocampais como modelo neuronal para ensaios de toxicidade. Um trabalho avaliou a atividade neuroprotetora de duas toxinas Tx3-3 e Tx3-4, isoladas da aranha *Phoneutria nigriventer*, mostrando que essas toxinas causaram considerável neuroproteção (54 e 72%, respectivamente) em fatias de hipocampo, em modelo de isquemia *in vitro* (privação de oxigênio e redução de glicose) por reduzir a liberação de L-Glu induzida pela isquemia (PINHEIRO et al., 2009). Em outro trabalho, neurônios hipocampais de animais adultos, em cultura, foram utilizados para avaliar o efeito do antidepressivo fluoxetina sobre o aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  induzido em sinapses. Os resultados mostraram que a fluoxetina inibiu a  $[Ca^{2+}]_i$  nos neurônios tratados e não-tratados previamente com p-cloroanfetamina, de modo concentração-dependente. Outros antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina, tais como paroxetina e citalopram não reduziram a  $[Ca^{2+}]_i$ . Além disso, foi observado que o tratamento prévio com fluoxetina, inibiu a  $[Ca^{2+}]_i$  induzida pelo L-Glu, NMDA e cainato, e dessa forma, protegendo os neurônios contra a excitotoxicidade (KIM et al., 2013).

Outro estudo envolvendo compostos naturais fenólicos isolados de chás em neurônios hipocâmpais em cultura obtidos de camundongos HT22 (sensíveis ao L-Glu), avaliou a atividade desses compostos sobre o sistema catecolaminérgico, em especial à biodisponibilidade de L-DOPA, catecolamina importante para os pacientes com doença de Parkinson. Os resultados mostraram que a substância (-) epigallocatequina-3-galato inibiu a metilação de L-DOPA aumentando a sua disponibilidade, assim como protegeu contra a neurodegeneração oxidativa do hipocampo. Outros compostos fenólicos como a (+) catequina e (-) epicatequina além de modularem a metilação de L-DOPA também atuaram como protetoras das neurodegenerações oxidativas (KANG et al., 2013).

Em 2014, o grupo da pesquisadora Dr<sup>a</sup> Maria Regina Sandoval, do Instituto Butantan/SP-Brasil, publicou um trabalho envolvendo a neurotoxicidade de duas PLA<sub>2</sub> isoladas (Mlx-8 e Mlx-9) da serpente *M. lemniscatus* em neurônios hipocâmpais de embriões de ratos Wistar, em cultura, no qual mostrou que essas toxinas promoveram o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  e reduziram o potencial mitocondrial transmembrana, o que ficou evidenciado pelas alterações morfológicas dos neurônios e pela citotoxicidade (CARVALHO et al., 2014).

### **1.5.3. Sinaptosomas como modelo de avaliação da atividade pré-sináptica e excitotoxicidade**

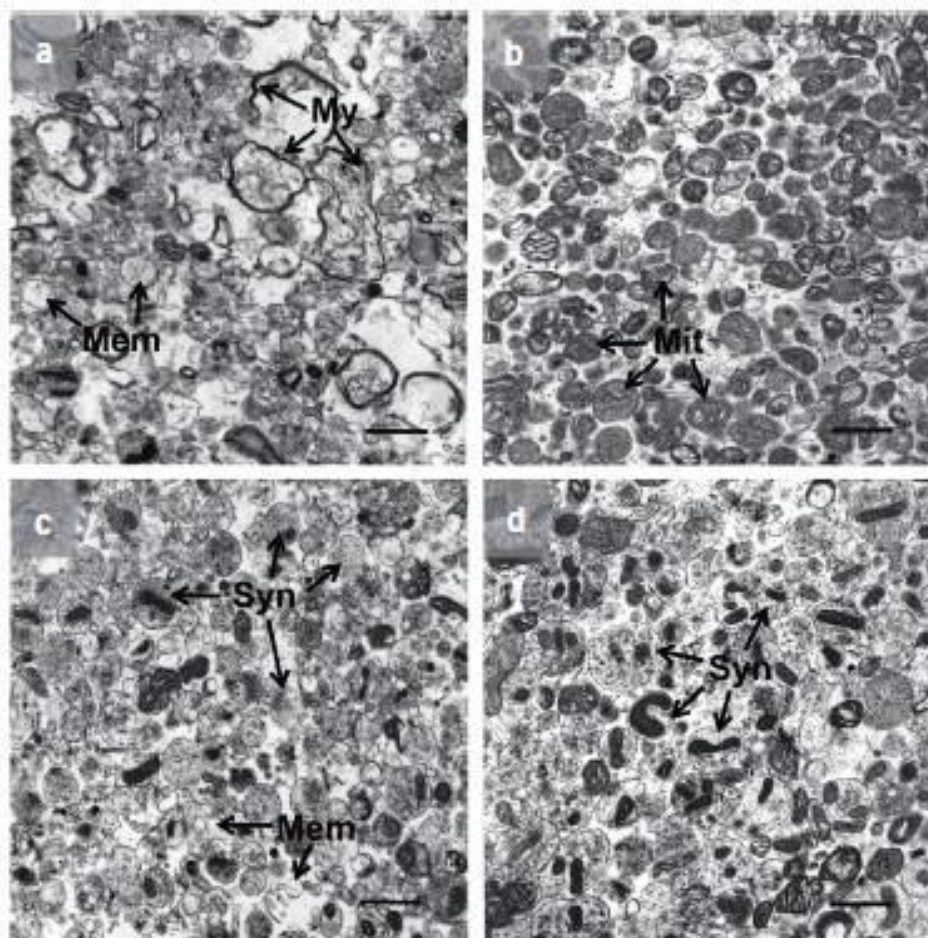
Os sinaptosomas têm sido amplamente utilizados como uma preparação de referência para a investigação de atividades pré-sinápticas, especialmente relacionadas à captação e liberação de NTs (DUNKLEY, HEATH, HARRISON, JARVIE, & GLENFIELD, 1988). Em mamíferos, são terminais nervosos isolados, compostos por vesículas de NTs distintos, e diferem em forma e tamanho, no conteúdo de vesículas, mitocôndrias e elementos do citoesqueleto e tipos de comunicação com células pós-sinápticas (DUNKLEY, JARVIE, & ROBINSON, 2008). Os sinaptosomas podem ser produzidos de maneira eficiente de diferentes regiões do cérebro, como o córtex e hipocampo que apresentam estruturas em camadas bem definidas (MCMAHON & NICHOLLS, 1991).

Estrutural e funcionalmente, os sinaptosomas têm sido caracterizados por apresentarem no seu interior mitocôndrias (0,7 a 1  $\mu$ m), pequenas vesículas sinápticas (50 nm), juntamente com poucas vesículas grandes de núcleo denso, que liberam NTs,

entretanto não podem sintetizar novas proteínas. Suas membranas são similares, eletrofisiologicamente, à membrana plasmática de neurônios, contendo canais iônicos com alta permeabilidade aos íons  $K^+$  e  $Na^+$ , proteínas transportadoras e receptores. Além disso, são bioenergeticamente autônomos, produzindo ATP e são funcionais até 6 horas após o seu preparo, quando suplementados por glicose (DUNKLEY, JARVIE, & ROBINSON, 2008; MCMAHON & NICHOLLS, 1991).

Em 1986, Nicholls & Sihra mostraram que sinaptosomas de córtex cerebral de porquinhos da índia liberavam L-Glu na presença de 1,3 mM  $Ca^{2+}$ , quando estimulados com 30 mM de cloreto de potássio (KCl), a partir dos 20 minutos.

O trabalho de Dunkley e col. (1988) aprimorou o método de preparação dos sinaptosomas, utilizando um gradiente de percol. Com a fração sobrenadante do homogenato de cérebro, após centrifugação, conseguiu fracionar em partes subcelulares com componentes bem homogêneos, sendo a fração subcelular 1 abundante em membranas, com vesículas muito pequenas (0,34  $\mu m$  de diâmetro); a fração 2 rica em mielina; a subfração 3 contendo sinaptosomas e membranas e a 4 contendo sinaptosomas grandes (terminais nervosos de 0,63  $\mu m$  de diâmetro) (figura 16); a fração 5 é rica em mitocôndrias (DUNKLEY, JARVIE, & ROBINSON, 2008).



**Figura 16: Eletromicrografia das frações subcelulares sinaptosomais da área do estriado de ratos após o gradiente de percol (0 a 23 %). Em (a) a fração 1, mostrando a presença de membranas (mem); (b) fração 2, com mielina e mitocôndrias extrasinápticas (mit); (c) fração 3, com sinaptosomas (syn) e membranas; (d) fração 4, com sinaptosomas (DUNKLEY, JARVIE, & ROBINSON, 2008).**

Uma diversidade de trabalhos foi desenvolvida ao longo desses quase 30 anos utilizando esse método e avaliando quer sejam as vias de liberação de NTs e suas regulações, a caracterização de receptores pré-sinápticos, bem como a atividade farmacológica de drogas na liberação e/ou recaptação de NTs.

Um dos trabalhos pioneiros, de Meyer e Otero (1985), caracterizou, farmacologicamente, a liberação de ACh modulada pelos mAChR, em sinaptosomas de córtex cerebral de rato.

O uso desse método tem sido bastante explorado para a caracterização farmacológica de toxinas que agem no SNC. O grupo do Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Wagner dos Santos e Joaquim Coutinho Netto, da USP de Ribeirão Preto/SP-Brasil realizou alguns trabalhos com toxinas isoladas de aranhas, com atividade neuroprotetora, em sinaptosomas envolvendo os sistemas gabaérgico e glutamatérgico. Em um desses trabalhos, a toxina

FrPbAII, isolada da aranha social *Parawixia bistriata* foi capaz de inibir a recaptação de GABA em sinaptosomas, apontando a toxina como um anticonvulsivante potente (GELFUSO et al., 2007). Um trabalho de 2011 evidenciou que uma nova toxina isolada da mesma aranha, a parawixina 10, aumentou a captação de [<sup>3</sup>H]-glutamato (79 %) e de [<sup>3</sup>H]-glicina (40 %) em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos, não afetando a captação de GABA (FACHIM, et al., 2011). Trabalhos anteriores também mostraram atividade neuroprotetora de peçonhas de aranhas, bem como de algumas de suas frações (BELEBONI, et al., 2006; FONTANA, et al, 2003; CAIRRÃO, et al., 2002).

Outro grupo de pesquisa, do Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Marcus Vinícius Gomez, da UFMG-Belo Horizonte/MG desenvolveu inúmeros trabalhos com diferentes toxinas da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*. Como exemplo, Reis e col. (1999), mostraram que a toxina phoneutriatoxina 3-4, inibiu a captação de L-Glu em sinaptosomas dependente do tempo de exposição e reduziu a liberação de L-Glu independente de Ca<sup>2+</sup>.

Nosso grupo tem desenvolvido trabalhos com sinaptosomas avaliando a liberação de L-Glu ou de outros NTs relacionando a atividade neurotóxica central evocada por essas toxinas. Nos trabalhos de Kattah e cols. (2002) e Lomeo e cols. (2014) foram avaliados os efeitos pré-sinápticos da crotoxina, uma PLA<sub>2</sub> heterodimérica, isolada da serpente *Crotalus durissus terrificus*, em sinaptosomas. O primeiro trabalho mostrou que a crotoxina aumenta a liberação dos derivados de ácidos graxos palmitato e araquinodato quando comparada a outras PLA<sub>2</sub>. O segundo, mostrou que a liberação de L-Glu induzida por essa PLA<sub>2</sub> é independente da atividade fosfolipásica e dependente dos canais Ca<sub>v</sub> N e P/Q. Além disso, verificou-se também, que a subunidade CB é internalizada na membrana, independentemente da atividade fosfolipásica e da subunidade CA. Em outros trabalhos desenvolvidos em nosso Laboratório foram usados sinaptosomas cérebro-corticais para comparar a liberação de L-Glu induzida por uma toxina nativa PnTx2-6, sua recombinante e mutantes (Torres, 2011), bem como com um peptídeo sintético, PnTx-19 (Silva, 2012), importantes potenciadores da função erétil. No trabalho mais recente, o de Montandon (2013), os sinaptosomas cérebro-corticais de ratos adultos foram utilizados para avaliar o efeito da peçonha bruta de *M. lemniscatus* e a triagem de suas frações na liberação de L-Glu, trabalho inicial dos nossos estudos da atividade pré-sináptica dessa peçonha.

#### 1.5.4. A participação do cálcio na neurotransmissão glutamatérgica e excitotoxicidade

O aumento no transiente de  $[Ca^{2+}]_i$  resultante de estímulos eletroquímicos e consequente abertura dos canais iônicos, medeia processos fisiológicos de diferentes circuitos neuronais, como por exemplo, os eventos associados à memória e aprendizagem (KANDELL, SCHUWARTZ, & JESSEL, 2003).

Porém, o influxo de cálcio também é essencial para a excitotoxicidade glutamatérgica. Estudo desenvolvido com cultura de neurônios corticais mostrou que, quando os neurônios foram submetidos ao meio extracelular rico em  $Ca^{2+}$ , ocorreu excitotoxicidade glutamatérgica, em contrapartida, quando o meio estava desprovido de  $Ca^{2+}$  ocorreu redução da morte neuronal (CHOI, 1985).

A injúria e morte neuronal, que ocorrem como resultado de eventos agudos (por exemplo, traumatismo craniano) e crônicos, como nas doenças neurodegenerativas (Doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington) estão relacionadas de algum modo, ao desequilíbrio do cálcio intra e extracelular. Logo, muitas estratégias de neuroproteção adquiridas ao longo da evolução envolve sistemas que controlam esse íon (MATTSON, et al, 1995).

Em neurônios, a  $[Ca^{2+}]_i$  é aproximadamente 100 nM, em contrapartida, a concentração de cálcio extracelular ( $[Ca^{2+}]_e$ ) corresponde a aproximadamente 1 mM (MATTSON, et al, 1995). A baixa  $[Ca^{2+}]_i$  é mantida devido a constante extrusão de cálcio facilitada pela  $Ca^{2+}$ -ATPase, presente na membrana plasmática e no retículo endoplasmático (CAROFOLI, 1992). Além do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ -ATPase, as proteínas citosólicas que se ligam ao cálcio intracelular são importantes para a manutenção do baixo nível desse íon no meio intracelular (MATTSON, et al., 1995).

Estudo desenvolvido por Tymianski e col. (1993) mostrou que, o influxo de  $Ca^{2+}$  e não o  $Ca^{2+}$  presente na célula, foi importante para os processos neurodegenerativos mediados pelo iGluR, do tipo NMDA.

O  $Ca^{2+}$  adentra o citoplasma por meio dos canais  $Ca_v$ , dos receptores presentes na membrana do retículo endoplasmático do tipo receptor de  $IP_3$  e de rianodina, e dos iGluR de NMDA e mGluR (MATTSON, et al., 1995).

O L-Glu induz o aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  pela ativação dos iGluR do tipo NMDA, AMPA/cainato e mGluR. Uma redução do íon  $Mg^{2+}$  que bloqueia os receptores de NMDA tem sido caracterizada como modelo *in vitro* de convulsões (GIBBS, et al.,

1997). Em condições patológicas, como na epilepsia e isquemia cerebral, há uma liberação exacerbada de L-Glu promovendo neurotoxicidade (OLNEY, COLLINS, & SLOVITER, 1986).

O aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  a um nível letal pode ocorrer devido a uma variação de desordens metabólicas, como hipoglicemia, inibindo a atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase e prejudicando a eliminação desse íon do meio intracelular. Além disso, o cálcio pode ativar proteases (tais como calpaínas) causando injúrias na membrana; ativar lipases, produzindo radicais livres, ou via iGluR do tipo NMDA; ativar a óxido nítrico sintase, produzindo níveis tóxicos de óxido nítrico (LAU & TYMIANSKI, 2010; SATTLER, XIONG, & LU, 1999).

Estudos vem mostrando que uma grande parte do  $Ca^{2+}$  intracelular, oriundo da excitotoxicidade glutamatérgica, é sequestrado para o interior da mitocôndria, o que provoca acidose metabólica e formação de radicais livres, e dessa forma gerando toxicidade via mitocôndria (WANG & THAYER, 1996; THAYE & WANG, 1995). Em complemento, a ativação do receptor do tipo NMDA induziu uma rápida captação de  $Ca^{2+}$  pela mitocôndria, mais do que quando comparada a ativação via receptor de cainato ou pelo KCl. Além disso, a entrada excessiva do  $Ca^{2+}$  na mitocôndria pode alterar o potencial de membrana mitocondrial reduzindo a produção de ATP e causando a morte celular (FISKUM, et al., 2003; FISKUM, 2000). Adicionalmente, durante o processo de excitotoxicidade glutamatérgica mediada pelo receptor do tipo NMDA, ocorre liberação de citocromo c da mitocôndria, levando à formação de moléculas reativas de oxigênio. Outros estudos mostraram a participação da caspase-3 nos eventos de excitotoxicidade glutamatérgica mediada pelo receptor de NMDA (ATLANTE, et. al., 2000; LUETJENS, et al., 2000; TENNETI & LIPTON, 2000).

A mitocôndria tem sido o elo de ligação entre os eventos de morte celular por apoptose, necrose ou autofagia, processos que estão envolvidos em várias doenças neurodegenerativas, ativando vias de sinalização distintas, e, muitas vezes comuns, envolvendo diferentes caspases e moléculas pró-apoptóticas (WANG & QIN, 2010). Muitas vezes estes processos estão associados aos eventos de excitotoxicidade promovidos pelo L-Glu.



## 1.6. TOXINAS ANIMAIS: novos protótipos de fármacos?

Historicamente, a utilização de peçonhas e seus componentes tem sido importante para o estudo do sistema nervoso, cardiovascular, no processo de coagulação sanguínea, sistema endócrino e no sistema imune (MENEZ, STÖCKLIN, MEBS, 2006). Toxinas polipeptídicas interagem tipicamente com seus receptores-alvos com alta potência e seletividade (KEIZER et al., 2003). Desta forma, as toxinas de origem animal associadas à biodiversidade de serpentes peçonhentas no mundo (2-2,9 mil) (CASAIS-E-SILVA, 2012) constituem um grande potencial para o uso em estudos de bioprospecção, servindo como “moldes estruturais” para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos.

Em 2003, Calixto destacou que no mercado mundial, estimava-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica eram desenvolvidos de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de outros animais. Em complemento, um trabalho publicado por nosso grupo, mostrou que, toxinas isoladas das peçonhas de aranhas, vespas e escorpiões, constituem um grupo que atua potencialmente como protótipo de novos fármacos, como anticonvulsivantes e antiepiléticos. Nesse estudo foi mostrada a relação entre o número de patentes publicadas de 1980 a 2010, relacionadas às toxinas de artrópodes com aplicações farmacológicas, clínicas e biotecnológicas, o que mostra o número crescente de depósitos ao longo dos anos. O trabalho mostra também que as patentes de moléculas com atividades farmacológicas associadas ao SNC, como antiepiléticas e analgésicas ocupam o terceiro e quarto lugares, respectivamente, sendo a primeira posição ocupada por moléculas com potencial atividade inseticida (DE LIMA, et al., 2012).

Algumas patentes vêm sendo depositadas por nosso grupo de pesquisa acerca da atividade de moléculas sintéticas utilizando-se toxinas de aranhas como protótipos moleculares. Como exemplo, o depósito recente da patente BR102014010268, que reivindicou o uso para atividade analgésica central (antinociceptiva) do peptídeo sintético Pntx-19. No âmbito de moléculas com atividades neuroprotetoras, anticonvulsivantes e antiepiléticas isoladas de artrópodes, foram desenvolvidos muitos estudos, como por exemplo, com as acilpoliaminas, envolvendo os sistemas gabaérgicos e glutamatérgicos (BELEBONI et al., 2006; CAIRRÃO et al., 2002).

Sabe-se que há fármacos derivados de componentes de peçonhas de serpentes presentes no mercado (tabela 4) e dúzias de princípios ativos com finalidades

farmacêuticas que atualmente estão sendo avaliados em testes pré-clínicos ou clínicos (MÉNEZ, STÖCKLIN e MEBS, 2006).

**Tabela 4: Fármacos comercializados produzidos a partir de toxinas de serpentes.**

<b>FÁRMACO / NOME COMERCIAL</b>	<b>ALVO E FUNÇÃO / TRATAMENTO</b>	<b>ESPÉCIE DE ORIGEM</b>
<b>Captopril; enalapril</b>	Inibidor da ECA / hipertensão	<i>Bothrops jaracussu</i>
<b>Integrilin (eptifibatide)</b>	Inibição da agregação plaquetária/ síndrome aguda coronariana	<i>Sistrurus miliarus barbouri</i>
<b>Aggrastat (tirofiban)</b>	Inibidor da GPIIb-IIIa / infarto do miocárdio, isquemia refratária	<i>Echis carinatus</i>
<b>Ancrod (Viprinex)</b>	Inibidor de fibrinogênio	<i>Agkistrodon rhodostoma</i>
<b>Defibrase</b>	Inibidor de trombina e protrombina / infarto cerebral agudo, angina peitoral inespecífica	<i>Bothrops moojeni</i>
<b>Hemocoagulase</b>	Efeito similar a trombina e atividade tromboplastínica / prevenção e tratamento de hemorragia	<i>Bothrops atrox</i>
<b>Protac / Ativador da Proteína C</b>	Ativador da proteína C / diagnóstico clínico de distúrbios hemostáticos	<i>Agkistrodon contortix</i> <i>contortix</i>
<b>Reptilase</b>	Diagnóstico de desordens de coagulação sanguínea	<i>Bothrops jararaca</i>
<b>Ecarin</b>	Ativador da protrombina / diagnóstico	<i>Echis carinatus</i>
<b>Exanta / ximelagatran</b>	Anticoagulante, inibidor da trombina	Cobra

**Fonte:** Adaptado de KOH, JEYASEETAN, ARMUGAM, 2006.

As toxinas de serpentes apresentam-se como fontes promissoras de novos compostos com aplicação na clínica. Como exemplo de sucesso de drogas que se tornaram medicamentos, pode ser citada a pesquisa desenvolvida pelo Drº Sérgio Henrique Ferreira (década de 60), estudando a peçonha da serpente *Bothrops jararaca*, quando isolou um princípio ativo denominado de FPB (fator potenciador de bradicinina) (CUSHMAN et. al., 1977; FERREIRA, BARTELT, GREENE, 1970), que serviu de protótipo para o desenvolvimento de fármacos comerciais, chamados: Captopril® e Enalapril®, atualmente distribuídos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro. (Saúde, 2013).

Tem aumentado o interesse de grupos de pesquisas em patentear novas moléculas, cujos protótipos são toxinas isoladas de diferentes serpentes. Vale ressaltar algumas patentes em que o protótipo molecular são toxinas 3-Ftx, objeto de estudo desse trabalho.

Uma patente depositada intitulada “SNAKE TOXIN AND ITS USE AS PHARMACEUTICAL” (US 2002/0150975 A1), caracterizada por conter peptídeos derivados de toxinas isolados da serpente *Naja kouthia* e *N. oxiana*, que agem nos receptores  $\alpha 7$ -nAChR, para o tratamento de câncer, em especial o câncer de pulmão e

desordens do SNC, reivindicou as composições e o uso desses peptídeos e toxinas nativas (METHFESSEL, 17 de outubro de 2002).

A patente americana depositada, intitulada “NOVEL SNAKE TOXINS” (US 2009/0285825 A1), caracterizada por conter toxinas e fragmentos peptídicos da classe das ohanatoxinas reivindicou formulações diferentes contendo essas moléculas. Essas toxinas, como citado anteriormente, apresentam atividade hipolocomotora e hiperalgésica (KINI, 19 de novembro de 2009).

Outra patente, recentemente depositada, intitulada “THERAPEUTIC USES OF  $\beta$ -ANTAGONISTS” (US 20109/0062980A1), caracterizada por conter polipeptídeos da classe das  $\beta$ -cardiotoxinas, isoladas de *Ophiophus hannah*, reivindicou o produto e suas formulações associadas a todas as vias de administração, além do uso terapêutico dessas moléculas em doenças cardiovasculares (KINI, 2010).

A utilização de toxinas de peçonhas na farmacologia pode ser observada em várias fisiopatologias. Como exemplo, enzimas da peçonha de *Naja* sp. e neurotoxinas que reconhecem os mAChR, isoladas de mambas, demonstraram-se promissoras no tratamento ou prevenção das doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer's (MULUGETA et al., 2003); a crotoxina isolada da serpente Viperidae *Crotalus durissus terrificus*, tem apresentado eficácia na redução de tumores em estudos clínicos de Fase I, em pacientes com estágio avançado de câncer (CURA et al., 2002); inibidores da colagenase induzida pela agregação plaquetária: as PLA<sub>2</sub> Acantin I e II da peçonha da serpente australiana *Acanthophis antarcticus*, estão sendo utilizadas como potentes substâncias anticoagulantes (HODGSON, 2006).

As dendrotoxinas ou  $\alpha$ -dendrotoxinas são proteínas isoladas das serpentes *D. angusticeps*. Estruturalmente, apresentam de 57 a 60 resíduos de aminoácidos e formam três pontes dissulfeto. Apresentam similaridade com inibidores de serino proteases, como as aprotininas, e farmacologicamente, antagonizam os processos de adesão celular, se ligam seletivamente, aos K<sub>v</sub>1.1, 1.2 e 1.6, com alta potência, além de bloquearem seletivamente, algumas correntes para potássio neuronais, como as correntes para potássio do tipo D, de ativação rápida, em neurônios piramidais de hipocampo (HARVEY, 2001; KINI, 2002). Têm sido utilizadas no estudo de patologias associadas aos canais para potássio.

Uma toxina heteromérica (MitTx- $\alpha/\beta$ ) isolada da serpente coral do Texas (*M. tener tener*) apresentou atividade farmacológica em canais ASIC1, envolvidos na sensação dolorosa, associada a acidose tecidual e à dor inflamatória, dos neurônios dos

gânglios trigeminiais de ratos e de camundongos, promovendo nocicepção (BOHLEN et al., 2011).

Trabalhos recentes com as toxinas cobrotoxina e  $\alpha$ -cobratoxina mostraram que estas toxinas modulam canais  $Ca_v$  com correntes do tipo T em neurônios do gânglio da raiz dorsal. Estes canais apresentam papel importante na regulação do cálcio intracelular sobre o potencial de repouso da membrana, agindo na sensação dolorosa, devido à redução do limiar de excitabilidade do potencial de membrana nos eventos nociceptivos (ZHANG et al., 2012; ZHANG et al., 2011). Trabalhos com toxinas muscarínicas (MTs) de peçonhas das serpentes elapídicas australianas, com ação sobre os mAChR do SNC (KARLSSON et al., 2000), como as toxinas  $MT\alpha= 7.543,2$  Da e  $MT\beta= 7.336,7$  Da (JOLKKONEN et al., 1995) apresentaram grande relevância para a compreensão de alguns mecanismos farmacológicos associados a algumas doenças neurodegenerativas. Estudos com MTs, em hipocampo de pacientes pós-morte com Alzheimer, também revelaram que o número de mAChR do tipo M4 encontra-se reduzido nas regiões do giro dentado e CA4, o que possivelmente, leva ao comprometimento das funções cognitivas na doença de Alzheimer (MULUGETA et al., 2003).

Portanto, considerando-se o pouco conhecimento das peçonhas de serpentes do gênero *Micrurus*, e considerando-se o seu potencial, como fonte de várias moléculas bioativas, decidiu-se neste trabalho, caracterizar bioquimicamente esta peçonha, bem como estudar (ao menos parcialmente) suas atividades farmacológicas, relacionadas às toxinas do tipo 3-Ftx.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterização bioquímica da peçonha bruta da serpente *Micrurus l. lemniscatus* com ênfase nas toxinas de três-dígitos (6-8 kDa). Investigação da ação da peçonha e de algumas de suas moléculas na citotoxicidade celular de linhagem Neuro-2A e neurônios piramidais do hipocampo em cultura, relacionando esse evento à excitotoxicidade por liberação de glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronização dos protocolos de fracionamento da peçonha bruta da *Micrurus l. lemniscatus*, por cromatografia líquida de alta pressão, visando-se melhor rendimento e separação de toxinas do tipo três-dígitos;
- Análise por espectrometria de massas das massas moleculares presentes nas frações obtidas após o processo de purificação, dando ênfase às toxinas de três-dígitos;
- Determinação das sequências N-terminais de toxinas de três-dígitos de interesse, por sequenciamento de Edman;
- Comparação das sequências primárias N-terminais das toxinas de três dígitos, com moléculas depositadas em bancos de dados, através de ferramentas de bioinformática;
- Varredura da atividade citotóxica da peçonha bruta da *Micrurus l. lemniscatus* e de suas frações isoladas, em células Neuro-2A, por ensaios de redução do sal de tetrazólio (MTT);
- Avaliação da citotoxicidade da peçonha bruta em neurônios hipocampais de ratos neonatos em cultura, por dois métodos colorimétricos: MTT e captação do corante vermelho neutro (CVN).
- Avaliação da morte celular pela peçonha bruta, por captação de calceína-AM/etídio, em microscopia de fluorescência, em neurônios hipocampais de ratos neonatos em cultura.

- Isolamento da fração de interesse (Fração 22) e purificação de toxinas de três-dígitos que compõem essa fração (MI7256\_NTX, MI7294\_NTX e MI7119\_NTX);
- Avaliação da atividade da Fração 22 e de suas toxinas de três-dígitos isoladas, sobre a liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos adultos.
- Investigação do possível mecanismo de ação da Fração 22 na excitotoxicidade e sua contribuição na neurotoxicidade central desencadeada pela peçonha de *Micrurus l. lemniscatus*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DA PEÇONHA BRUTA DA SERPENTE *Micrurus l. lemniscatus*

A peçonha da serpente *Micrurus l. lemniscatus* (300 mg de peso seco) foi cedida em regime de colaboração pela Fundação Ezequiel Dias/MG (FUNED), representada pelas pessoas do Sr. Rômulo Toledo (Serviço de Animais Peçonhentos) e Sr. Maurício Santos (Diretoria Industrial). A peçonha foi obtida por extrações múltiplas de diferentes exemplares de serpentes machos e fêmeas da mesma espécie, e feito um pool desse material (alíquota 1998-2000). A peçonha bruta foi liofilizada e armazenada em freezer, a -20°C, até o uso.

A peçonha bruta foi fracionada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC - High Performance Liquid Chromatography), nos cromatógrafos AKTA Explorer 100 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), AKTA Purifier (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) e Ettan LC (Amersham Biosciences) controlados pelo software UNICORN 4.11, equipados com módulo de coleta automática de frações (Frac920, Amersham Biosciences). A eluição foi acompanhada por monitoramento das absorvâncias a 214 nm e 280 nm e foram utilizadas estratégias de fracionamento, em uma, duas ou três dimensões, conforme descrito abaixo.

##### 3.1.1 Estratégia 1: Fracionamento unidimensional da peçonha bruta por Fase Reversa

Para a obtenção de frações semipurificadas, a peçonha bruta (10 a 12 mg de peso seco) da serpente *Micrurus l. lemniscatus* foi fracionada por Fase Reversa (RPC), utilizando-se uma coluna semi-preparativa Discovery Supelco C18, de 25 cm, com fluxo de 4,0 mL/min. A peçonha foi ressuspensa em eluente A (solução aquosa de TFA 0,1% v/v) e aplicada à coluna previamente equilibrada com o mesmo eluente. A eluição foi obtida por meio de gradiente linear de 0 - 80% de solução de TFA 0,1% em acetonitrila (ACN) v/v (eluente B), com um volume de coleta de 1 ml em placas de 96 poços siliconadas, no modo automático.

### **3.1.2 Estratégia 2: Fracionamento bidimensional da peçonha bruta por cromatografias de Troca Iônica e Fase Reversa (RPC)**

A segunda estratégia consistiu em fracionar a peçonha bruta em cromatografia de Troca catiônica (CIEX) seguida de uma RPC.

Para o primeiro passo cromatográfico utilizou-se uma coluna TSK-Gel CM-SW, 15 cm x 4,6 mm (Tosoh Biosep), com fluxo de 0,75 mL/min<sup>-1</sup>. A coluna foi equilibrada com o tampão acetato de sódio 20 mM, em pH=5,0 (eluente A). A peçonha bruta liofilizada (2 mg) foi ressuspensa em eluente A e aplicada à coluna previamente equilibrada. A eluição foi obtida através de um gradiente linear de 0 a 1 M de cloreto de sódio (NaCl) e acetato de sódio 20 mM, ajustado a um pH 5,0 (eluente B), com volume de coleta de 1 mL.

As frações obtidas da cromatografia de Troca Iônica foram submetidas à etapa seguinte em RPC, na qual foi utilizada a coluna Source™ 5 4,6/150 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), com fluxo de 1 mL/min. A coluna foi equilibrada com solução aquosa de TFA 0,1% (eluente A). A eluição com gradiente de acetonitrila, TFA 0,1% (eluente B) foi obtida através do programa: 0-20% B em 18 min., 20-65% B em 92 min.; 65-70% B em 3 min.; 70-100% B em 7 min. e 100% B em 10 min., com volume de coleta de 0,5 mL em placas de 96 poços siliconadas, no modo automático.

### **3.1.3 Estratégia 3: Fracionamento tridimensional da peçonha bruta por cromatografias de Troca Catiônica e duas Fases Reversas**

Nessa estratégia foram feitas as etapas da Estratégia 2 (descrito acima) e, adicionalmente, foi efetuado o terceiro passo de RPC, com uma coluna C18 Pepmap (Applied Biosystems), com fluxo de 1 mL/min<sup>-1</sup>. A coluna foi equilibrada com solução aquosa de TFA 0,1% (eluente A). A eluição foi obtida por meio de gradiente linear de 0 - 40% de solução de TFA 0,1% em ACN (eluente B), com volume de coleta de 0,5 mL/poço em placas de 96 poços siliconadas, no modo automático.



### 3.1.4 Estratégia 4: Fracionamento bidimensional por cromatografias de Fase Reversa e Troca Aniônica

Nessa estratégia realizou-se a etapa da estratégia 1 e, adicionalmente, efetuou-se uma etapa de Troca Aniônica (AIEX), em uma coluna Mono Q 4.6/100 PE (Tricorn), com fluxo de 2 mL/min. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM (eluente A), ajustado para pH 8,0. A eluição foi obtida por meio de um gradiente linear de 0 – 1M de NaCl, Tris-HCl 20 mM em pH 8,0 (eluente B), com volume de coleta de 1 mL em placas de 96 poços siliconadas, no modo automático.

## 3.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As massas moleculares das frações semipurificadas e toxinas protéicas isoladas foram determinadas por espectrometria de massas. As análises foram realizadas por MALDI-TOF- MS, utilizando-se o aparelho Ultraflex II (Bruker Daltonics, Alemanha), operado em modo positivo e controlados pelo *software* FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha).

As amostras provenientes de cada passo cromatográfico foram adicionadas a uma solução saturada de matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich) e de uma matriz contendo 90% de ácido 2,5-diidroxibenzóico e 10%  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (super DHB) (Sigma-Aldrich) numa proporção de 1:1 (v/v) em placas MTP AnchorChip 600/384, polimerizadas a 25 °C. As amostras oriundas da cromatografia de troca iônica foram previamente dessalinizadas em ponteira Zip-Tip contendo a resina C18-P10 (Millipore) antes das análises por espectrometria de massas.

Para a determinação da massa média das moléculas na faixa entre 5.000 – 20.000 Da, foi empregado o modo linear com calibração externa no qual utilizou-se o padrão de calibração de proteínas indicado pela fabricante (*Protein Calibration Standard I*, Bruker Daltonics, Alemanha). Os dados foram analisados utilizando-se o programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha (RATES, 2011; RATES et al., 2007).

### 3.3 SEQUENCIAMENTO N-TERMINAL POR DEGRADAÇÃO DE EDMAN

As estruturas primárias parciais das toxinas de três-dígitos (6-8 kDa) foram determinadas por meio de sequenciamento N-terminal por degradação de Edman. Foi utilizado um sequenciador modelo PPSQ-23 (Shimadzu Co.) e aplicados 20 µL de cada amostra, diluída em água deionizada contendo 0,1 % (v/v) de TFA, por ciclo (modificado de SANTOS et al., 2010).

### 3.4 ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS PRIMÁRIAS

As sequências primárias relativas ao N-terminal de cada toxina foram utilizadas para a busca por similaridade, realizadas por meio do programa BLAST 2.2.23 através de alinhamento múltiplo de sequências foi realizado por meio do software Clustal 2.0.12, verificando-se a homologia com outras biomoléculas e toxinas depositadas em bancos de dados, como SWISS-PROT, utilizando-se a ferramenta de bioinformática Fasta3 (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>) e o ExPASy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org>) (CISCOTTO et al. 2011).

### 3.5 DOSAGENS DA PEÇONHA BRUTA, FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS E TOXINAS TRÊS-DÍGITOS DA SERPENTE *Micrurus l. lemniscatus*

A concentração de proteínas da peçonha bruta, frações semipurificadas e das toxinas três-dígitos (com massas moleculares entre 6-8 kDa) obtidas do fracionamento da peçonha bruta da *Micrurus l. lemniscatus* foi determinada pelo método colorimétrico de Lowry e col. (1951).

Adicionou-se em placas de 96 poços (TPP®), 20 µL do reagente de Folin-Ciocalteau (Sigma) em 210 µL de solução de biureto (sulfato de cobre a 1 %, tartarato de sódio e potássio anidro a 1% e carbonato de sódio alcalino a 2 %, 1:1:98 v/v/v), e 10 µL da amostra de peçonha bruta, das frações ou toxinas. A mistura foi incubada por 60 minutos à temperatura ambiente. Uma curva de calibração foi obtida utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 750 nm, em aparelho multifuncional espectrofotométrico Varioskan™ Flash (Thermo Scientific).

A PB, frações semipurificadas e toxinas 3-Ftx com as concentrações proteicas determinadas foram utilizadas para o estudo de citotoxicidade basal e liberação de L-Glu.

### 3.6 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Todos os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. O projeto relativo a este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 164/2012).

Ratos neonatos da espécie *Rattus norvegicus*, albinos, da linhagem Wistar machos e fêmeas (P<sub>0</sub>-P<sub>5</sub>), até 6 horas de desmame, foram utilizados na cultura primária de neurônios hipocampais (n=8, por cultura).

Ratos adultos, machos, da espécie *Rattus norvegicus*, albinos, da linhagem Wistar, com peso 180-300 g, foram utilizados para o preparo dos sinaptosomas cérebro-corticais. Todos os animais foram mantidos em caixas de plástico 17 x 34 x 40 cm em grupos de 4 animais, com livre acesso à alimentação padrão (ração Labina), água potável e ciclo de 12/12 horas claro/escuro.

### 3.7 CULTIVOS CELULARES

Foram realizados dois cultivos celulares, sendo um de linhagem celular oriunda de neuroblastoma de camundongo e um de cultura primária de neurônios hipocampais extraídos de ratos Wistar neonatos machos e fêmeas, até cinco dias de nascidos.

Todos os procedimentos com as células foram realizados em ambiente isolado e estéril, na capela de fluxo laminar, com todos os protocolos de assepsia com álcool 70 % (v/v) e esterilização dos materiais cirúrgicos (a seco, na estufa a 50 °C); de cultura (autoclavagem); do ambiente (por radiação UV), além do uso dos equipamentos de proteção individuais (toca, luvas de procedimentos cirúrgicos e máscara, ambos descartáveis; jaleco) reduzindo ao máximo o risco de contaminação da cultura primária e de linhagem.

### 3.7.1 Cultura celular de linhagem neuronal Neuro-2A

A linhagem celular Neuro-2A (ATCC: CCL131) foi adquirida do Banco de Células do COPPE, localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro e cedida gentilmente pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Miriam Chaves (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG). O clone das células Neuro-2A foi estabelecido a partir de um neuroblastoma espontâneo em camundongo albino, originado de células da medula espinhal. É uma linhagem amplamente usada em modelos neuronais *in vitro* que exhibe fenótipos morfológico e químico de neurônios (TAMIJI e CRAWFORD, 2010; BASTA-KAIM, et al., 2006; CALDERÓN et al., 1999).

As células foram inoculadas em garrafas de cultivo celular (TPP) estéreis, com superfície de 75 cm<sup>2</sup>, contendo meio de cultura RPMI (Sigma), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, L-glutamina (2 mM) e 1 % de solução de antibióticos penicilina (10.000 U/ml) e estreptomicina (10.000 µg/ml) (Invitrogen). As garrafas foram incubadas em estufa de cultivo celular a uma temperatura de 37 °C, com uma atmosfera umidificada a 100% e areada com 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, até atingirem uma confluência celular de aproximadamente 80%, com as células aderidas, por análise em microscopia óptica (Nikon).

Para os ensaios de citotoxicidade, as células foram desprendidas da garrafa utilizando uma solução de tripsina-EDTA 0,05% (Life Technologies) em tampão PBS 10 mM, e levadas ao microscópio óptico para a contagem celular em câmara de Neubauer por ensaio de viabilidade por azul de Tripán (0,4 %) (Sigma), sendo 10 µl do corante para 10 µl da suspensão celular. Em seguida, foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 5x10<sup>3</sup> células/poço, e novamente incubadas por 24 h em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C (Figura 17). Entre o período de 24 e 48 h após terem sido semeadas, as células foram submetidas aos tratamentos com a peçonha bruta ou as frações semipurificadas para os ensaios de toxicidade celular pela redução do MTT.

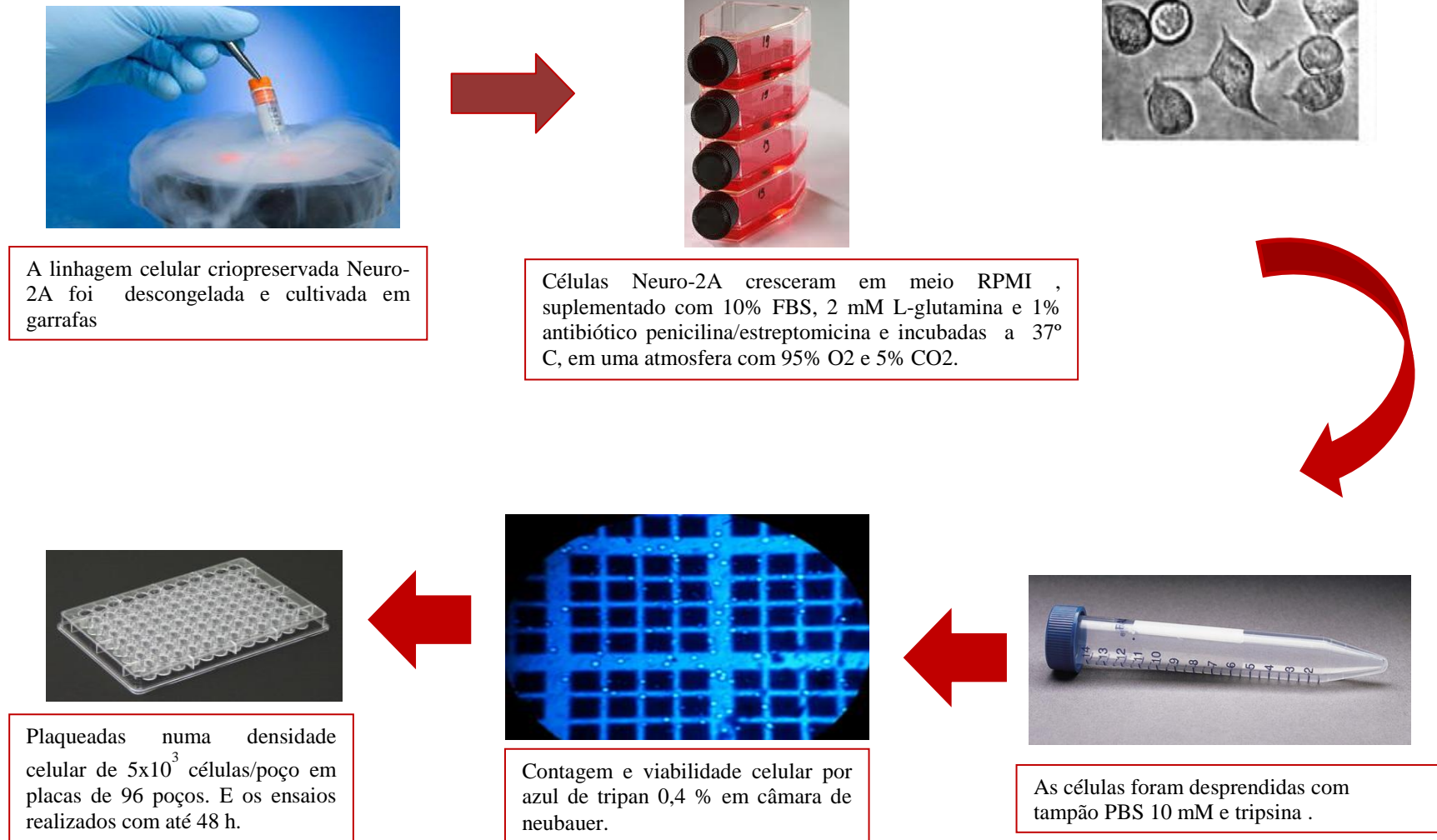


Figura 17: Esquema do cultivo celular de células de linhagem Neuro-2A (ATCC: CCL131).

### 3.7.2 Cultura primária de neurônios piramidais de hipocampo de ratos neonatos

A cultura primária de neurônios piramidais de hipocampo de ratos neonatos foi utilizada para a investigação da citotoxicidade basal induzida pela peçonha bruta utilizando os ensaios de colorimétricos de MTT e CVN.

Para essa cultura, ratos neonatos machos e fêmeas (P<sub>0</sub>-P<sub>5</sub>, 8 animais por cultura) foram eutanaziados e tiveram os cérebros cirurgicamente removidos e preservados em gelo. Os hipocampos foram isolados com o auxílio de um estereoscópio binocular (Nikon) e inseridos em uma placa de cultura de células (35 x 10 mm) (Corning Life Science) contendo meio neurobasal para cultura de células de neonatos (Invitrogen) a 1 % de antibióticos penicilina (10.000 U/ml) e estreptomicina (10.000 µg/ml) (Gibco-Invitrogen), mantidos a 8°C. Os hipocampos foram lavados em ambiente estéril (fluxo laminar) com 1,5 ml de solução fisiológica Hank's Balance Solution (HBSS) (Gibco-Invitrogen), constituído de (mM): KCl (5,36), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,44), NaHCO<sub>3</sub> (4,16), NaCl (136,9), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,336), C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (5,55). A solução foi parcialmente retirada restando 300 µl para hidratação do tecido.

Em seguida, os hipocampos sofreram trituração mecânica em ambiente estéril, no fluxo laminar. Esses foram adicionados a 2,5 ml de HBSS contendo vermelho de fenol (Sigma) a 0,25 % v/v e tripsina de pâncreas suíno 13.000-20.000 U/mg (Sigma), sendo enzimaticamente dissociados durante 10 min, a 37 °C. Após este período, o homogenato foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Ao homogenato foram adicionados 2 ml de uma solução contendo 86% v/v de HBSS com vermelho de fenol (Sigma) a 0,25 % v/v, 5% v/v de uma solução contendo a enzima DNase I, tipo II 40 Kb (Sigma) na concentração de 5.000 U/mL em HBSS e 10 % v/v de soro fetal bovino (Invitrogen) em um volume final de 4666 ml. Essa mistura foi centrifugada a 300 g, por 2 min, a 20 °C (centrífuga Hettick). Em seguida, o sedimento foi removido e adicionado a 2 ml de uma solução de HBSS com vermelho de fenol (Sigma) a 0,25 % v/v, sendo o pH previamente equilibrado com uma mistura carbogênica (95 % O<sub>2</sub> e 5 % CO<sub>2</sub>) para uma faixa de pH=7,3 – 7,4.

O novo homogenato sofreu dissociação mecânica com pipetas Pasteur de vidro partindo do maior diâmetro para o menor, repetindo o procedimento 20 vezes por diâmetro. Em seguida, esse foi centrifugado a 300 g, por 5 min. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura Neurobasal para neonatos (Invitrogen), suplementado com 10 mM de ácido glutâmico (Sigma), 100 mM de glutamina

(Invitrogen), 1% de solução de antibióticos penicilina (10.000 und/ml) e estreptomicina (10.000 µg/ml) (Invitrogen), e 10% de suplemento B27 (Invitrogen®). A suspensão celular foi aplicada em peneira celular 70 µm (BD Biosciences). As células foram contadas em hemocítômetro do tipo câmara de Neubauer (Marienfeld), sendo 10 µL da suspensão celular e 10 µL do corante azul de Tripán 0,4 % m/v (Sigma) analisada em microscópio óptico com aumento de 40 vezes.

As placas de cultura de células de 96 poços foram previamente preparadas com lamínulas tratadas com 50 µg/ml de poli-D-lisina (Sigma), armazenadas por 4 horas em ambiente estéril. As células foram então inoculadas nessas placas, na densidade de  $2 \times 10^4$  células em aproximadamente 10 µl. Estas placas, contendo as células, foram incubadas em estufa com atmosfera umidificada a 100% e areada a 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, à temperatura de 37 °C, por 60 min. para a adesão celular. Nas placas foram ajustados os volumes de 200 µl/poço com meio Neurobasal suplementado, e essas novamente incubadas em estufa a 37 °C nas mesmas condições anteriores. O meio foi parcialmente substituído (40 %) após 48 h de incubação e os neurônios analisados morfológicamente para visualização dos prolongamentos dendríticos, em microscópio óptico invertido (Life technology), com aumento das objetivas de 40 vezes, sendo então utilizados do 7º ao 10º dia de cultura (figura 18) (Adaptado de: GROMOVA, CHUBAKOV, CHUMASOV, & KONOVALOV, 1983; BANKER e COWAN, 1977).

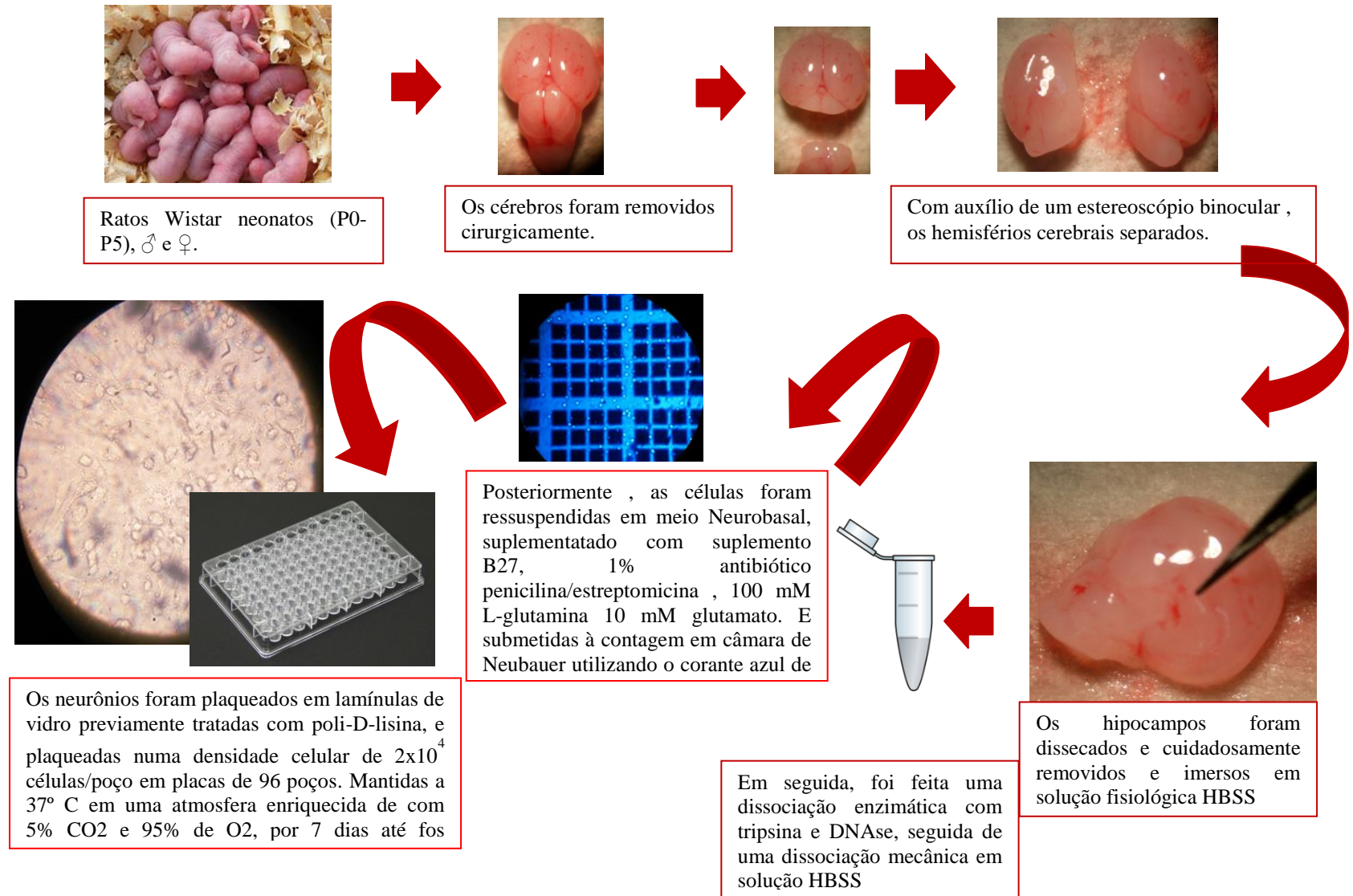


Figura 18: Esquema do cultivo celular de neurônios piramidais de ratos neonatos.



### 3.8 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE BASAL

Os ensaios de citotoxicidade basal foram realizados por dois métodos colorimétricos: o ensaio de MTT (brometo de tetrazólio) que avalia a integridade mitocondrial e a do corante vermelho neutro (CVN), que avalia a integridade lisossomal. E um terceiro método, por microscopia de fluorescência utilizando os fluoróforos calceína-AM e etídio, que avaliam a viabilidade e morte celulares, respectivamente.

#### 3.8.1 Ensaio de redução do MTT

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* por MTT é um teste padrão-ouro utilizado pelo FDA (U.S. Food and Drug Administration) baseado em normas sugeridas pela *International Organization for Standardization*, ISO 10993-5: 2009, para avaliação biológica de dispositivos médicos (FDA 2012).

No ensaio de MTT, as desidrogenases mitocondriais convertem o 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol brometo (MTT), um sal solúvel de coloração amarela, em um produto de coloração roxa, o formazam (composto insolúvel) (MOSMANN 1983). A concentração do produto final, o formazam, é um índice de viabilidade celular, tendo em vista que corresponde a dosagem indireta do que foi metabolizado pelas enzimas mitocondriais.

Para esse ensaio, as células de linhagem Neuro-2A semeadas em placas de 96 poços, com uma densidade de  $5 \times 10^3$  células/poço, previamente mantidas em estufa de cultivo celular, a 37 °C, umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, por um período entre 24 h e 48 h foram desafiadas com diferentes concentrações da peçonha bruta ( $5 \times 10^{-5}$ ;  $5 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-3}$ ;  $5 \times 10^{-2}$ ;  $5 \times 10^{-1}$ ; 2,5; 5; 25; 50; 125; 500 e 1.000 µg/ml) e de algumas das frações semipurificadas (5 µg/ml) pela primeira estratégia cromatográfica. Os neurônios hipocámpais em cultura maduros (7<sup>o</sup>-10<sup>o</sup> dia de cultura) semeados em placas de 96 poços, com uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço e mantidos em estufa de cultivo celular nas mesmas condições anteriores, foram desafiados com diferentes concentrações da peçonha bruta ( $5 \times 10^{-5}$ ;  $5 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-3}$ ;  $5 \times 10^{-2}$ ;  $5 \times 10^{-1}$ ; 2,5 5 µg/ml). Como controle positivo (100 % de morte celular) foi utilizado o KCl 3 M e controle negativo as células em meio de cultura sem tratamento. O tempo de incubação com as frações e a peçonha foi de 24 horas em estufa de cultivo celular umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a, 37 °C.

Após a incubação, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com tampão PBS 50 mM, em seguida as células foram tratadas com o reagente MTT (Sigma) a 5 mg/ml, ajustando-se a um volume final de 200 µl/poço com o mesmo tampão e incubadas por 04 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e adicionado 100 µl do detergente DMSO (Sigma) para a solubilização dos cristais de formazan.

Em seguida, a placa foi submetida à leitura em aparelho espectrofotômetro de placas, tipo leitor de ELISA, na absorbância de (Y) 570 nm. A porcentagem de morte celular foi calculada como: % de morte celular = ("Y" experimental poço/"Y" do controle positivo) x 100 - 100. Os valores brutos de cada poço foram subtraídos dos valores obtidos na leitura basal do branco (DMSO) (figura 19).

### **3.8.2 Ensaio de captação do Vermelho Neutro (CVN)**

O sistema lisossomal tem sido identificado como um alvo farmacológico de substâncias que apresentam toxicidade celular (SVENDSEN, et al., 2004).

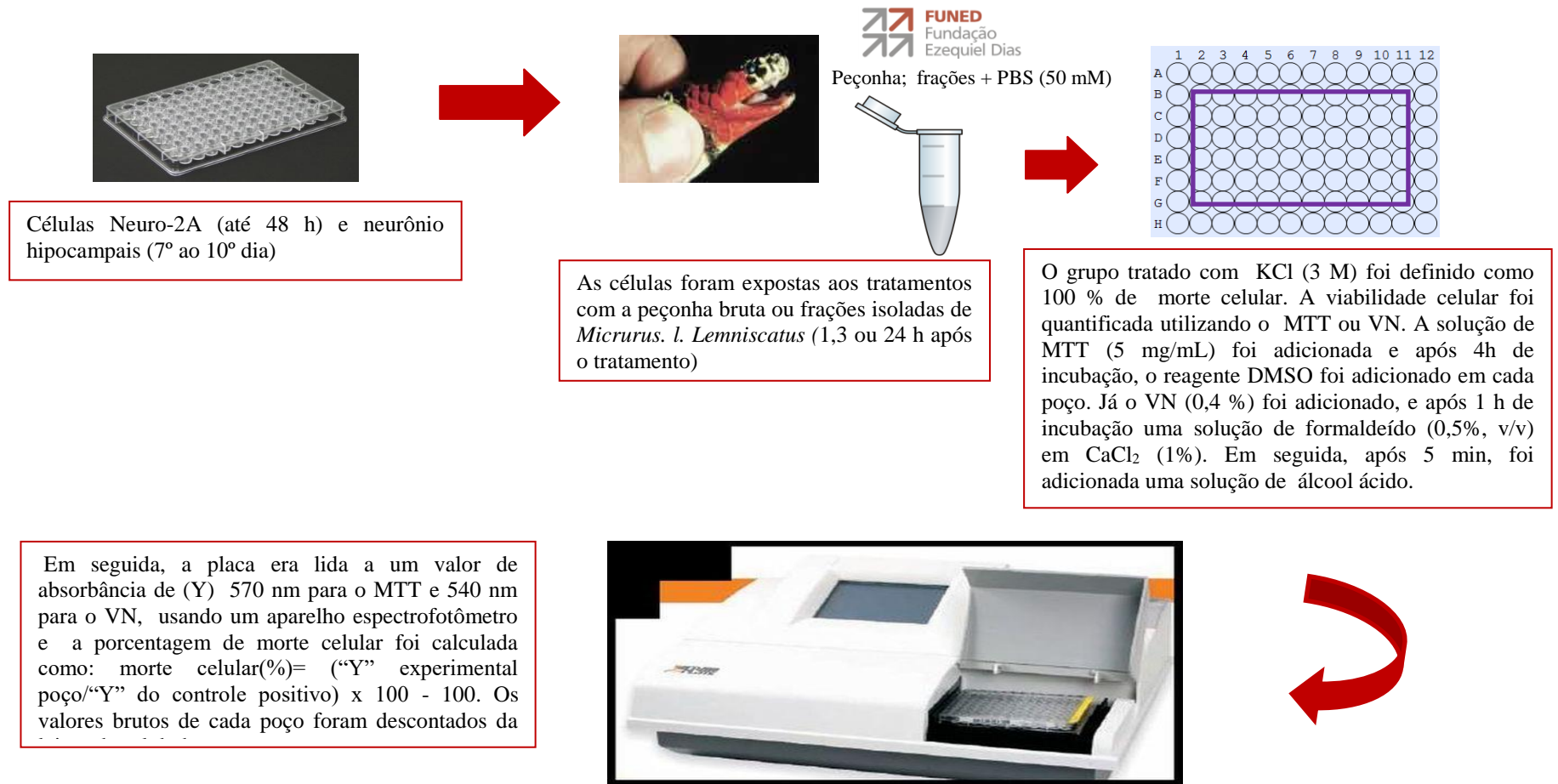
O ensaio de CVN, baseia-se no uso do vermelho neutro, um corante catiônico fraco, que se liga por ligações hidrofóbicas e/ou grupos fosfato na matriz lisossômica das células viáveis (THORNTON, et al., 1995). A exposição a um agente tóxico que altere a membrana lisossomal promove o escoamento desse corante (RENZI, VALTONILA e FOSTER 1993). A quantidade de vermelho neutro retida no lisossomo é determinada espectrofotometricamente. Logo, o aumento da coloração indica a lise da membrana lisossômica.

Para esse ensaio, os neurônios hipocâmpais em cultura maduros (7<sup>o</sup>-10<sup>o</sup> dia de cultura) semeados em placas de 96 poços com uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço previamente mantidos em estufa de cultivo celular, a 37 °C, umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, foram desafiados, por 24 horas, com diferentes concentrações da peçonha bruta ( $5 \times 10^{-5}$ ;  $5 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-3}$ ;  $5 \times 10^{-2}$ ;  $5 \times 10^{-1}$ ; 2,5 5 µg/ml). Como controle positivo (100 % de morte celular) foi utilizado o KCl 3 M e controle negativo as células em meio de cultura sem tratamento. O tempo de incubação com as frações e a peçonha foi de 24 horas em estufa de cultivo celular umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a, 37 °C.

Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com tampão PBS 50 mM, em seguida as células foram tratadas com o corante vermelho neutro (Sigma) a 0,4% m/v, ajustando-se a um volume final de 200 µl/poço

com o mesmo tampão e incubadas por 01 hora. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e adicionado 200 µl de solução de formaldeído (0,5%, v/v) em CaCl<sub>2</sub> (1% m/v). Após cinco minutos, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µL de solução de álcool ácido (BABICH e BORENFREUND, 1991).

A placa foi lida conforme descrito no item acima e os valores brutos de cada poço foram subtraídos dos obtidos na leitura basal do branco (solução de álcool ácido) (figura 19).



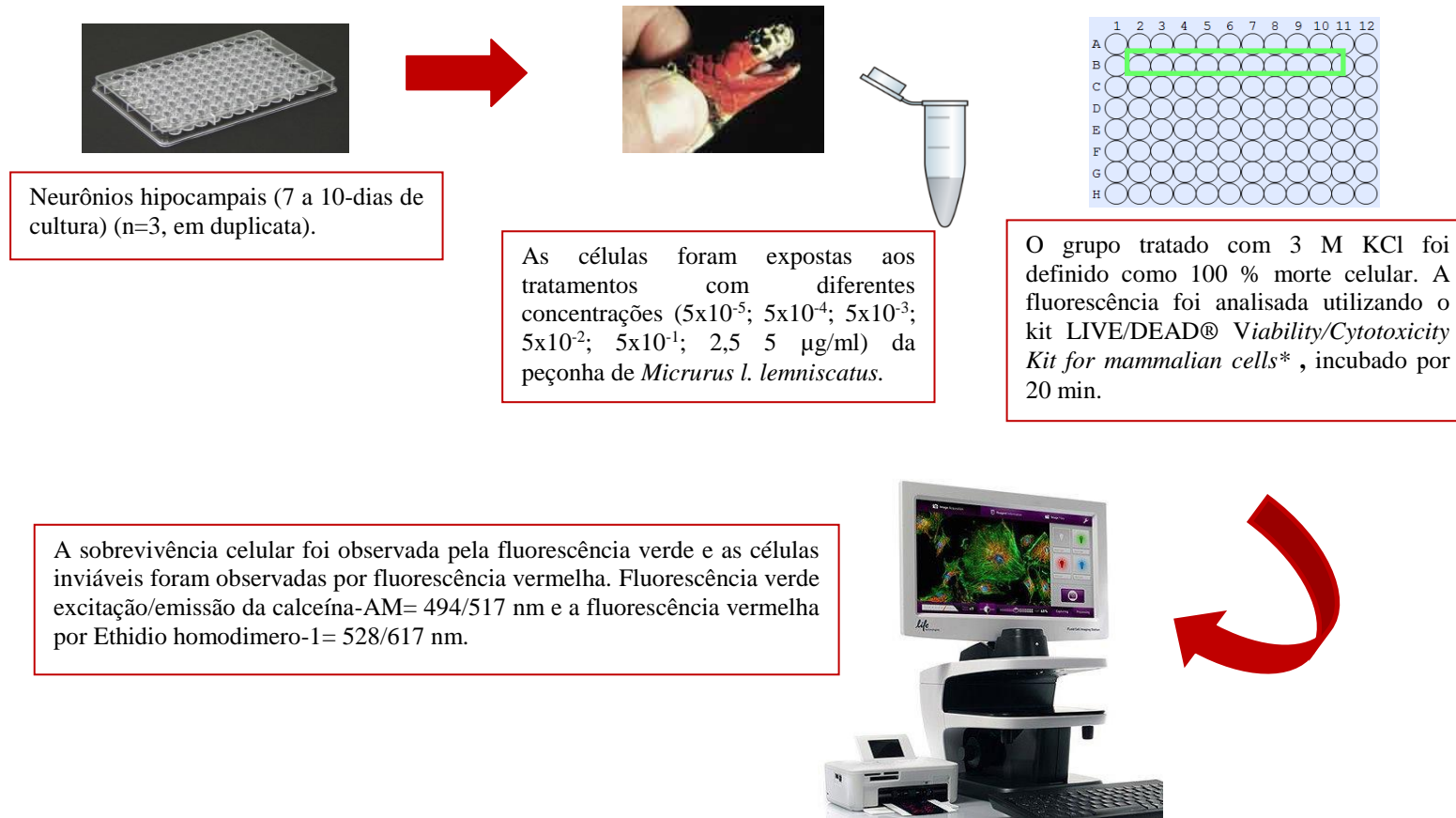
**Figura 19:** Esquema dos ensaios de citotoxicidade por MTT ou VN em neurônios hipocámpais e linhagem Neuro-2A.

### 3.8.3 Ensaio de microscopia de fluorescência para determinação da viabilidade celular

O ensaio de toxicidade celular por microscopia de fluorescência foi realizado utilizando-se o kit para células de mamíferos LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (Life Technologies - Molecular Probe), que continha os fluoróforos calceína-AM e homodímero-1 de Etídio. A viabilidade celular foi analisada através da emissão de fluorescência verde e vermelha, baseada no reconhecimento simultâneo da atividade intracelular das enzimas esterases, pela calceína-AM e pela integridade da membrana plasmática, pelo homodímero-1 de Etídio.

Os neurônios hipocampais (7 -10 dias de cultura) foram tratados com diferentes concentrações da peçonha bruta da *Micrurus l. lemniscatus* ( $5 \times 10^{-5}$ ;  $5 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-3}$ ;  $5 \times 10^{-2}$ ;  $5 \times 10^{-1}$ ; 2,5 5  $\mu\text{g/ml}$ ) por 24 horas. Como controle de morte foi utilizado o KCl 3 M.

Após os tempos de incubação, o sobrenadante foi removido e os neurônios marcados com calceína-AM ( $1,66 \times 10^{-3}$   $\mu\text{L}$ , v/v) e pelo homodímero-1 de Etídio ( $1 \times 10^{-2}$   $\mu\text{L}$ , v/v) em tampão PBS 50 mM (contendo: 50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (solução A) e 50 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (solução B). A solução B teve o seu pH acertado para 7,4 com a solução A). A mistura foi incubada por 20 minutos em estufa celular a  $37^\circ\text{C}$  contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, o sobrenadante foi removido e foram feitas 3 lavagens sucessivas com tampão PBS 50 mM. As imagens foram adquiridas utilizando o Microscópio de Fluorescência (EVOSR FLoidR Cell Imaging Station/Invitrogen), com as objetivas de 40 vezes de aumento. Os filtros de emissão (EM) e excitação (EX) utilizados para a fluorescência da calceína-AM e homodímero-1 de Etídio foram EM/EX 517/494 ou 528/617 nm, respectivamente. Como controle negativo utilizou-se neurônios não marcados (Figura 20).



**Figura 20:** Esquema dos ensaios de citotoxicidade por microscopia de fluorescência em neurônios hipocâmpais.

### 3.9 LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO EM SINAPTOSOMAS CÉREBRO-CORTICAIS DE RATOS

#### 3.9.1 Obtenção dos sinaptosomas

Ratos adultos (200-300 g) foram eutanaziados, os cérebros rapidamente removidos, imersos em solução de homogeneização (sacarose 0,32 M, EDTA 1 mM e Ditioneitol 0,25 mM, pH=7,4 com NaOH 0,1 M) e mantidos no gelo, em seguida foram utilizados no preparo dos sinaptosomas, como previamente descrito por Dunkley e col. (1988). Cada hemisfério cerebral foi separado sobre papel filtro, umedecido com solução de homogeneização e mantidos sobre gelo. Os hemisférios foram dissecados até a completa retirada da substância branca, hipocampo e cerebelo, mantendo-se apenas o córtex. Os córtex foram colocados em um tubo (Thomas Company- B19982) contendo 5 ml de solução de homogeneização. Eles foram então homogeneizados a 4°C em movimentos contínuos de subida e descida por quatro vezes (homogeneizador Potter-Elvehjem), com intervalos de 2 min. entre cada movimento, preservando a funcionalidade do tecido.

A suspensão de extrato do córtex cerebral foi centrifugada (Centrífuga Hitachi - Himac CR21GII, Rotor R20A2) a 4°C, 3000 g (1.080 x g), por 10 min. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e colocado em dois tubos contendo gradientes descontínuos de Percoll (Sigma-EUA) na ordem decrescente de 23%, 15%, 10% e 3% (v/v). Os tubos com o sinaptosoma e os gradientes de percol foram centrifugados (Hitachi - Himac CR21GII, Rotor R20A2) a 4°C, 3.900 g durante 15 min. Posteriormente, retiraram-se cuidadosamente, as frações 3 e 4, que continham sinaptosomas e membranas e apenas sinaptosoma, respectivamente; colocando-as em tubos de centrífuga (SORVALL Tube, PP- F, 50 ml), sendo então lavadas com um volume final de 45 ml de solução de Krebs-Ringer- Hepes (KRH: NaCl 0,124 M, KCl 4 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, Hepes 25 mM, Glicose 10 mM pH 7,4 com NaOH 5 M) ausente de CaCl<sub>2</sub>.

Os sinaptosomas foram coletados (sedimento branco), ressuspensos em 1.200 µl de KRH com CaCl<sub>2</sub> (2 mM), em pH 7,4 homogeneizados e centrifugados (Hettich MIKRO 200 R) durante 30 seg. a 9.500 g, a 4°C. As soluções contendo os sinaptosomas tiveram a sua quantidade de proteínas determinada pelo método descrito abaixo. O intervalo entre o término do procedimento e o uso foi de 30 min, e os

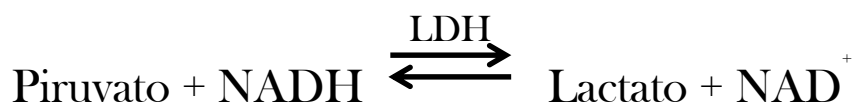
sinaptosomas mantidos em uma temperatura de 8° C, tempo necessário para as membranas se recomporem. Os sinaptosomas foram distribuídos em placas de 96 poços correspondendo a 10% do volume final de 200 µl/poço. Nos experimentos utilizando-se bloqueadores farmacológicos do tipo antagonistas, essas drogas foram pré-incubadas a 37 °C com os sinaptosomas 30 min, antes do início dos experimentos.

### 3.9.2 Determinação da concentração das proteínas sinaptosomais

A concentração de proteínas sinaptosomais foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976), em placas de 96 poços. Foram utilizados 190 µL do reagente de Bradford (Sigma), adicionados a 10 µL da amostra contendo as proteínas sinaptosomais, pré-incubados por 10 minutos. Uma curva de calibração foi realizada utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 595 nm, em aparelho multifuncional espectrofotométrico Varioskan.

### 3.9.3 Avaliação da integridade sinaptosomal por dosagem da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

A dosagem da atividade da enzima citosólica, lactato desidrogenase foi feita segundo Kubowitz e Ott (1943). Essa enzima é considerada um marcador citoplasmático, visto que é encontrada no meio extracelular apenas após a lise da membrana plasmática. A enzima lactato desidrogenase (LDH) catalisa a redução do piruvato a lactato a partir da oxidação do NADH a NAD<sup>+</sup> (figura 21) (MOURA et al. 2008).



**Figura 21: Representação da reação catalisada pela enzima citoplasmática Lactato desidrogenase (LDH). A LDH catalisa a redução de piruvato a lactato, fazendo uso da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) como agente redutor. O NADH ao ser oxidado a NAD<sup>+</sup> promove uma redução da fluorescência do meio, que é monitorada por uma absorbância de 365 nm.**

A reação da enzima LDH (Sigma) foi monitorada por absorbância a um comprimento de onda de 365 nm em espectrofluorímetro (Fluorímetro Synergy 2 Multi-

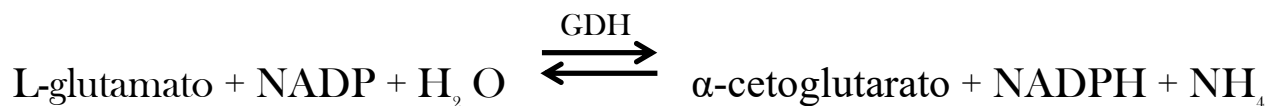


Mode Microplate Reader, Biotek), controlado pelo software BioTek's Gen5™ Reader Control e data Analysis Software. Considerando-se que o NADH adicionado ao meio pode ser convertido a NAD<sup>+</sup> e à medida em que esse se forma ocorre uma diminuição da absorvância. Como controle positivo usou-se 1% de Triton X 100, q.s.p 200 µl, que é um agente que desfaz a integridade da membrana plasmática, causando o rompimento celular e liberação de todo o conteúdo citoplasmático.

Para o ensaio da LDH, 130 µl de solução de PBS 50 mM, em pH 7,4, pré incubado com 6,3 mM de Piruvato (Sigma) foram adicionados na placa de 96 poços e essa levada ao aparelho fluorímetro, incubando a 37°C por 1 min. até a estabilização. Adicionou-se 10 µl de NADH (0,063 mM), 20 µl da solução contendo os sinaptosomas e 50 µl de diferentes concentrações da peçonha bruta da serpente *Micrurus l. lemniscatus* (5x10<sup>-4</sup>; 5x10<sup>-3</sup>; 5x10<sup>-2</sup>; 5x10<sup>-1</sup>; 2,5 5; 50; 500 µg/ml), a fração 22 (5x10<sup>-1</sup>; 5 µg/ml) e a toxina MI7294\_NTX (1 µM). As leituras foram realizadas a 365 nm em intervalos de 1 min durante 60 minutos.

### 3.9.4 Liberação de L-glutamato

O ensaio de liberação de L-Glu foi realizado de acordo com Nicholls, Sihra e Sanchez-Pietro (1987) *adaptado por* Torres, (2011), Nunes (2012) e Lomeu, (2014). Esse método baseia-se na conversão do L-glutamato a α-cetogluturato pela enzima Glutamato desidrogenase (GDH). Nessa reação de oxido-redução, a β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP<sup>+</sup>) é reduzido a NADPH, com a molécula de água como doadora de oxigênio (figura 22). Este composto, quando excitado a 340/11 nm, emite uma fluorescência que é quantificada e detectada no comprimento de onda 440 nm (SUGIMURA, et al. 2001).



**Figura 22: Representação da reação catalisada pela enzima Glutamato desidrogenase (GDH). A GDH catalisa a oxidação de L-glutamato a α-cetogluturato, fazendo uso da NADP<sup>+</sup> e da molécula de água formando o produto o NADPH, que produz uma fluorescência nos comprimentos de onda de Ex/Em: 340/440 nm.**

Para o procedimento experimental, 20 µl da suspensão sinaptosomal, recentemente preparada, foi adicionada à placa contendo NADP (1 mM); solução

fisiológica KRH com  $\text{CaCl}_2$  (2 mM). Após adicionou-se diferentes concentração de peçonha, fração ou toxinas e/ou bloqueadores farmacológicos, ajustando-se para um volume final de 200  $\mu\text{l}$ .

No espectrofluorímetro, a placa foi incubada a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , por 60 segundos para estabilização. Em seguida, adicionou-se 4,5 U/ml da enzima GDH, com incubação e leituras por mais 10 min., e posteriormente, a peçonha bruta, fração, toxina ou KCl foram adicionados e a liberação de L-Glu monitorada por 60 minutos, com leituras das absorbâncias realizadas em intervalos de 14 segundos. Usou-se como detector o aparelho espectrofluorimétrico (Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader- Biotek- EUA), controlado pelo Software BioTek Gen5™ Reader Control & Data Analysis Software (Biotek- EUA). Os resultados foram normalizados e considerou-se como controle negativo a liberação espontânea basal de L-Glu. Como controle positivo usou-se uma solução de KCl (33 mM), agente despolarizador da membrana celular, que desencadeia a liberação máxima desse neurotransmissor.

### **3.9.5 Curva de concentração de L-glutamato**

Foram construídas curvas-padrão utilizando-se diferentes concentrações de L-Glu (Sigma): 750, 1500, 2250 e 3000 pmol. Uma mistura contendo solução de KRH,  $\text{NADP}^+$  (1 mM) e enzima GDH (4,5 U/poço) foi adicionada a placa e estabilizada por 1 min no fluorímetro. As diferentes concentrações de ácido glutâmico (Sigma) foram acrescentadas em triplicata, e a leitura registrada durante 10 min.

## **3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os experimentos foram realizados em dias independentes, em triplicatas. Os resultados foram obtidos por análise de variância utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Os resultados de determinação da liberação do conteúdo de L-glutamato foram analisados por ANOVA One-Way e ANOVA Two-way, análise por simples e dupla variância, seguida de pós-testes de Tukey e Bonferroni, respectivamente. Consideraram-se como diferenças estatísticas entre os grupos valores de  $p < 0,05$ .

### 3.11. DROGAS ANTAGONISTAS E AGONISTAS FARMACOLÓGICOS

Foram utilizados diferentes antagonistas e um agonista farmacológico, na tentativa de investigar-se a(s) via(s) de ação(ões) da PB e uma das suas frações isoladas, a F22.

Para os ensaios de citotoxicidade basal foram utilizadas as seguintes drogas:

- Agonistas e antagonistas colinérgicos (AChR): Carbacol (Sigma), 10  $\mu$ M (agonista colinérgico); Atropina (Sigma) 2  $\mu$ M (antagonista colinérgico muscarínico); D-tubocurarina (Sigma), 146  $\mu$ M (antagonista colinérgico nicotínico); Piridostigmina (Sigma), 10  $\mu$ M (Inibidor da enzima acetilcolinesterase – AChE).
- Bloqueador do canal para sódio dependente de voltagem: Tetrodotoxina (Tocris), 200 nM;
- Antagonistas glutamatérgicos dos receptores ionotrópicos: CNQX (Sigma), 10  $\mu$ M (antagonista dos receptores AMPA/Kainato); MK801 (Sigma), 10  $\mu$ M (antagonista do receptor NMDA).
- Agente despolarizante: Cloreto de potássio (Sigma) (KCl), 3 M.

Para os ensaios de liberação de L-Glu em sinaptosomas cérebro-corticais, as drogas utilizadas foram:

- Bloqueadores de canais para Cálcio dependentes de voltagem: Nifedipina (Sigma), 5  $\mu$ M (bloqueador de canais do tipo L);  $\omega$ -conotoxina-GVIA (Sigma), 10  $\mu$ M (bloqueador de canais do tipo N);  $\omega$ -agatoxina-IVA (Latoxan), 30 nM (bloqueador dos canais do tipo P).
- Quelantes de cálcio: EGTA (Sigma), 10  $\mu$ M (quelante de cálcio extracelular); BAPTA-AM (Sigma), 10 mM. (quelante de cálcio intracelular).
- Antagonistas glutamatérgicos dos receptores ionotrópicos: CNQX (Sigma), 10  $\mu$ M (antagonista dos receptores AMPA/Kainato); MK801 (Sigma), 10  $\mu$ M (antagonista do receptor NMDA).
- Agente despolarizante: Cloreto de potássio (Sigma) (KCl), 33 mM.

## 4. RESULTADOS

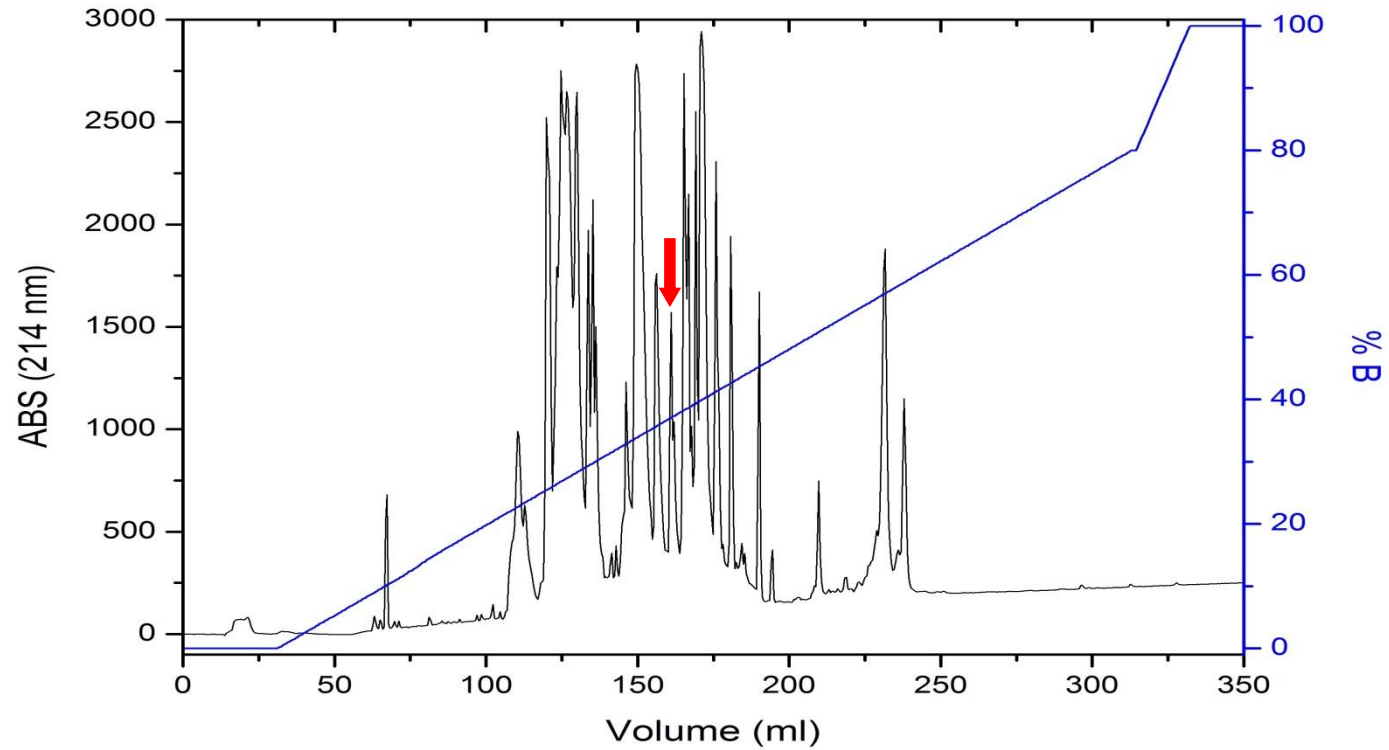
### 4.1. FRACIONAMENTO DA PEÇONHA BRUTA DA SERPENTE *Micrurus l. lemniscatus* E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ALGUMAS DE SUAS TOXINAS.

#### 4.1.1 Cromatografia de fase reversa- Estratégia 1.

Cerca de 10 mg da peçonha bruta da serpente *Micrurus l. lemniscatus* foram diluídos em solução aquosa de TFA 0,1% v/v (eluente A) e esta foi aplicada à cromatografia de fase reversa (coluna semi-preparativa Discovery Supelco C18, 25 cm) previamente equilibrada com o eluente A (figura 23). Os componentes peptídicos e proteicos presentes na peçonha foram eluídos em gradiente linear (0-80%) de uma solução de acetonitrila e TFA 0,1% v/v (eluente B). O perfil foi monitorado por leituras de absorvâncias a 214 e 280 nm.

Observa-se no perfil apresentado na figura 23 que a peçonha foi resolvida em 42 frações (denominadas de F1 a F42), que foram eluídas entre 17 % (F1) a 53% de ACN (F42). Todas as frações foram submetidas à análise por espectrometria de massas MALDI TOF.

Dentre as frações obtidas, pôde-se destacar a Fração 22 (F22) que continha exclusivamente polipeptídeos de baixa massa molecular (7-8 kDa) que foi o principal objeto de estudo desse trabalho.



**Figura 23:** Cromatografia de fase reversa da peçonha bruta da serpente *Micrurus l. lemniscatus*. A peçonha bruta (10 mg) foi ressuspensa em solução aquosa de TFA 0,1% v/v (eluyente A) e aplicada em coluna semi-preparativa Discovery Supelco C18, 25 cm, previamente equilibrada com o eluyente A. Fluxo de 4ml/min e frações de 1 ml. A eluição foi obtida através de gradiente linear (0-80%) de eluyente B (ACN/TFA 0,1%). A eluição foi monitorada por leituras a 214 e 280 nm. Em destaque, a seta vermelha aponta a fração 22.

#### **4.1.2. Espectrometria de massas das frações obtidas na cromatografia de fase reversa**

As 42 frações obtidas na cromatografia de fase reversa foram analisadas por espectrometria de massas MALDI-TOF. A tabela 5 apresenta todos os volumes, porcentagem de acetonitrila na qual as frações são eluídas, concentração protéica, rendimento e massas moleculares de cada fração. Em complemento, a figura 24 mostra o perfil de distribuição de massas moleculares das proteínas e peptídeos presentes nas frações em relação ao percentual de acetonitrila em que são eluídas. Pode-se observar que as maiores concentrações de toxinas estão em duas faixas: de 25 a 30 % e de 35 a 40% de solvente orgânico. As maiores frequências das moléculas, incluem as faixas entre 6 a 8 kD e 13-14 kDa. A figura 25 apresenta a frequência das faixas de massas moleculares, nela evidencia-se que as massas moleculares obtidas variaram de 1 a 16 kDa, sendo as de maior frequência na faixa de 6 a 7 kDa com 46,6 %, seguidas das de 7-8 kDa, com 28 %, ambas correspondendo à classe das toxinas conhecidas como três-dígitos. As PLA<sub>2</sub> foram a segunda classe protéica com maior frequência, sendo as com faixa de massas entre 13-14 kDa predominantes, com 6,7%.

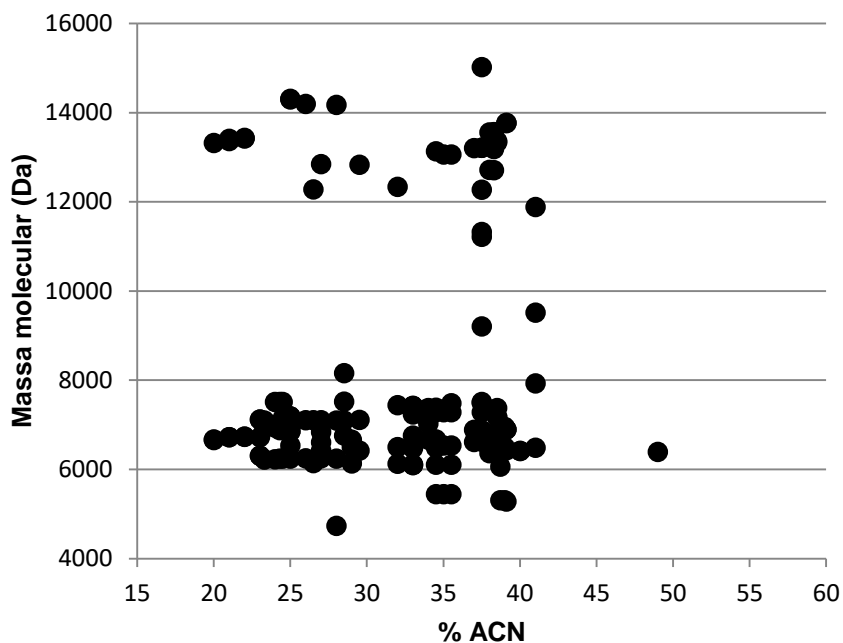
**Tabela 5: Porcentagem de eluição, concentração proteica, rendimento e massas moleculares das frações provenientes da cromatografia em fase reversa da peçonha da serpente *Micrurus l. lemniscatus*.**

Fração	Vol. coletado (mL)	% ACN	Concentração protéica (µg/ml)	Rendimento %	Massas moleculares (Da)
1	1,5	8,2	120	1,2	Não determinada.
2	1	16,2	116	1,2	Não determinada.
3	1	17,6	105	1,1	Não determinada.
4	1,5	19,1	46,5	0,5	6.655,4/ 6.667,8
5	2,5	19,7	484	4,8	6.727,3/ 13.430,2
6	2,3	20,2	210,8	2,1	6.728,8/ 13.439,9/ 6.741,0/ 13.424,5
7	2,3	22,1	447,5	4,5	7.120,2/ 6.305,4/ 6.724,9/ 7.118,3
8	1,5	22,9	151,5	1,5	6.225,6/ 6.930,3/ 7.110,5
9	1	23,2	331	3,3	6.229,4/ 6.942,9/ 7.520,9
10	1	23,4	335	3,4	6.245,9/ 6.884,3/ 7.461,6/7.518,9
11	1,5	23,8	472,5	4,7	6.246,4/ 7.153,3/ 7.515,4/ 6.850,6/ 7.192,6
12	2,3	24,6	437,3	4,4	6.250,9/ 6.857,6/ 7.191,9/7.276,8
13	0,8	25,5	105,8	1,1	6.247,9/ 7.105,2
14	0,8	25,9	85,5	0,9	6.142,6/ 6.242,2/ 6.840,5/ 7.109,1
15	0,8	26,2	102	1	6.148,1/ 6.249,5/ 6.435,9/ 6.608,3/ 6.839,9/ 7.103,8
16	0,8	27,5	9	0,1	6.242,8/ 6.835,1/ 7.095,9
17	1,8	27,9	12,3	0,1	6.108,4/ 6.184,1/ 6.249,1/ 7.521,6/ 8.159,1
18	1,5	28,5	67,5	0,8	6.249,1/ 6.504,2/ 6.672,3
19	0,8	28,8	26,3	0,3	6.421,3 /6.503,1/ 7.112,2

20	0,8	29,1	17,3	0,2	6.127,9/ 6.421,3/ 6.507,1/ 7.443,4
21	4,5	29,6	1429,5	14,3	6.107,2/ 7.421,9/ 6.758,1/ 6.471,61/ 7.236,5/ 7.428,5
22	3	31,3	366	3,7	7.199,1/ 7.256,2/ 7.294,7
23	1,5	32,5	157,5	1,6	6.671,3/ 7.373,8
24	0,8	32,8	73,5	0,7	6.109,4/ 6.485,7/ 6.672,8/ 7.373,1/ 13.162,9
25	2	33,6	526	5,3	5.445,6/ 7.208,4
26	1,5	33,9	346,5	3,5	5.445,3/ 6.537,2/ 7.277,8/ 13.062,5
27	0,8	34,2	98,3	1	5.435,7/ 6.108,5/ 6.535,2/ 7.215,1/ 7.485,4/ 13.041,3
28	0,8	34,6	168,8	1,7	6.613,8/ 6.897,8/ 13.210,2
29	1,5	35,1	1175,3	11,8	6.634,1/ 6.881,3/ 7.519,6/ 11.320,1/ 13.212,5
30	0,8	36,3	83,3	0,8	6.364,8/ 6.792,3/ 12.719,7/ 13.558,1
31	0,5	36,5	128	1,9	6.366,5/ 6.769,7/ 12.713,2/ 13.215,8/ 13.562,8
32	1,3	37,5	152,5	1,5	4.456,7/6.675,5/ 7.381,3/ 13.345,1
33	0,5	38,4	10,5	0,1	5.311,5/ 6.066,3/ 6.504,3
34	0,8	38,7	75,8	0,8	4.597,1/5.280,3/ 6.427,4/6.895,8/ 13.772,1
35	1,5	39,9	196,5	2	5.280,9/ 6.427,2/ 6.895,8/ 13.772,6/ 6.899,9/ 13.765,8
36	0,8	41	63,8	0,6	6.413,7/ 6.414,6
37	1,5	44,9	46,5	0,5	6.490,7/ 7.913,5/ 9.528,7/ 11.897,7/15.829,1
38	0,8	47,2	0	0	Não determinada
39	1,5	49,8	0	0	Não determinada
40	2,3	50,5	251,1	2,5	6.396,6



41	1,3	51,6	36,3	0,4	Não determinada
42	1,3	52,1	43,8	0,4	Não determinada



**Figura 24:** Distribuição de massas moleculares em relação a porcentagem de ACN dos peptídeos e proteínas presentes na peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus* obtidos após o primeiro passo cromatográfico. As moléculas foram fracionadas por cromatografia líquida de fase reversa e as massas moleculares determinadas por espectrometria de massas MALDI TOF.

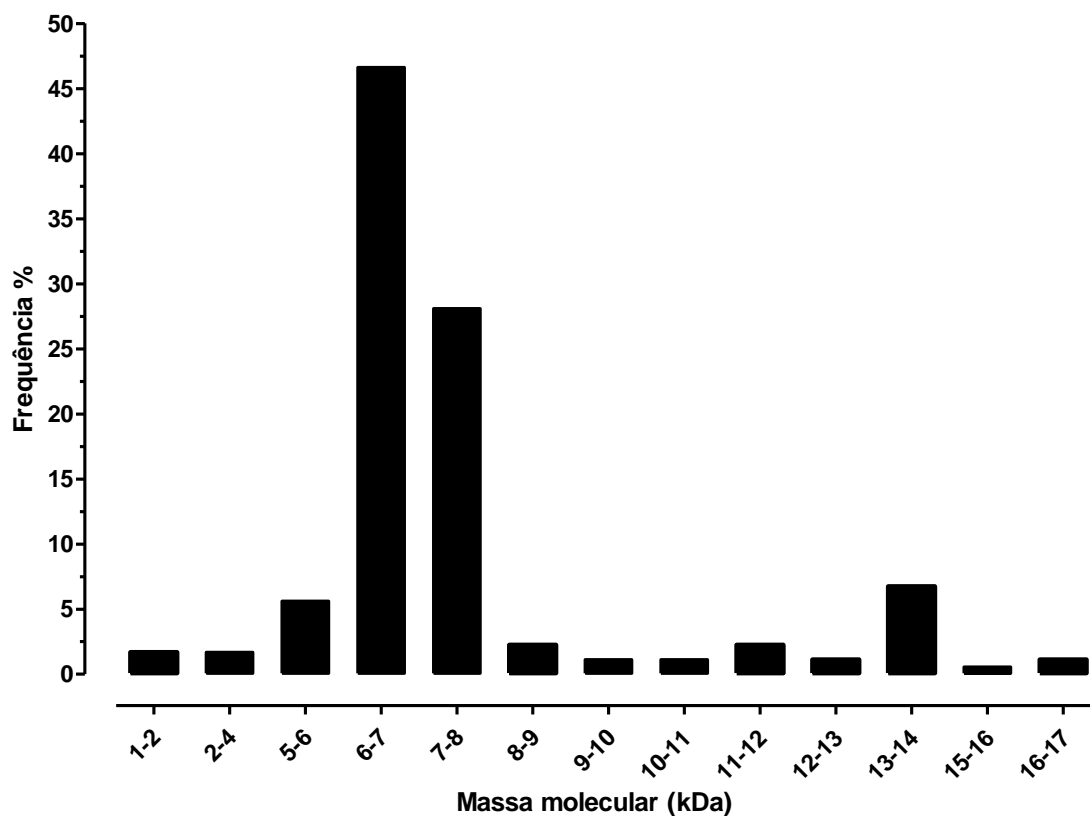
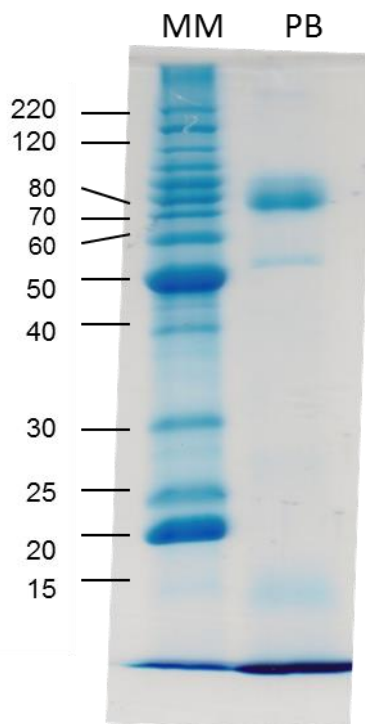


Figura 25: Frequência de massas moleculares, encontradas na peçonha da *Micrurus l. lemniscatus*, obtidas por cromatografia líquida de fase reversa.

A figura 26 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 20% (m/v) em condições desnaturantes na presença de SDS, da peçonha bruta. Nesta figura pode-se observar que a coluna PB apresenta uma banda principal espessa de aproximadamente 80 kDa, além dessa observa-se uma banda acima de cerca de 90 kDa, uma em torno de 50-60 kDa e uma abaixo de 15 kDa quando comparadas com a padrão de massas moleculares (coluna MM).



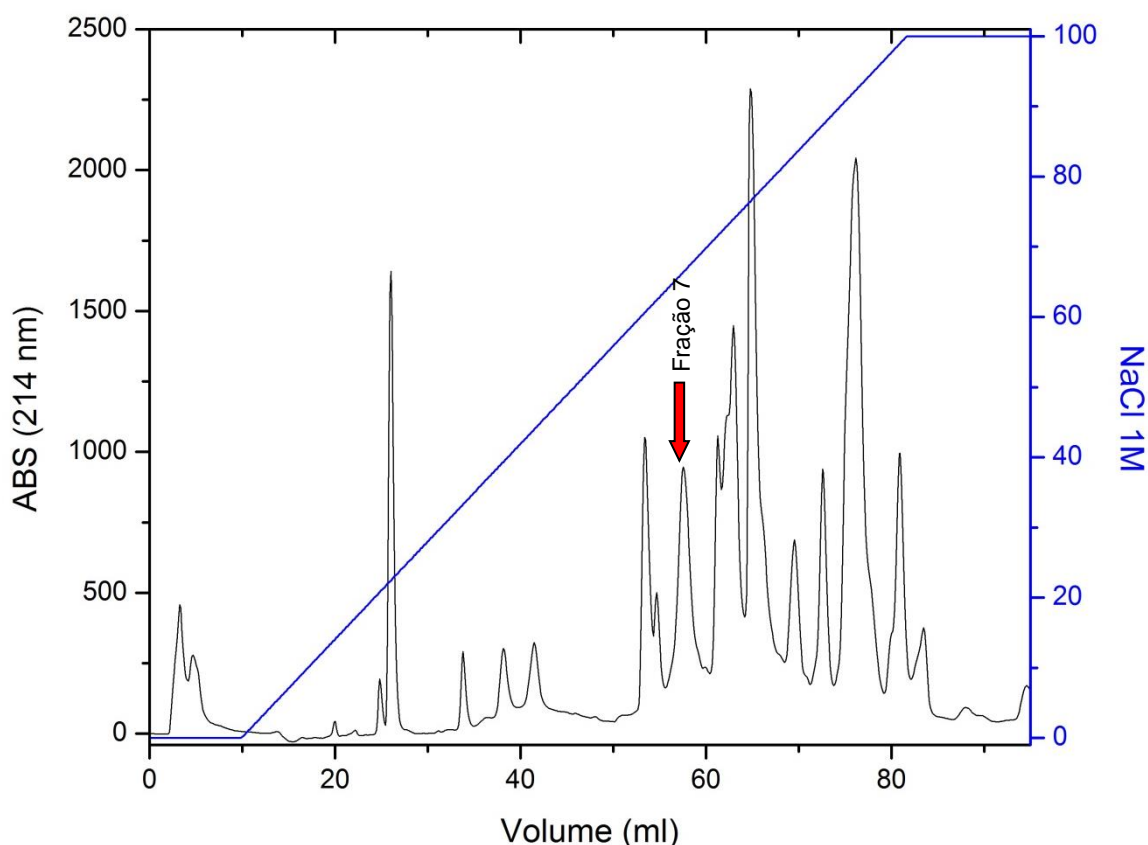
**Figura 26:** Eletroforese em gel de poliacrilamida da peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus*. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 20% (m/v) em condições desnaturantes na presença de SDS. **Coluna MM:** Padrão de massa molecular Bench Mark™ Protein Ladder. **Coluna PB:** Peçonha bruta. **Condições:** Corrente: 20 mA. Voltagem: 110 V; tempo de corrida: 90 minutos. Tampão de corrida: 25 mM Tris; 192 mM glicina; 10% m/v de SDS, pH=8,3. Solução corante: Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,2% m/v) em água: metanol: ácido acético (4:5:1 v/v); solução descorante: água: etanol: ácido acético (6:3:1 v/v). Aplicou-se 8 µL do padrão molecular e 25 µg de peçonha bruta.

#### 4.1.3. Cromatografias de troca catiônica e fase reversa

Em outra estratégia, a peçonha bruta da serpente *Micrurus l. lemniscatus* (2 mg) foi diluída em tampão acetato de sódio 20 mM, em pH=5,0 (eluente A) e aplicada em uma coluna de troca catiônica (CIEX TSK-Gel CM-SW, 15 cm x 4,6 mm, Tosoh Biosep), previamente equilibrada com o eluente A. A eluição dos componentes presentes na peçonha foi obtida com um gradiente linear (0-1 M) de uma solução de NaCl 1 M, acetato de sódio 20 mM, pH=5,0 (eluente B), monitorada por leituras de absorvância a 214 e 280 nm.

Observa-se pela análise da figura 27 que o perfil cromatográfico apresentou 17 frações distribuídas por todo gradiente salino, revelando que a maior parte das toxinas são eluídas entre 0,4 e 0,8 M de NaCl. Essa estratégia mostrou-se adequada para o isolamento de uma fração que contém uma toxina três-dígitos de 7-8 kDa, com atividade neurotóxica (fração 7), eluída com 0,6 M de NaCl.

A fração 7 (destacada pela seta) foi aplicada em coluna analítica de fase reversa (Source™ 5 4,6/150), previamente equilibrada com solução aquosa de TFA 0,1% v/v (eluyente A), e eluída com um gradiente linear (0-100%) de eluyente B (ACN/ TFA 0,1%). A eluição foi monitorada por leituras a 214 e 280 nm. Observa-se na figura 28 a presença de uma fração eluída com 28,9% de eluyente B. Dessa fração foram isoladas duas toxinas uma com massa molecular de 7.256 Da e outra 7.294 Da, denominadas de MI7.256\_NTX e MI7.294\_NTX, respectivamente, sendo que a última foi sequenciada por Edman e ambas utilizadas nos ensaios de liberação de L- Glu. Tal estratégia revelou-se eficaz no fracionamento de algumas toxinas 3-Ftx, entre elas a toxina de interesse apresentada com alto grau de pureza por análises de espectrometria de massas (dado não mostrado).



**Figura 27:** Cromatografia de troca catiônica da peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus*. A peçonha bruta (2 mg) foi ressuspendida em tampão acetato de sódio 20 mM, em pH=5,0 (eluyente A) e aplicada em coluna TSK-Gel CM-SW, 15 cm x 4,6 mm (Tosoh Biosep), previamente equilibrada com o eluyente A. A eluição foi obtida com um gradiente linear (0-1 M) de uma solução de NaCl 1 M em acetato de sódio 20 mM, ajustada a pH = 5,0 (eluyente B), monitorada por leituras a 214 e 280 nm. O fluxo foi de 0,75 ml/min e o volume coletado foi de 1 ml/poço. Em destaque (seta vermelha) a fração 7, que contém a toxina MI7294\_NTX.

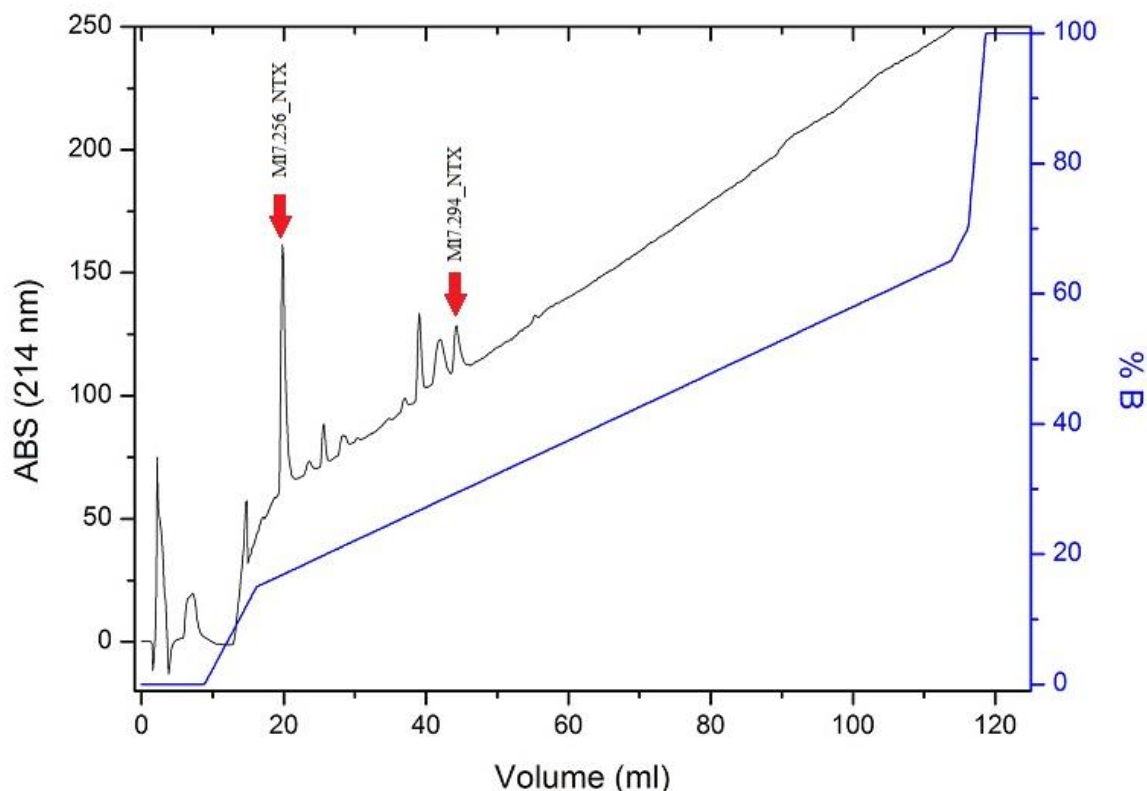


Figura 28: Cromatografia de fase reversa da Fração 7 proveniente da cromatografia de troca catiônica. A fração foi ressuspensa em solução aquosa de TFA 0,1% v/v (eluyente A) e aplicada em coluna Source™ 5 4,6/150, previamente equilibrada com o eluyente A. O fluxo foi de 1ml/min e o volume coletado das frações foi de 0,5 ml. A eluição foi obtida através do programa: 0-20% B em 18 min., 20-65% B em 92 min.; 65-70% em 3 min., 70-100% B em 7 min. e 100% B em 10 min. A eluição foi monitorada por leituras a 214 e 280 nm.

#### 4.1.4. Determinação da estrutura primária e busca por similaridade em banco de dados, das toxinas purificadas da peçonha bruta

As estratégias de purificação da peçonha da serpente *Micrurus l. lemniscatus* utilizadas nesse trabalho permitiram isolar 5 toxinas, cujas sequências primárias parciais foram determinadas. As sequências parciais destas toxinas passaram por análise de similaridades com outras toxinas depositadas no banco de dados Swissprot. O alinhamento foi realizado pelo programa BLASTP 2.2.29+, utilizando-se a ferramenta DELTA-BLAST (<[www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)>). Como resultado, estas moléculas foram classificadas como toxinas de 3-Ftx. A tabela 6 apresenta as sequências primárias determinadas. A toxina MI7294\_NTXX, destacada em vermelho na tabela, foi utilizada para os ensaios de liberação de L-Glu.

**Tabela 6: Sequências primárias parciais obtidas pelo método de Degradação de Edman, e números de aminoácidos de cinco toxinas isoladas da peçonha bruta da serpente *Micrurus l. lemniscatus*.**

<b>Toxina</b>	<b>Sequência primária</b>	<b>Nº de aa</b>
MI6435	LKCYVSFNKEVTCPEGMNFCEIDVVPTTHG	30
MI6504	IKCYVSLRDKEDTCPEGINFCEKYDVPATHGNVITVQXXAY	41
MI6681	MICYNQQSSQPPTTKTCSEGQ	21
<b>MI7294_NTX</b>	<b>LICYVSMCGAKMTCPEGNNLCEYYAVPVF</b>	<b>30</b>
MI7527	LICYRDTPFTVRTTVSCGNGITKCYRKYWYENRGNRTEGGCGCPNNEKYVT	51

aa= aminoácidos, MI= *Micrurus lemniscatus*

A tabela 7 representa os resultados da busca por homologias em banco de dados (Uniprot, Swissprot), das toxinas obtidas no presente trabalho (MI6435, MI6504, MI6681, MI7294\_NTX e MI7527), com toxinas de peçonhas de outras serpentes. Nota-se grande similaridade, algumas chegando a 100%, entre as sequências parciais obtidas e várias daquelas de origem elapídica, depositadas no banco de dados. A tabela 8 apresenta o alinhamento das sequências, evidenciando as regiões de igual identidade com a toxina MI7294\_NTX.

Tabela 7: Alinhamento das sequências parciais das cinco toxinas (6-8 kDa) isoladas de *Micrurus l. lemniscatus*. As sequências dos N-terminais das toxinas foram obtidas pelo método de Degradação de Edman. O alinhamento foi realizado pelo programa BLASTP 2.2.29+, utilizando-se a ferramenta DELTA-BLAST, em banco de dados de proteínas Swissprot (<www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Todas as sequências apresentaram similaridade com sequências de toxinas elapídicas do tipo de três-dígitos depositadas. Em destaque a toxina de interesse do trabalho.

Toxina Ml6435								
Descrição	Organismo	aa	Ident.(%)	Simil.(%)	Sobrepos.	E value	Classific.	ID (database)
Short neurotoxin MS11	<i>M. surinamensis</i>	58	62	70	36,3	0,007	Elapidae	P86094.1
Mipartoxin-1	<i>M. mipartitus</i>	60	58	70	34,1	0,037	Elapidae	B3EWF8.1
Cytotoxin 3 ou Toxin CM-8/CM-8A	<i>Naja annulifera</i>	60	61	66	31,6	0,28	Elapidae	P01459.1
Precursor de three finger toxin MALT0063C ou MALT0063C	<i>M. altirostris</i>	82	52	70	31,2	0,42	Elapidae	F5CPE2.1
Cytotoxin 2 ou Toxin 12A	<i>Hemachatus haemachatus</i>	61	52	66	29,9	1,1	Elapidae	P24776.1
Toxina Ml6504								
Descrição	Organismo	aa	Ident.(%)	Simil.(%)	Sobrepos.	E value	Classific.	ID (database)
Mipartoxin-1	<i>M. mipartitus</i>	60	57	73	37	5e-04	Elapidae	B3EWF8.1
Precursor de three finger toxin MALT0063C	<i>M. altirostris</i>	82	53	73	35,8	0,001	Elapidae	F5CPE2.1
Precursor de three-finger toxin 3FTx-1	<i>M. corallinus</i>	84	52	70	30,4	0,12	Elapidae	C6JUP1.1
Nicotinic acetylcholine receptor-binding protein Mnn-4	<i>M. nigroconctus</i>	25	58	63	28,9	0,28	Elapidae	Q9PRQ4.2
Short neurotoxin MS11	<i>M. surinamensis</i>	58	41	82	28,5	0,49	Elapidae	P86094.1
Toxina Ml6681								
Descrição	Organismo	aa	Ident.(%)	Simil.(%)	Sobrepos.	E value	Classific.	ID (database)
Precursor Muscarinic toxin 38; Short=MTX38	<i>Ophiophagus hannah</i>	86	67	100	30,8	0,25	Elapidae	Q2VBN0.1
Precursor Erabutoxin a; Short neurotoxin 1a	<i>Laticauda semifasciata</i>	83	71	100	27,4	3,1	Elapidae	P60775.1
Precursor Erabutoxin c; Short neurotoxin 1c	<i>Laticauda semifasciata</i>	83	71	100	27,4	3,1	Elapidae	Q7T215.1
Precursor Erabutoxin b; Short neurotoxin 1b	<i>Laticauda semifasciata</i>	83	71	100	27,4	3,1	Elapidae	Q90VW1.1
Precursor Three finger toxin	<i>Micrurus</i>	81	95	100	26,5	6,0	Elapidae	F5CPD8.1



MALT0057C	<i>altirostris</i>							
<b>Toxina MI7294_NTX</b>								
<b>Descrição</b>	<b>Organismo</b>	<b>aa</b>	<b>Ident.(%)</b>	<b>Simil.(%)</b>	<b>Soprepos.</b>	<b>E value</b>	<b>Classific.</b>	<b>ID (database)</b>
Precursor Three finger toxin MALT0063C	<i>M. altirostris</i>	82	79	93	51.1	6e-11	Elapidae	F5CPE2.1
Precursor Three-finger toxin 3FTx-1	<i>M. corallinus</i>	84	56	96	32,5	1e-04	Elapidae	C6JUP1.1
Mipartoxin-1	<i>M. mipartitus</i>	60	63	90	28,2	0,004	Elapidae	B3EWF8.1
Venom protein E2	<i>M. pyrrhocryptus</i>	43	59	90	25,7	0,026	Elapidae	POCAR7.1
Nicotinic acetylcholine receptorbinding protein Mnn4	<i>M. nigrocinctus</i>	25	69	53	24,8	0,030	Elapidae	Q9PRQ4.2
<b>Toxina MI7527</b>								
<b>Descrição</b>	<b>Organismo</b>	<b>aa</b>	<b>Ident.(%)</b>	<b>Simil.(%)</b>	<b>Soprepos.</b>	<b>E value</b>	<b>Classific.</b>	<b>ID (database)</b>
Precursor Erabutoxin c; Short neurotoxina 1c	<i>Laticauda semifasciata</i>	83	36	98	66,6	8e-13	Elapidae	Q7T2I5.1
Precursor Erabutoxin a; Short neurotoxina 1a	<i>Laticauda semifasciata</i>	83	36	98	66,6	9e-13	Elapidae	P60775.1
Precursor Erabutoxin b; Short neurotoxina 1b	<i>Laticauda semifasciata</i>	83	36	98	66,2	1e-12	Elapidae	Q90VW1.1
Precursor Short neurotoxin OKI-17/NCA-06	<i>Laticauda laticaudata</i>	83	34	98	66,2	1e-12	Elapidae	Q9YGC2.1
Precursor Short neurotoxina C	<i>Laticauda colubrina</i>	83	40	98	65,5	2e-12	Elapidae	P10455.2

**Tabela 8:** Alinhamento da sequência primária parcial da toxina MI7294\_NTX com toxinas de serpentes elapídicas que apresentaram maior similaridade nas sequências. O alinhamento foi realizado pelo programa BLASTP 2.2.29+, utilizando-se a ferramenta DELTA-BLAST, em banco de dados de proteínas Swissprot (<www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>). As duas primeiras (F5CPE2.1 e C6JUP1) são precursores de toxinas três-dígitos isoladas de *M. altirostris* e *M. corallinus*, respectivamente. A terceira (B3EWF8.1) corresponde a mipartoxina-1, de *M. mipartitus*. A quarta (POCAR7.1) foi isolada de *M. pyrrhocryptus*. E a última (Q9PRQ4.2), uma toxina de *M. nigrocinctus*, que se liga a receptores nicotínicos.

ID	Alinhamento
MI7294_NTX	LICYVSMCGAKMTCPEGNNLCEYYAVPVF
F5CPE2.1	MRTLLLLTLVVVTIVCLDLGNSLICVSEYGAKMTCPEGKTLCEKYAVPLMQ-GHFFYFAWRCTSTCKAGAYNICCSTDLCNKIP---82
C6JUP1.1	MKTLTLLTLVVVTIVCLDLGNSLICV-NMTMQKVTCEPGKDKCEKYAVPVMR-GKFFYSYQCTSKCHEGAYDVCCSTDLCNKSSStsg 84
B3EWF8.1	-----LKCYSVREGKTQTCPEGEKLCCEKYAVSYFHdGRWRVRYECSACHRGPYNVCCSTDLCNK----- 60
POCAR7.1	LICYVSRDGKTATCPP-QGKCEKYAVSASHTXHXFYVYGCTSX 43
Q9PRQ4.2	LKCYSSRT-ETMTCPEGKDKCEKYAV----- 25

## 4.2. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DA REDUÇÃO DO MTT PROMOVIDA PELA PEÇONHA BRUTA E DE SUAS FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS

### 4.2.1. Avaliação da citotoxicidade promovida pela peçonha bruta em células de linhagem neuronal Neuro-2A.

O potencial citotóxico da peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus* em células de linhagem neuronal Neuro-2A foi avaliado por meio dos ensaios de redução do sal de tetrazólio (MTT). As células em cultura, numa densidade de  $5 \times 10^3$  células/poço, foram incubadas por 24 h com diferentes concentrações da peçonha bruta. Utilizou-se como controle positivo de morte celular, o agente despolarizante KCl 3M.

A figura 29 mostra que a peçonha bruta, nas concentrações de  $5 \times 10^{-5}$  a  $10^3$  µg/ml, reduziu a viabilidade celular de modo concentração-dependente.

Nas concentrações de  $5 \times 10^{-5}$  µg/ml a porcentagem de morte foi em torno de 20%. Já nas concentrações entre  $5 \times 10^{-4}$  e  $25 \times 10^{-1}$  µg/ml a porcentagem de morte ocorreu entre 30 e 40%. A concentração inibitória próxima a  $IC_{50}$  foi atingida em torno das concentrações de 25 e  $50 \times 10^{-1}$  µg/ml, sendo esta última concentração a responsável por 58% de morte celular e, portanto, a concentração de escolha para os testes posteriores, com os bloqueadores farmacológicos. Nas concentrações entre  $0,025 \times 10^{-3}$  a  $0,25 \times 10^3$  as células ficaram inviáveis em cerca de 85%, enquanto que nas maiores concentrações de  $0,5 \times 10^3$  a  $10^3$  µg/ml ocorreu cerca de 100% de morte celular. Cada experimento foi realizado em triplicata e teve sua média comparada à média dos não tratados (NT), que foi considerado como 100% de viabilidade celular. Os ensaios foram estatisticamente significativos quando comparados aos NT.

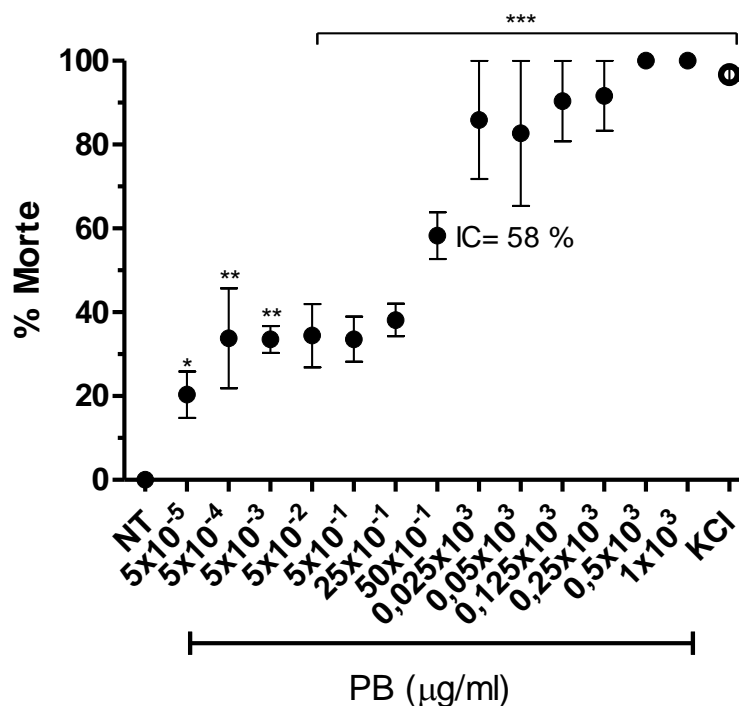


Figura 29: Efeito concentração-dependente da peçonha de *Micrurus l. lemniscatus*, na viabilidade celular, em linhagem neuronal NEURO-2A. As células em cultura ( $5 \times 10^3$  células/poço) foram incubadas com diferentes concentrações da peçonha bruta (PB), conforme indicado, pelo período de 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Como controle positivo de morte celular foi utilizado KCl (3M); NT representa as células não tratadas com a peçonha bruta, sendo considerado 100% de viabilidade celular (ou 0% de morte). Os valores representam a média  $\pm$  SEM (n=4, em triplicata). A análise estatística foi feita utilizando-se ANOVA One-way, com pós-teste de Turkey, sendo \*p<0,05; \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001.

#### 4.2.1.1. Varredura das frações isoladas da peçonha bruta com potencial citotóxico, em células de linhagem neuronal Neuro-2A

As frações semi-purificadas da peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus* obtidas por cromatografia de fase reversa foram utilizadas para avaliação do potencial citotóxico pelo método colorimétrico de MTT, em células de linhagem neuronal Neuro-2. As células foram pré-incubadas com as frações na concentração de  $50 \times 10^{-1}$  µg/ml (figura 30 A-D) e a viabilidade celular foi analisada. O KCl (3 M) foi utilizado como controle positivo.

Os resultados apontaram citotoxicidade significativa induzida por 33 das 36 frações avaliadas. Apenas as frações 29, 32 e 40 não apresentaram toxicidade de modo significativo, ademais, as frações reduziram a viabilidade celular em proporções distintas. As frações que induziram toxicidade entre 70-90%, em células Neuro-2A, foram: F10, F11, F12, F13, F15, F18 e F19 (Figuras 30-A e B), todas correspondendo a

uma porcentagem de eluição de solvente orgânico de 23 a 29%. Das frações avaliadas, 18 apresentaram toxicidade moderada, entre 40-70%, correspondendo às eluições em três faixas de hidrofobicidade: i) com baixa concentração do solvente orgânico (entre 8 e 20%), correspondendo a cinco frações (F1; F2; F3; F4; F5) (Figuras 30-A), ii) com média concentração do solvente (entre 29-33%), sendo as frações F21; F22; F23; F24 (Figuras 30-C e D), e majoritariamente, iii) as frações com maior caráter hidrofóbico, eluídas entre 34 e 52 % de acetonitrila, sendo elas: F27; F28; F31; F34; F37; F41; F42 (Figuras 30-D). A figura 31A mostra a região onde as frações derivadas da peçonha bruta, são predominantemente citotóxicas (frações 9 a 21-destacadas em vermelho). Em cinza a fração 22, que apresentou 43 % de toxicidade, sendo esta o principal objeto de estudo desse trabalho. Na figura 31B pode-se observar os espectros de massas por MALDI-TOF MS correspondentes às frações de maior potencial citotóxico.

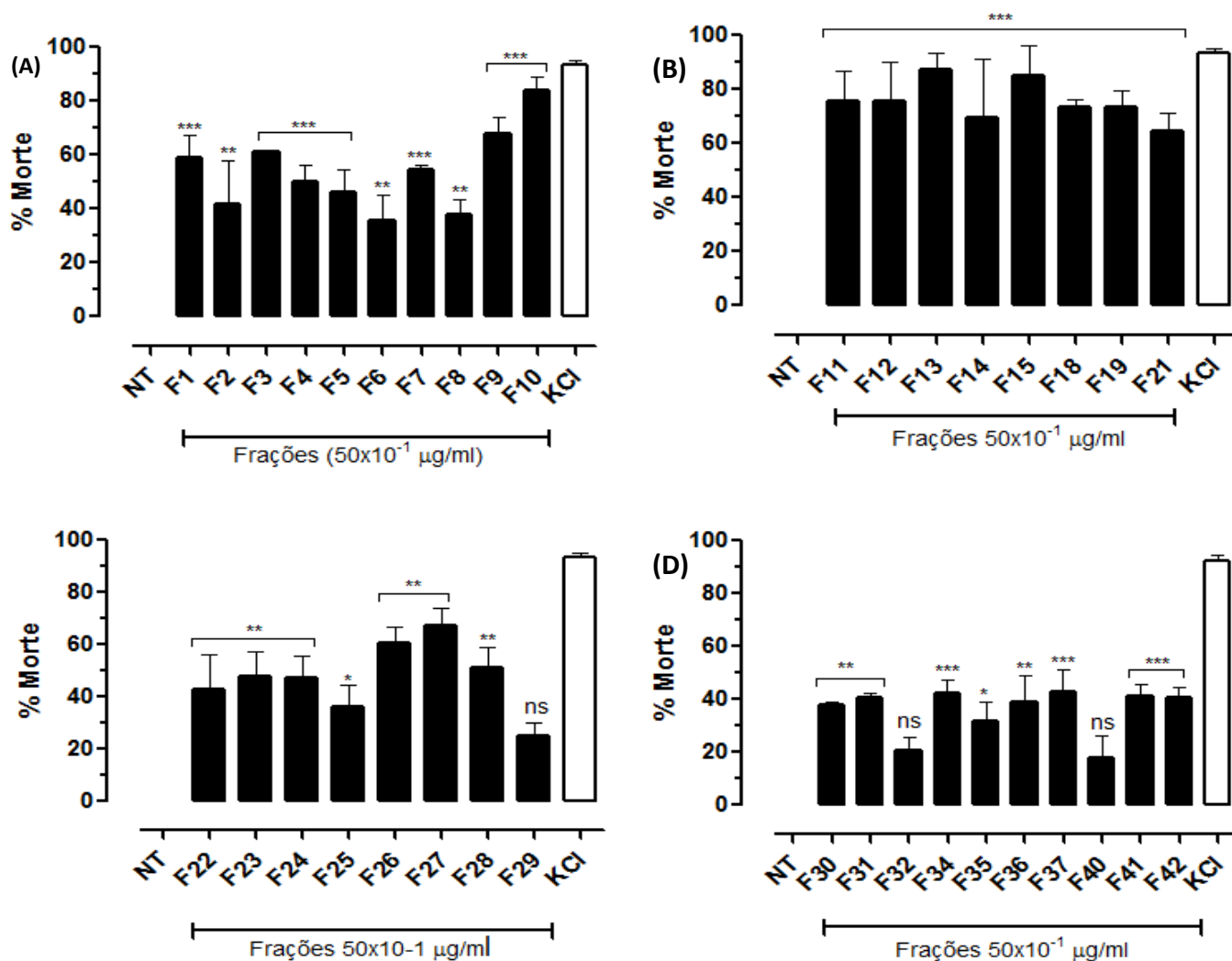


Figura 30: Efeito citotóxico de frações semipurificadas da peçonha de *Micrurus l. lemniscatus* em células de linhagem neuronal Neuro-2A (neuroblastoma de camundongo). A) Frações 1 a 10. B)

Frações 11 a 21. C) Frações 22 a 29. D) Frações 30 a 42. As células foram pré-incubadas por 24 h com as diferentes frações (5 µg/ml), da F1 a F42 e a viabilidade celular foi determinada pela redução do MTT. Como controle positivo foi utilizado KCl (3 M); NT representa as células não tratadas com a peçonha bruta, sendo considerado 100% de viabilidade celular. Os valores representam a média ± SEM (n=3, em duplicata). A análise estatística foi feita utilizando-se ANOVA One-way, com pós-teste de Turkey. Os valores representam a média ± SEM, sendo \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; ns = não significativo.

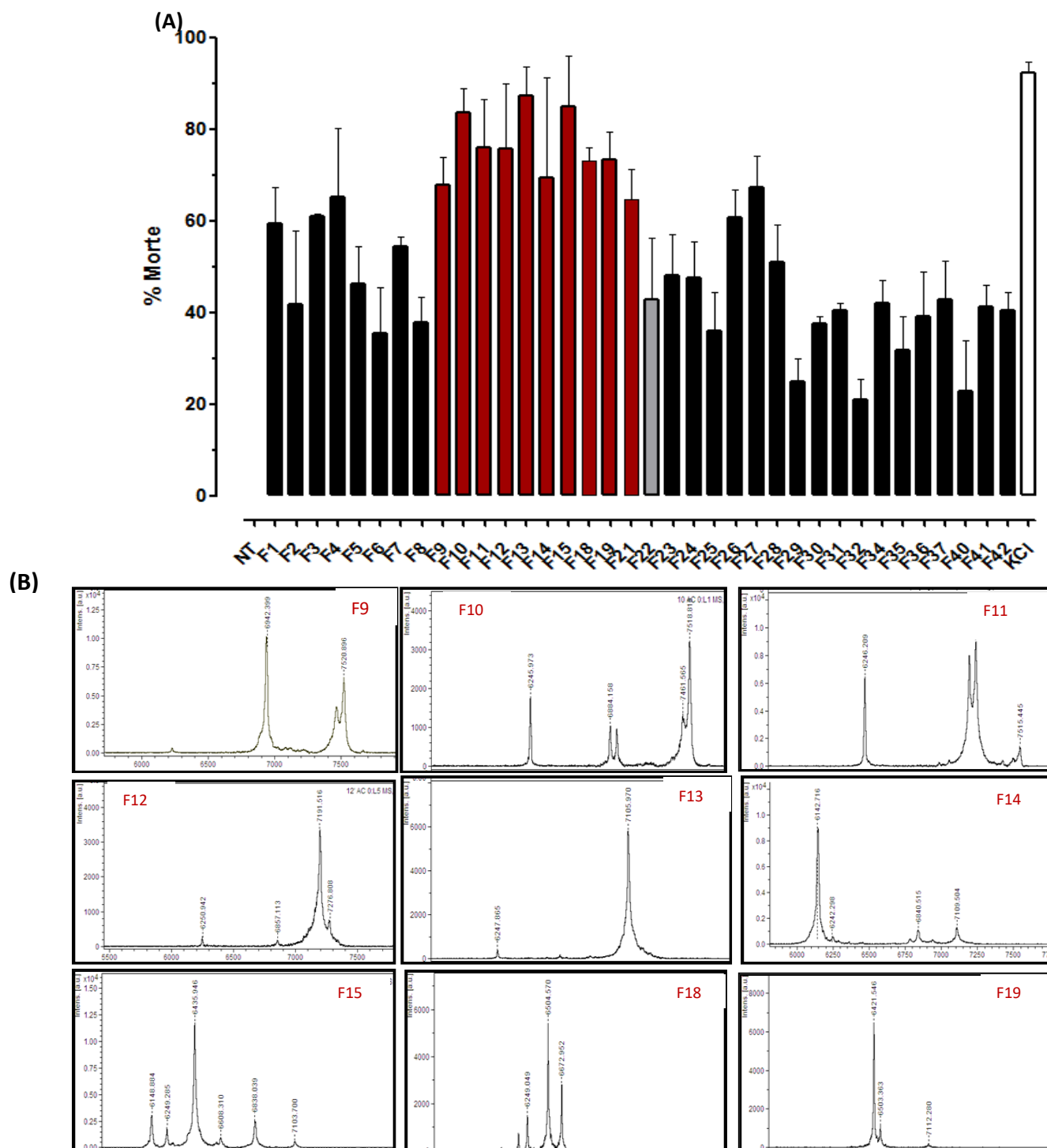


Figura 31: Perfil de toxicidade desencadeada por frações semipurificadas da peçonha de *Micrurus l. lemniscatus* em células de linhagem neuronal Neuro-2A. A) Perfil das 42 frações obtidas da peçonha bruta enfatizando a região da peçonha que apresenta maior toxicidade celular (F9-F21). Em cinza a

**fração 22. B) Espectros de massas por MALDI-TOF MS das frações com maior atividade citotóxica.**

#### **4.2.2. Avaliação da citotoxicidade promovida pela peçonha bruta em cultura de neurônios hipocâmpais de ratos neonatos**

Visando investigar se a peçonha bruta da serpente *Micrurus l. lemniscatus* promoveria citotoxicidade em cultura primária de neurônios do SNC, neurônios piramidais do hipocampo foram utilizados como modelo. Os neurônios em cultura ( $2 \times 10^4$  células/poço) foram tratados com a peçonha bruta, em diferentes concentrações ( $5 \times 10^{-5}$  a  $50 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/ml}$ ) e avaliados pelo ensaio de viabilidade por MTT, após períodos de incubação distintos de 1, 3 e 24 h (figura 32).

Os resultados revelaram que a toxicidade celular promovida pela peçonha bruta nos neurônios piramidais é tempo e concentração dependentes. No tempo de 1 h de incubação, a PB mostrou-se tóxica apenas na concentração de  $50 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/ml}$ , reduzindo a viabilidade em 25 % (Figura 32A). Nos períodos de 3 e 24 h de incubação todas as concentrações foram tóxicas para os neurônios hipocâmpais (Figuras 32 B e C). Em 3 h, a viabilidade foi reduzida em 40 a 50 %, de modo similar ocorreu no tempo de 24 h. Nesse último tempo, a concentração de  $50 \times 10^{-1}$  reduziu a viabilidade em 48 %, mostrando-se próxima à  $IC_{50}$ , enquanto que, a concentração e  $0,05 \times 10^3$  (10 vezes maior) reduziu a viabilidade em 61 %. Cada experimento foi feito em triplicata ( $n=6$ ) e teve sua média comparada à média dos NT, que foi considerado como 100 % de viabilidade celular. KCl 3 M foi utilizado como controle positivo.

A Figura 33 compara a toxicidade entre os tempos de 1, 3 e 24 h de incubação, o resultado revelou que há diferença estatística entre os ensaios agudos de 1 e 3 h, havendo diferença estatística de toxicidade da PB nas concentrações de  $5 \times 10^{-5}$  a  $5 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/ml}$ . Entretanto, entre os tempos de 3 e 24 h de incubação não houve diferença estatística na redução da viabilidade nos períodos de incubação. O resultado mostrou que a PB no período de 1 h só é tóxica na maior concentração, e que após 3 h de exposição à PB a toxicidade ocorre já em concentrações menores nos neurônios hipocâmpais.

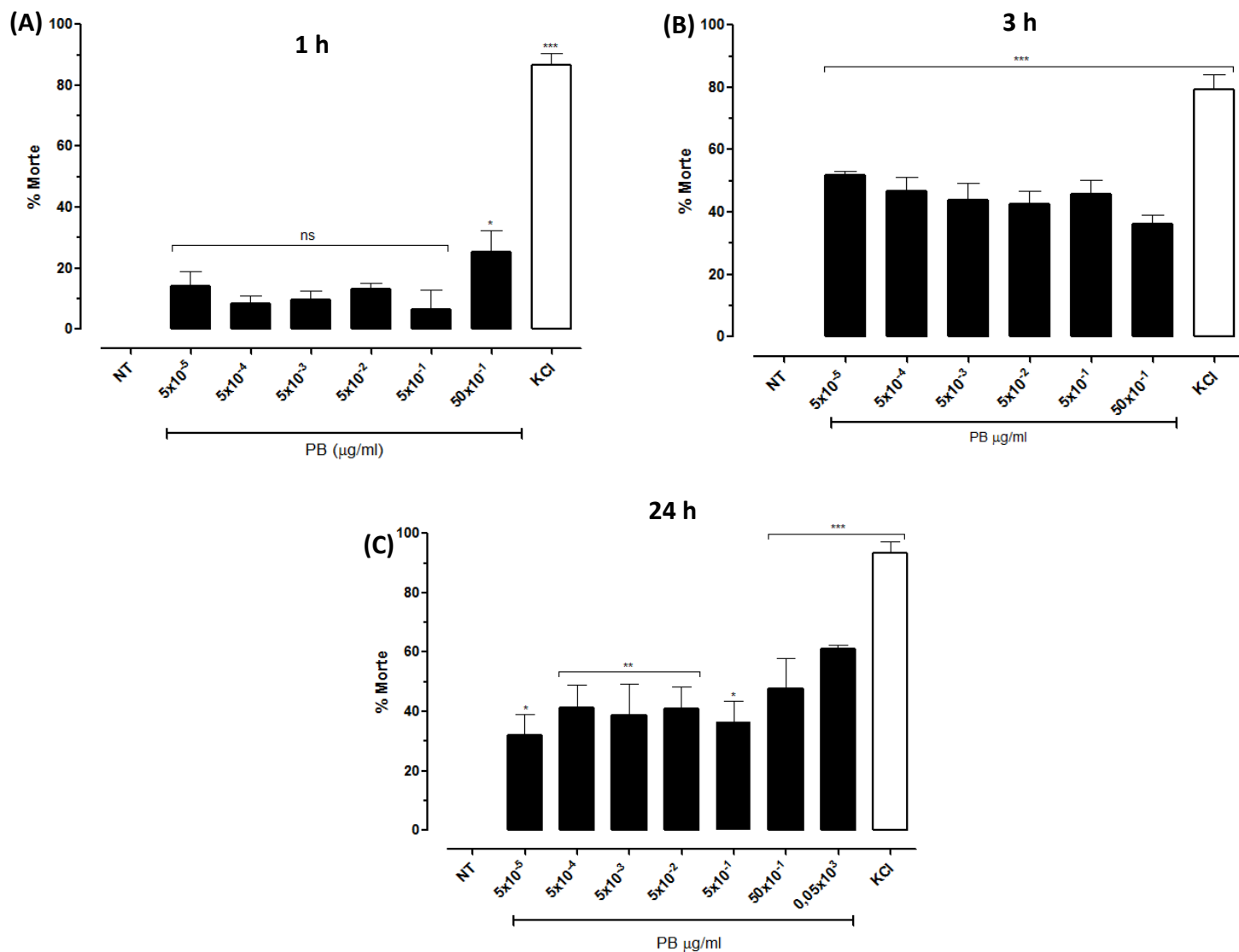
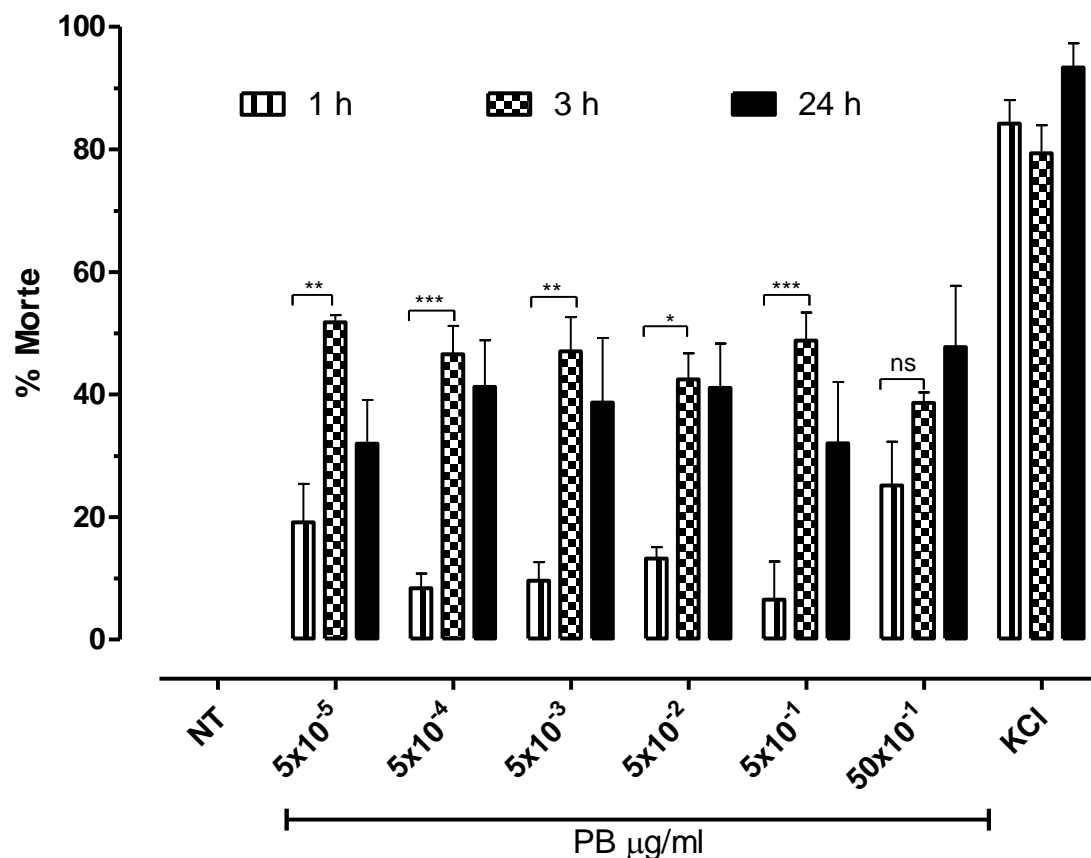


Figura 32: Citotoxicidade da peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus* em cultura de neurônios hipocâmpais de ratos neonatos. As células foram incubadas nos tempos de 1, 3 e 24 h, com PB em diferentes concentrações ( $5 \times 10^{-5}$  a  $50 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/ml}$ ). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os neurônios foram utilizados no 7º dia de cultura e expostos à PB ( $n=6$ , em triplicata). Cada experimento teve sua média comparada à média dos NT, que foi considerado como 100 % de viabilidade celular. KCl 3 M foi utilizado como controle positivo. Os ensaios foram estatisticamente significativos quando comparados aos NT e foi utilizado ANOVA One way, com pós-teste de Tukey. Sendo \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Os valores representam a média  $\pm$  SEM.



**Figura 33: Citotoxicidade tempo-dependente de neurônios hipocámpais em cultura, tratados com a peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus*.** As análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA Two-way, com pós-teste de Bonferroni para comparar todas as concentrações de PB com os tempos de exposição de 1, 3 e 24 h, sendo \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; ns= não significativo. Não houve diferença significativa entre os tempos de 3 e 24 h em todas as concentrações.

#### 4.2.3. Efeito de drogas que atuam no sistema colinérgico, sobre a citotoxicidade promovida pela peçonha bruta em cultura de neurônios hipocámpais de ratos neonatos

Para investigar quais os possíveis alvos farmacológicos que poderiam estar envolvidos na neurotoxicidade promovida pela peçonha bruta utilizou-se como estratégia o uso de vários agonistas e antagonistas farmacológicos. Inicialmente testaram-se drogas seletivas para receptores colinérgicos. As células foram pré-incubadas durante 30 minutos com os fármacos e em seguida adicionou-se PB ( $50 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ ), mantendo-se a incubação por 24 h, em estufa de cultivo celular a  $37^\circ\text{C}$ .

Com base na literatura, sabe-se que grande parte dos constituintes da peçonha de *Micrurus* sp. são as toxinas de 3-Ftx, com atividade sobre os receptores colinérgicos.



Portanto, para a investigação inicial da neurotoxicidade da peçonha, foram utilizadas drogas que atuam sobre o sistema colinérgico, tais como, um antagonista inespecífico dos receptores colinérgicos muscarínicos (atropina, 2  $\mu$ M), um antagonista inespecífico dos receptores colinérgicos nicotínicos (D-tubocurarina, 146  $\mu$ M) e um inibidor da enzima acetilcolinesterase (Piridostigmina, 10  $\mu$ M) (Figura 34).

O resultado mostrou que os antagonistas farmacológicos D-tubocurarina (curare) e piridostigmina na ausência da PB, quando comparados ao controle (NT), não alteraram a viabilidade celular, nas condições experimentais utilizadas (análises estatísticas evidenciadas pelos asteriscos). Entretanto, atropina, por si só, já reduziu a viabilidade celular de modo significativo, em 23%. E, quando atropina foi associada a PB houve um aumento de cerca de 30 % da toxicidade em relação a PB isoladamente. Na presença de curare, PB não causou toxicidade significativa quando comparada ao NT, portanto esse parece ter bloqueado o seu efeito.

Entretanto, quando os neurônios pré-incubados com os bloqueadores foram expostos à PB não houve uma redução da viabilidade celular quando comparados à PB sozinha (todos os dados NS representados pelos colchetes horizontais), mostrando que nenhuma das drogas utilizadas reverteu a citotoxicidade promovida pela peçonha bruta, nos neurônios hipocampais, expostos por 24 h.

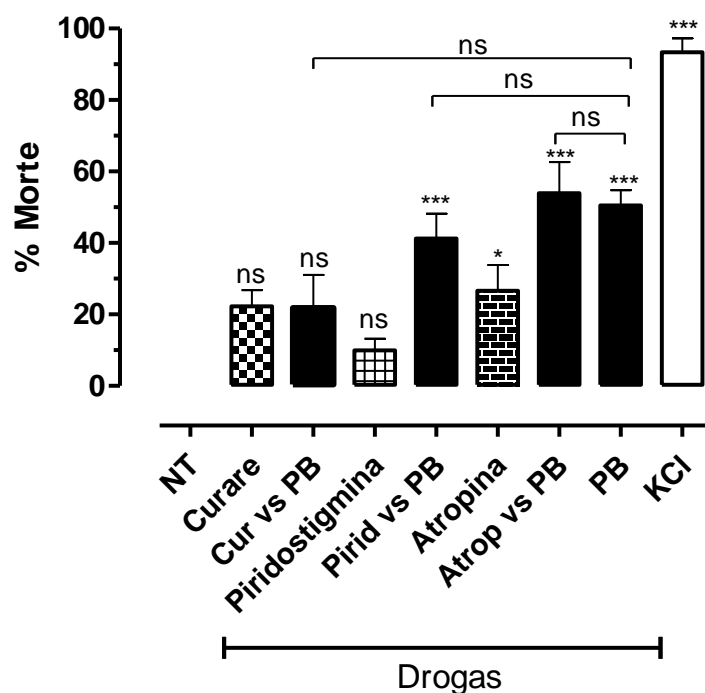


Figura 34: Efeito de drogas que atuam no sistema colinérgico D-tubocurarina (curare), piridostigmina e atropina na citotoxicidade induzida pela peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus* em cultura de neurônios hipocampais de ratos neonatos. Os neurônios foram pré-incubados por 30

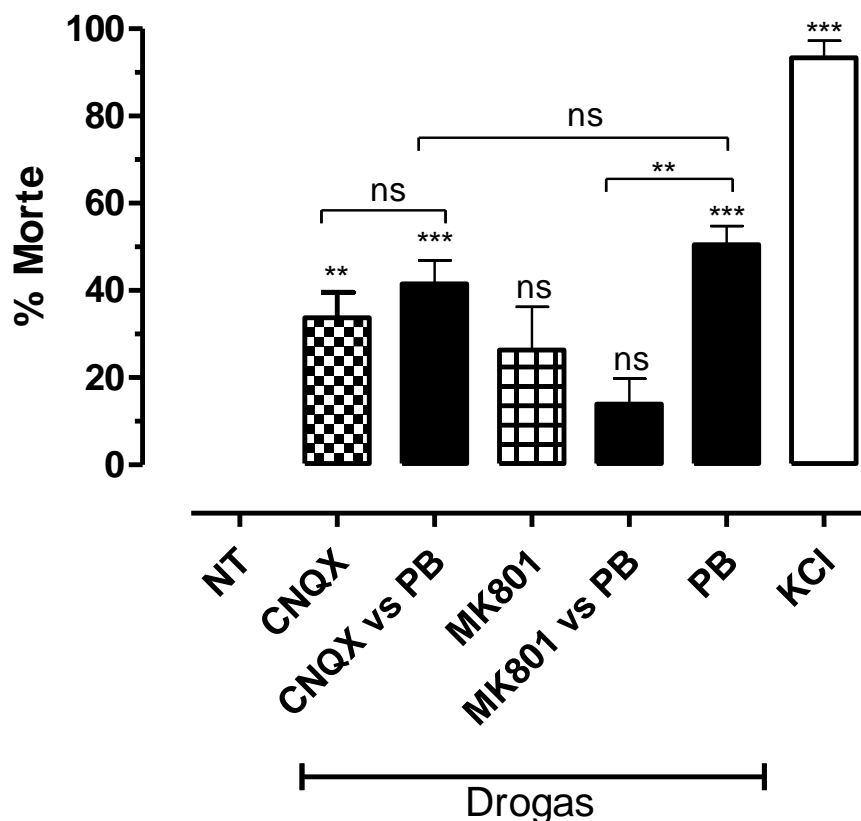
min com curare (146  $\mu\text{M}$ ), piridostigmina (10  $\mu\text{M}$ ) ou atropina (2  $\mu\text{M}$ ) e, em seguida, foram incubados com a peçonha bruta ( $50 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 h, a 37°C, em uma atmosfera umidificada (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Cada experimento teve sua média comparada à média dos NT (não tratados), que foi considerado como 100 % de viabilidade celular, ou 0% de mortalidade. KCl 3 M foi utilizado como controle positivo de morte celular. Foi utilizado o teste ANOVA One way, com pós-teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de cada experimento em triplicata (n=5). Ns= não significativo. NT = não tratado. Os ensaios foram estatisticamente significativos quando comparados aos NT sendo \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Comparando-se peçonha bruta (PB) *versus* PB mais drogas, os resultados não foram significativos.

#### **4.2.4. Efeito de drogas que atuam no sistema glutamatérgico, sobre a citotoxicidade promovida pela peçonha bruta em cultura de neurônios hipocâmpais de ratos neonatos**

Nos ensaios de citotoxicidade em neurônios hipocâmpais, foram também utilizados antagonistas dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos de NMDA (MK801, 10  $\mu\text{M}$ ) e de AMPA/cainato (CNQX 10  $\mu\text{M}$ ) (Figura 35).

O resultado revelou que o antagonista farmacológico CNQX reduziu 34 % da viabilidade celular (comparado ao NT- análises estatísticas evidenciadas pelos asteriscos) e, quando acrescido da PB, a toxicidade aumentou para 41 %, valor esse não sendo significativo quando comparado à PB (representados pelos colchetes horizontais). Porém, se comparado CNQX com o CNQX *vs* PB, não houve diferença estatística significativa, o que mostra que a presença do bloqueador impede o aumento de morte celular pela PB.

O bloqueio do receptor NMDA pelo antagonista MK801 na concentração de 10  $\mu\text{M}$  foi capaz de inibir a toxicidade promovida pela PB em 36 %, uma vez que a PB causou cerca de 50% de morte e MK801 *vs* PB causou apenas 14 %. Quando comparados ao NT não houve diferenças significativas.



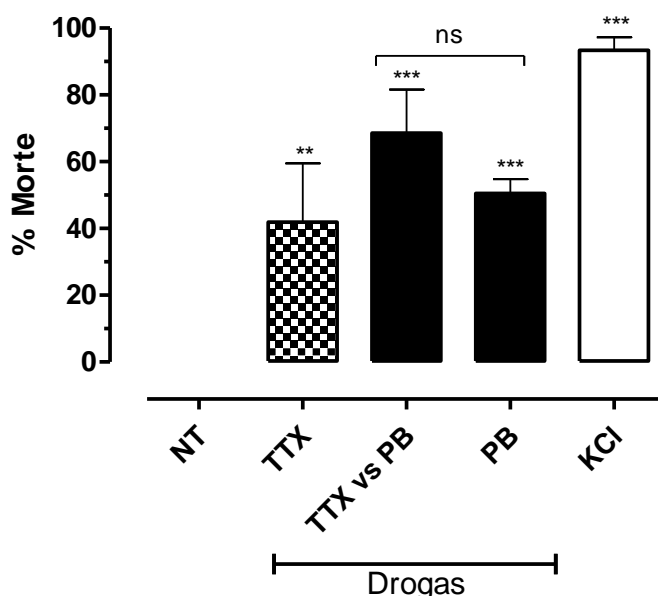
**Figura 35:** Efeito dos bloqueadores dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos, na citotoxicidade induzida pela peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus*, em cultura de neurônios hipocâmpais de ratos neonatos. Os neurônios foram pré-incubados por 30 min com os bloqueadores farmacológicos CNQX (10  $\mu$ M) e MK801 (10  $\mu$ M) e expostos à peçonha bruta ( $50 \times 10^{-1}$   $\mu$ g/ml) durante 24 h, a 37°C, em uma atmosfera umidificada (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. KCl 3 M foi utilizado como controle positivo de morte celular. Como teste estatístico utilizou-se ANOVA One way, com pós-teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de cada experimento em triplicata (n=5). Ns= não significativo. NT = não tratado. Os ensaios foram estatisticamente significativos quando comparados ao NT sendo \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001.

#### 4.2.5. Efeito da Tetrodotoxina, um bloqueador de canais para sódio dependentes de voltagem, sobre a citotoxicidade promovida pela peçonha bruta em cultura de neurônios hipocâmpais de ratos neonatos

O bloqueador de canais para sódio dependentes de voltagem, Tetrodotoxina (TTX, 200 nM), foi utilizado nos ensaios com neurônios de hipocampo, visando-se averiguar o possível envolvimento destes canais na citotoxicidade. Os neurônios foram pré-incubados por 30 min na presença de TTX (Figura 36). Observa-se que a TTX, por si só, causa, de modo significativo, 42% de morte celular em relação ao controle NT.

Quando adicionada a PB, a morte celular aumenta em 26% (68% total). Comparada à PB, a TTX vs PB não apresentou efeito significativo.

Portanto, o ensaio mostrou que o bloqueio dos canais  $Na_v$  não interferiu na citotoxicidade promovida pela PB incubada por 24 h. Esses dados corroboram com o resultado obtido em outro ensaio, em neurônios periféricos do gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos adultos, incubados com a PB, em que foram feitos registros eletrofisiológicos em modo *whole cell patch clamp*, com protocolos experimentais para os canais  $Na_v$ . Nesses ensaios não foi observada nenhuma atividade da PB sobre esses canais (dados não mostrados).



**Figura 36: Efeito da TTX, um bloqueador de canal para sódio dependente de voltagem, na citotoxicidade induzida pela peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus*, em cultura de neurônios hipocámpais de ratos neonatos.** Os neurônios foram pré-incubados por 30 min com o bloqueador TTX (200 nM) e expostos à peçonha bruta ( $50 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ ) durante 24 h, a  $37^\circ\text{C}$ , em uma atmosfera umidificada (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. KCl 3 M foi utilizado como controle positivo. Como teste estatístico utilizou-se ANOVA One way, com pós-teste de Turkey. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de cada experimento em triplicata ( $n=3$ ). Ns= não significativo. NT = não tratado. Os ensaios foram estatisticamente significativos quando comparados aos NT sendo \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PROMOVIDA PELA PEÇONHA BRUTA EM EM CULTURA DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS DE RATOS NEONATOS POR CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

Com o objetivo de avaliar o comprometimento da atividade lisossomal dos neurônios piramidais de hipocampo, expostos à peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus*, os neurônios em cultura primária ( $2 \times 10^4$  células/poço) foram incubados por 24h com a peçonha bruta em diferentes concentrações ( $5 \times 10^{-5}$  a  $5 \mu\text{g/ml}$ ) e expostos ao corante vermelho neutro (CVN) (Figura 37).

Os resultados mostraram que, os neurônios hipocampais, incubados por 24 h com a peçonha bruta, em diferentes concentrações, não apresentaram morte na maioria das concentrações testadas. Em algumas concentrações ( $5 \times 10^{-3}$  e  $5 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ ) a PB reduziu a viabilidade celular em cerca de 30 a 35% e, na concentração maior, de  $50 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ , a porcentagem de morte foi de 46%.

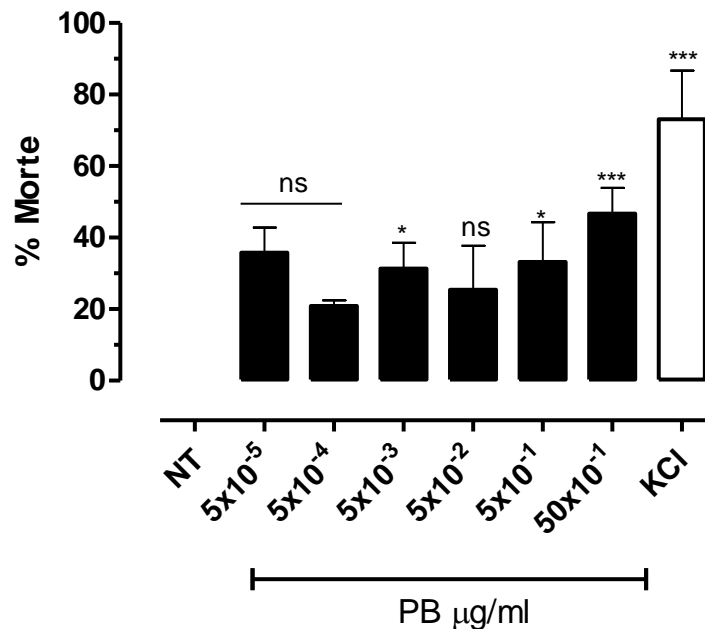


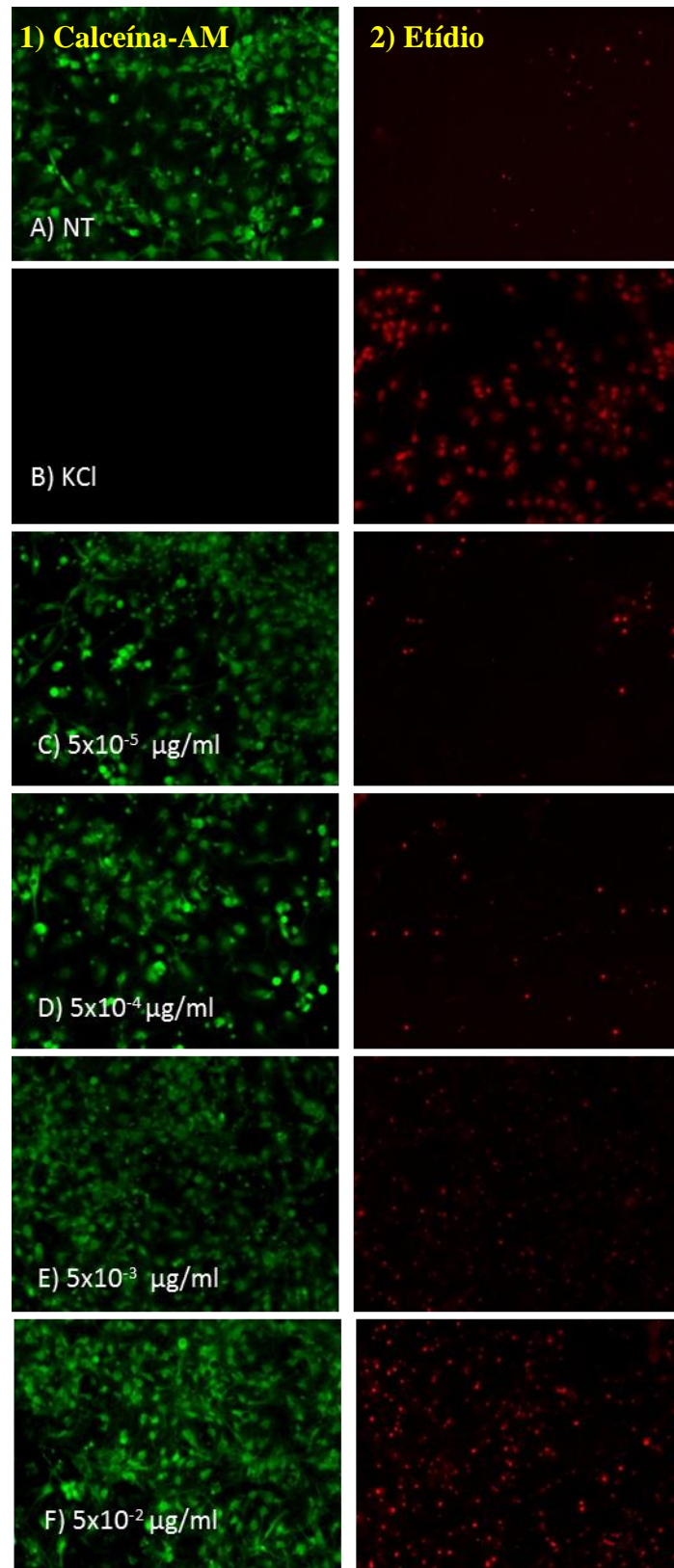
Figura 37: Efeito da peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus* na viabilidade da cultura de neurônios hipocampais de ratos neonatos. As células foram incubadas com a peçonha bruta ( $5 \times 10^{-5}$  a  $50 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ ) e a viabilidade celular foi determinada pelo acúmulo do corante vermelho neutro nos lisossomos das células viáveis. KCl 3 M foi utilizado como controle positivo de morte celular. Como teste estatístico utilizou-se ANOVA One way, com pós-teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de cada experimento em triplicata ( $n=6$ ). Ns= não significativo. NT = não tratado. Os ensaios foram estatisticamente significativos quando comparados aos NT sendo \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

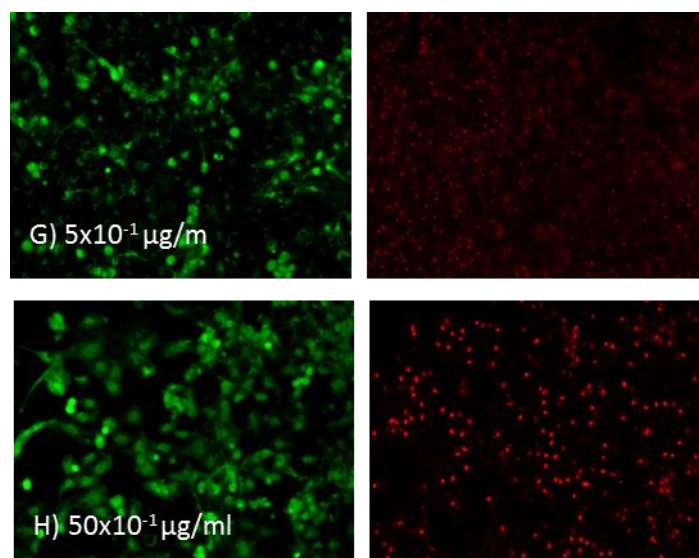
#### 4.4. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE/MORTE CELULAR PROMOVIDA PELA PEÇONHA BRUTA EM CULTURA DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS DE RATOS NEONATOS, POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.

Analisou-se qualitativamente a viabilidade e a morfologia dos neurônios hipocampais, expostos por 24 h à peçonha bruta de *Micrurus l. lemniscatus*, em diferentes concentrações. Os neurônios foram analisados por microscopia de fluorescência e as células viáveis são aquelas que emitem fluorescência verde (Calceína-AM= 494/517 nm) e as células mortas emitem fluorescência vermelha (Etídio homodímero-1= 528/617 nm) (figura 38).

Observa-se nas imagens que os ensaios não tratados (controle negativo) (linha A) apresentaram baixíssima fluorescência vermelha (coluna 2), indicando alta viabilidade celular. Em relação ao KCl (controle positivo) (linha B), ressalta-se o máximo de fluorescência na coluna 2, o que evidencia o máximo de morte celular.

Em relação às células tratadas com a peçonha bruta, as imagens revelaram que a partir da concentração de  $5 \times 10^{-3}$  µg/ml (linha E, coluna 2) houve aumento progressivo de fluorescência vermelha, evidenciando um aumento na morte celular. A concentração de  $50 \times 10^{-1}$  µg/ml desencadeou a maior taxa de mortalidade celular, em torno de 50% como pode ser observado na linha H/coluna 2.





**Figura 38:** Citotoxicidade em neurônios hipocâmpais, induzida pela peçonha bruta da serpente *M. lemniscatus*. Imagens por microscopia de fluorescência em cultura de neurônios hipocâmpais de ratos neonatos ( $2 \times 10^4$  células/poço). Após o 7º dia em cultura, os neurônios foram expostos a diferentes concentrações da peçonha bruta (PB) por 24h, a 37°C, em uma atmosfera umidificada, com 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. Linha A) NT (células em meio neurobasal+PBS 50 mM); Linha B) KCl 3M (controle positivo); Linha C) PB  $5 \times 10^{-5}$  µg/ml; Linha D) PB  $5 \times 10^{-4}$  µg/ml; Linha E) PB  $5 \times 10^{-3}$  µg/ml; Linha F) PB  $5 \times 10^{-2}$ ; Linha G) PB  $5 \times 10^{-1}$  µg/ml; Linha H) PB  $50 \times 10^{-1}$  µg/ml. Os ensaios de fluorescência foram realizados utilizando-se o @Viability/Cytotoxicity kit for mammalian cells (n=3, em duplicata). As células viáveis emitiram fluorescência verde (Calceína-AM= 494/517 nm) e as células mortas emitiram fluorescência vermelha (Etídio homodímero-1= 528/617 nm).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO PROMOVIDA PELA PEÇONHA BRUTA, SUAS FRAÇÕES E TOXINAS PURIFICADAS

##### 4.5.1 Liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato, induzida pela peçonha bruta (PB), por frações semi-puras e pelas toxinas MI 7.294\_NTX e MI 7.256\_NTX

Visando-se compreender a toxicidade em neurônios, desencadeada pela PB e por suas frações, a próxima etapa deste trabalho propôs avaliar a liberação de L-glutamato em sinaptosomas de córtex cerebral de ratos adultos. Sabe-se que a excitotoxicidade central pode ser causada pela excessiva liberação desse.

Sinaptosomas cérebro-corticais de ratos foram incubados na ausência e na presença de PB, da fração 22 semi-purificada (F22) e das toxinas, MI 7.294\_NTX e MI 7.256\_NTX, que compunham essa fração. Em sua dissertação de mestrado, Montandon



(2013) demonstrou que a PB, bem como algumas de suas frações induziram aumento da liberação de L-Glu em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos adultos.

Conforme observado nos ensaios de toxicidade celular mostrados anteriormente neste trabalho, o bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA, pelo antagonista MK801, em neurônios hipocâmpais de ratos, reverteu, em grande parte, a toxicidade provocada pela peçonha. Logo, o interesse em investigar o efeito de componentes da peçonha responsáveis pela liberação de L-Glu, que poderiam estar envolvidos nos eventos de toxicidade celular.

#### 4.5.1.1. Controle da viabilidade sinaptosomal pela determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

Como controle da viabilidade sinaptosomal (não tratados) e também para averiguar uma possível atividade lítica da peçonha bruta, da fração ou da toxina MI 7.294 NTX, sobre os sinaptosomas determinou-se a atividade da enzima LDH. O resultado (Figura 39) demonstrou que, nas condições experimentais utilizadas, a PB, F22 e a toxina MI 7.294 NTX não afetaram a viabilidade sinaptosomal, já que não alteraram significativamente, a atividade de LDH. As concentrações normalmente utilizadas em nossos ensaios são  $5 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-3}$ ;  $5 \times 10^{-2}$ ;  $5 \times 10^{-1}$ ;  $25 \times 10^{-1}$ ;  $50 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/mL}$  da peçonha bruta;  $50 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/mL}$  da F22 e 1  $\mu\text{M}$  da toxina M17.294\_NTX, respectivamente.

A atividade de LDH na presença do detergente Triton X-100 (1%), foi considerada com 100% de atividade de LDH (ou 100% de lise). Observa-se que nas concentrações maiores de PB houve 15,3 % de lise com  $0,05 \times 10^3$   $\mu\text{g/ml}$  e 27 % de lise com  $0,5 \times 10^3$   $\mu\text{g/ml}$ .

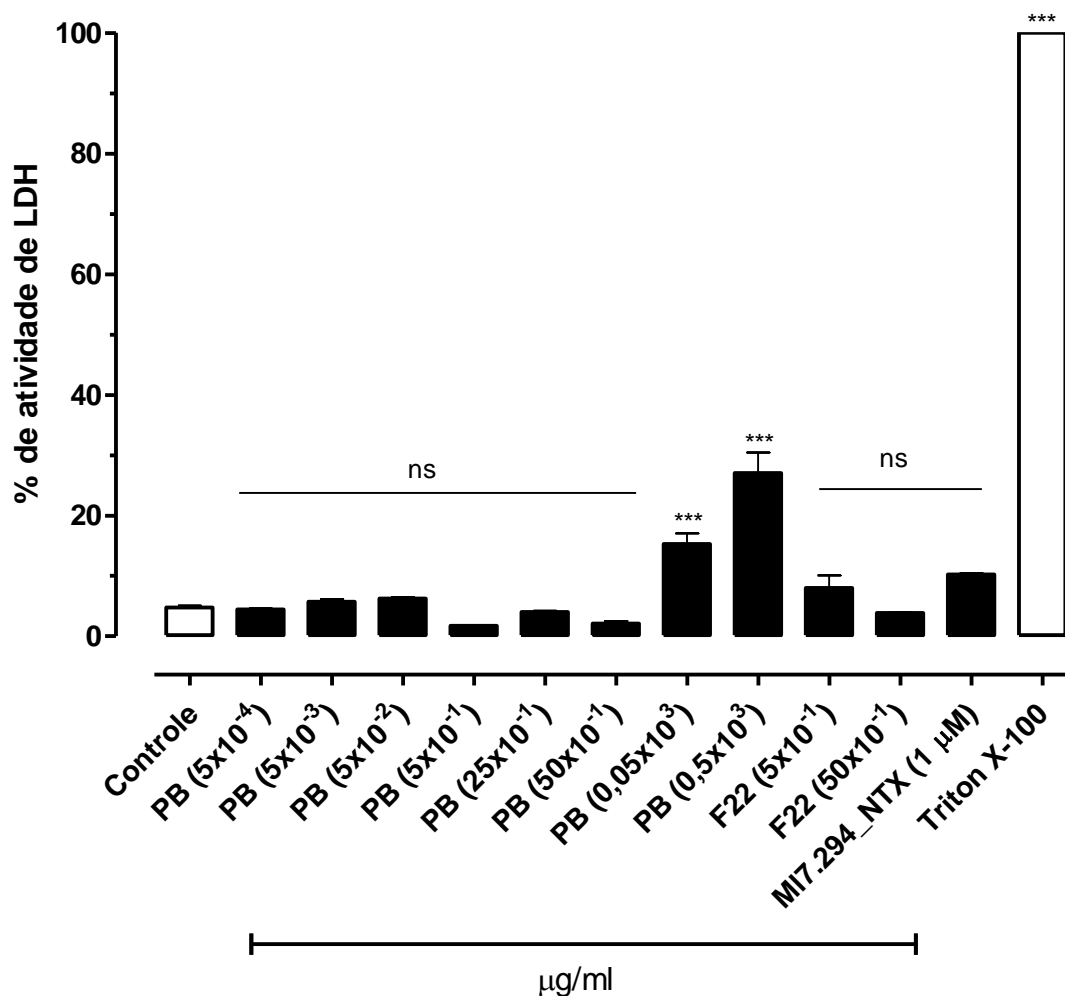


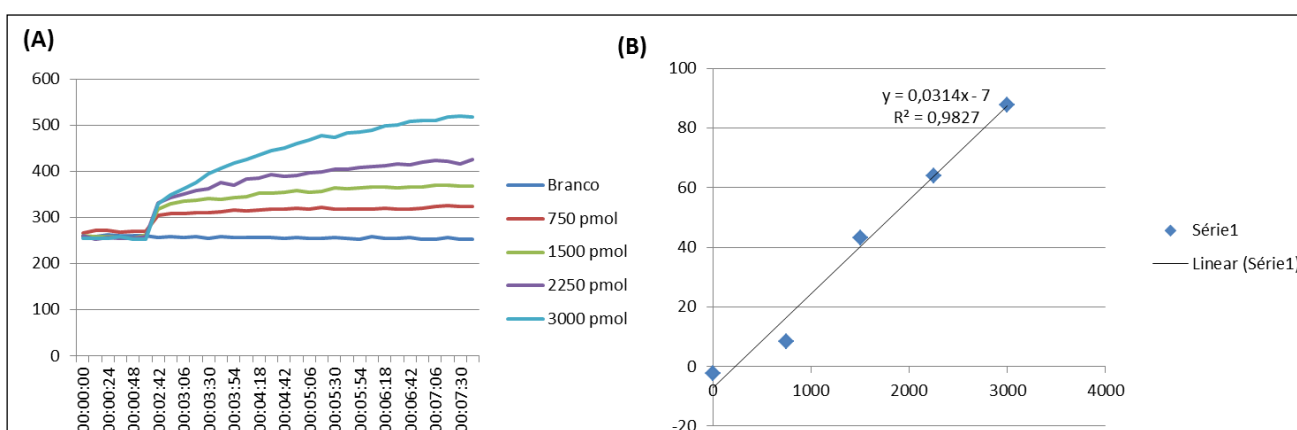
Figura 39: Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase. 170 µl de tampão fosfato 50 mM em pH=7,4; piruvato de sódio 0,6 mM, 10 µl NADH 0,063 mM em 20 µl da solução de sinaptosomas) foi incubada a 37°C, por 60 min, com diferentes concentrações da peçonha bruta (PB), ou fração 22, ou toxina MI 7294\_NTX. A porcentagem de atividade foi avaliada em relação àquela observada na presença de Triton X-100 1 % (v/v). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se ANOVA One way, com pós-teste de Tukey. Os valores representam a média ± SEM de cada experimento em triplicata (n=3). Ns= não significativo. Ensaios estatisticamente significativos quando comparados ao controle (\*\*p<0,001).

#### 4.5.1.2. Liberação de L-glutamato – controles

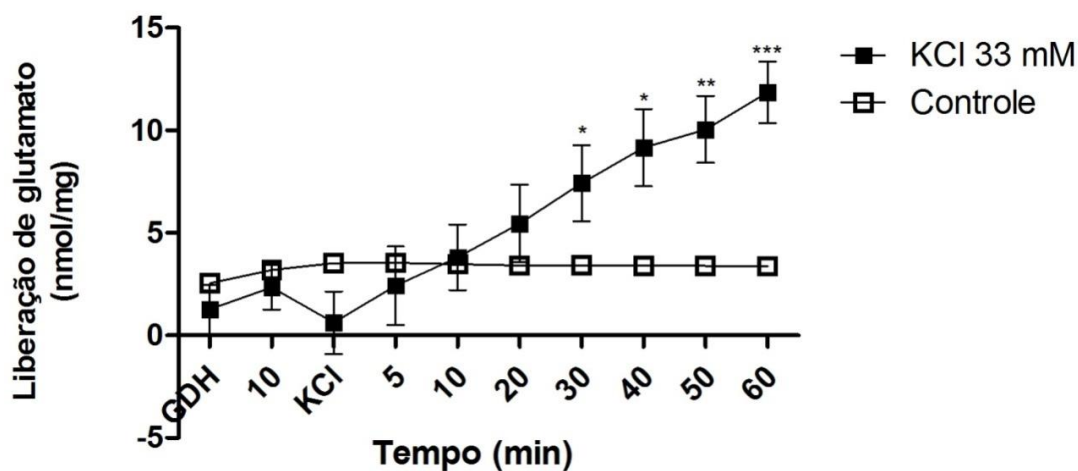
Comparativamente, para o cálculo das concentrações de L-Glu liberadas do sinaptosomas pela peçonha bruta, fração e toxinas, foi realizada a curva padrão de L-Glu, nas concentrações de 750, 1.500, 2.250 e 3.000 pmol (figura 40). Os ensaios representaram a média de três experimentos, em triplicata. Em (A) está relacionado a

intensidade da fluorescência *versus* o tempo de registro com cada concentração de L-Glu. Em (B) mostra-se a equação por regressão linear dos dados obtidos.

Nos ensaios de liberação de L-Glu utilizou-se como controle a liberação basal, isto é, aquela observada nos sinaptosomas incubados sem nenhuma adição de drogas. Este valor foi utilizado na normalização dos dados após os diferentes tratamentos. O KCl 33 mM foi utilizado como controle da liberação que em nossas condições experimentais foi cerca de 13 nmol/ mg de proteína sinaptosomal, em 60 min de incubação, enquanto que os valores de liberação pelo controle permaneceram estáveis durante todo o tempo, sendo em torno de 2,5 nmol/mg) (gráfico 41).



**Figura 40:** Curva representativa de L-glutamato. (A) Mostra a intensidade de fluorescência *versus* o tempo de registro das diferentes concentrações de ácido glutâmico. Em (B) é observada a equação por regressão linear dos dados obtidos em (A), de três experimentos em triplicata.



**Figura 41:** Controles de liberação de L-glutamato nos sinaptosomas cérebro corticais de rato. Os sinaptosomas foram incubados em condição controle basal e em condição despolarizante (KCl 33mM) nos tempos indicados. Os valores representam a média  $\pm$  SEM (n=6, em triplicata). A

**análise estatística foi feita utilizando-se ANOVA Two-way, com pós-teste de Bonferroni, sendo \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .**

#### 4.5.1.3. Liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos induzida pela F22 é concentração-dependente

Os ensaios de liberação de L-Glu foram realizados inicialmente, com algumas das 42 frações provenientes da cromatografia de fase reversa em coluna semipreparativa Discovery Supelco. O critério de escolha destas frações baseou-se nos resultados dos ensaios de citotoxicidade em células de linhagem Neuro-2A e também algumas destas frações já haviam sido mostradas, em ensaios prévios, induzir aumento da liberação de L-Glu (Montandon, 2013). Além disso, foi definido que, como pré-requisito apenas frações contendo toxinas do tipo 3-Ftx, ou seja, com massa molecular entre 6-8 kDa, seriam utilizadas nos ensaios de liberação de L-Glu.

Três frações foram escolhidas para os testes iniciais, F19, F21 e F22, sendo que as frações F19 (contendo as seguintes massas: 6.421; 6.503; 7.112,16 Da) e F21 (MM= 6,107; 7.421; 6.758; 6.471; 7.236; 7.428 Da) não induziram a liberação de L-Glu (dados não mostrados). Logo, das três frações testadas, apenas F22 foi capaz de induzir a liberação de L-Glu e ao mesmo tempo ocasionar considerável toxicidade celular. A partir desta fração, caracterizaram-se três toxinas de massas moleculares 7.199; 7.256 e 7.294 Da (figura 42B), por espectrometria de massas.

Analisando-se a figura 42A, pode-se observar que a fração F22 induziu significativa liberação de L-Glu, em relação ao controle, apenas nas concentrações de 30, 90 e 135  $\mu\text{g/ml}$ . A liberação máxima induzida por F22 foi por volta de 2,5 nmol de glutamato/mg de proteína sinaptosomal.

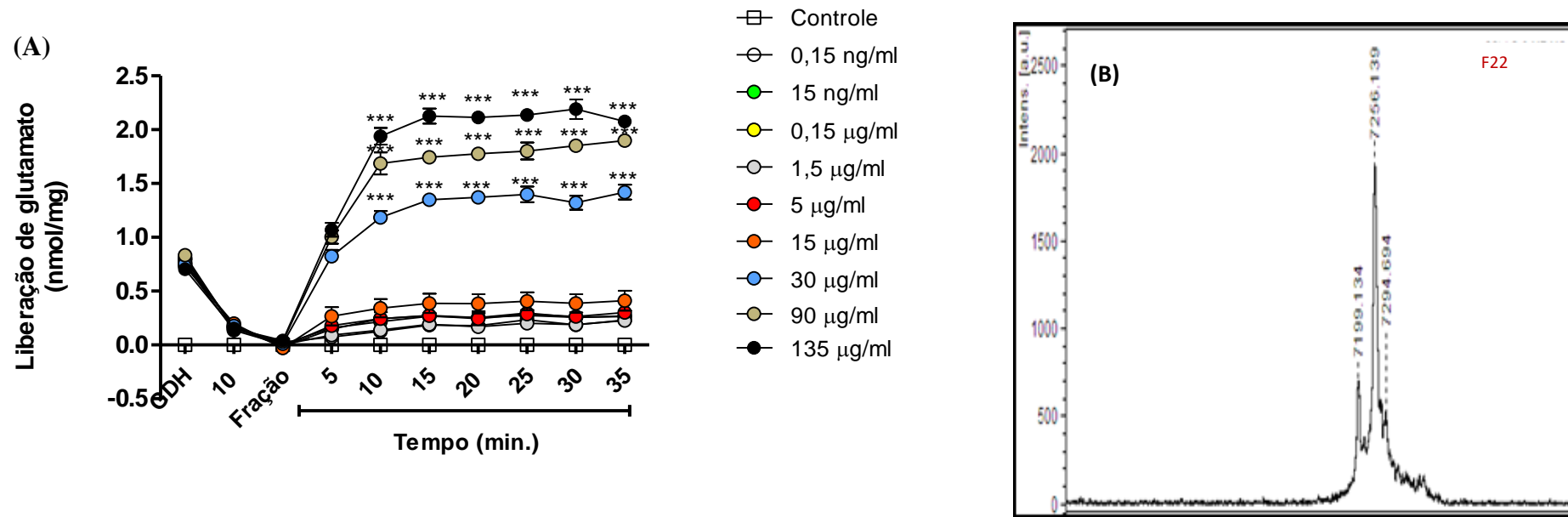


Figura 42: Liberação de L-glutamato, concentração-dependente, induzida pela Fração 22 em sinaptosomas cerebrocorticais. Em (A) é mostrada a curva concentração-dependente (0,15 a 135 µg/ml) da Fração 22, na indução da liberação de L-glutamato por 35 minutos. Os valores representam a liberação de glutamato nas diversas condições experimentais, já descontado o valor da liberação basal (sendo o controle os não-tratados) em cada tempo, e representam a média  $\pm$  SEM (n=3 em triplicata). A análise estatística foi feita utilizando-se ANOVA Two-way, com pós-teste de Bonferroni, sendo \*\*\*  $p < 0,001$ . Em (B) é observado o espectro de massas MALDI-TOF MS da Fração 22, demonstrando que a mesma é composta por três toxinas de massas moleculares 7.199; 7.256 e 7.294 Da).

Classicamente, é sabido que, a liberação de neurotransmissores dos terminais de neurônios pré-sinápticos é predominantemente dependente da entrada do íon cálcio para que as vesículas que os contêm se fundam e estes sejam liberados. O próximo passo deste trabalho foi investigar se a liberação do NTs L-Glu, induzida pela Fração 22, dependeria do cálcio extra e/ou intracelular.

#### 4.5.1.4. Investigação da participação do cálcio, mediado por canais iônicos, na liberação de L-glutamato, induzida pela Fração 22

O efeito na liberação de L-Glu, desencadeado pela F22, foi avaliado na presença de bloqueadores de diferentes subtipos de canais para cálcio dependentes de voltagem. Três bloqueadores foram testados:  $\omega$ - conotoxina GVI A (bloqueador do canal do tipo N),  $\omega$ - agatoxina, (bloqueador do canal tipo P) e nifedipina, (bloqueador do canal do tipo L)- figura 43. Pode-se observar que, nenhum dos bloqueadores, isoladamente, conseguiu inibir por completo a liberação de L-Glu desencadeado pela fração. Entretanto, percebe-se que os bloqueadores  $\omega$ - conotoxina GVI A e  $\omega$ - agatoxina, inibiram parcialmente a liberação de L-Glu a partir de 10 min, ao passo que, nifedipina reduziu o efeito da liberação pela fração a partir dos 5 min, de modo estatisticamente significativo quando comparado à Fração 22 isolada. Comparada ao controle, a Fração 22 induziu a liberação de L-Glu dos sinaptosomas de modo estatisticamente significativo, em todo o período do experimento.

As análises estatísticas dos bloqueadores comparados ao controle não foram estatisticamente significativas. Quando comparados controle *versus* Bloqueadores+F22, as análises mostraram significância ( $p < 0,05$ ) para  $\omega$ - conotoxina GVIA+F22 (a partir dos 20 min);  $\omega$ - agatoxina IVA+F22 (a partir dos 30 min); nifedipina+F22 (a partir dos 50 min).

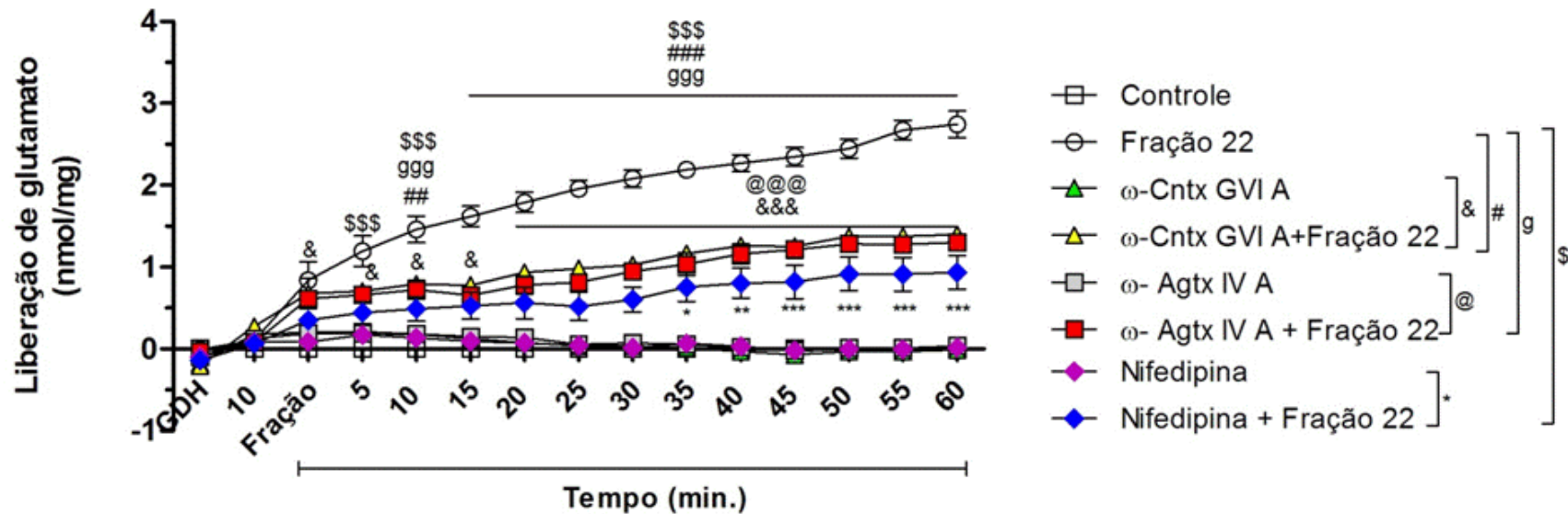


Figura 43: Efeito dos bloqueadores de canais para cálcio dependentes de voltagem, na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais induzida pela Fração 22. Liberação de L-glutamato por sinaptosomas induzida pela Fração 22 (30 µg/ml), em sinaptosomas pré-incubados por 30 min (à 37° C) com ω-conotoxina GVI A (10 µM), ou com ω-agatoxina IVA (30 nM) ou com nifedipina, (3 µM). Os valores da liberação de L-glutamato tiveram subtraído o valor basal (controle, não tratado) em cada tempo, e representam a média ± SEM (n=3 em triplicata). A análise estatística foi feita utilizando ANOVA Two-way, com pós-teste de Bonferroni, sendo \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. No gráfico, os símbolos representam as análises estatísticas em diferentes comparações (vide indicações ao lado). Cada símbolo representa um bloqueador e análise específicos, sendo ω-conotoxina GVI A (ω-Cntx GVI A) vs ω-conotoxina GVI A +F22 (&); ω-agatoxina IVA (ω-AgtxIV A) vs ω-agatoxina IVA+Fração 22 (F22) (@); nifedipina vs nifedipina+F22 (\*); F22 vs ω-conotoxina GVI A (#); F22 vs ω-agatoxina IVA+F22 (g); F22 vs nifedipina+F22 (\$).

Quando os bloqueadores foram utilizados concomitantemente (figura 44), a liberação de L-Glu induzida pela Fração 22 ainda assim, apresentou uma redução somente parcial, o que ressalta um possível envolvimento da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e liberação de L-Glu.



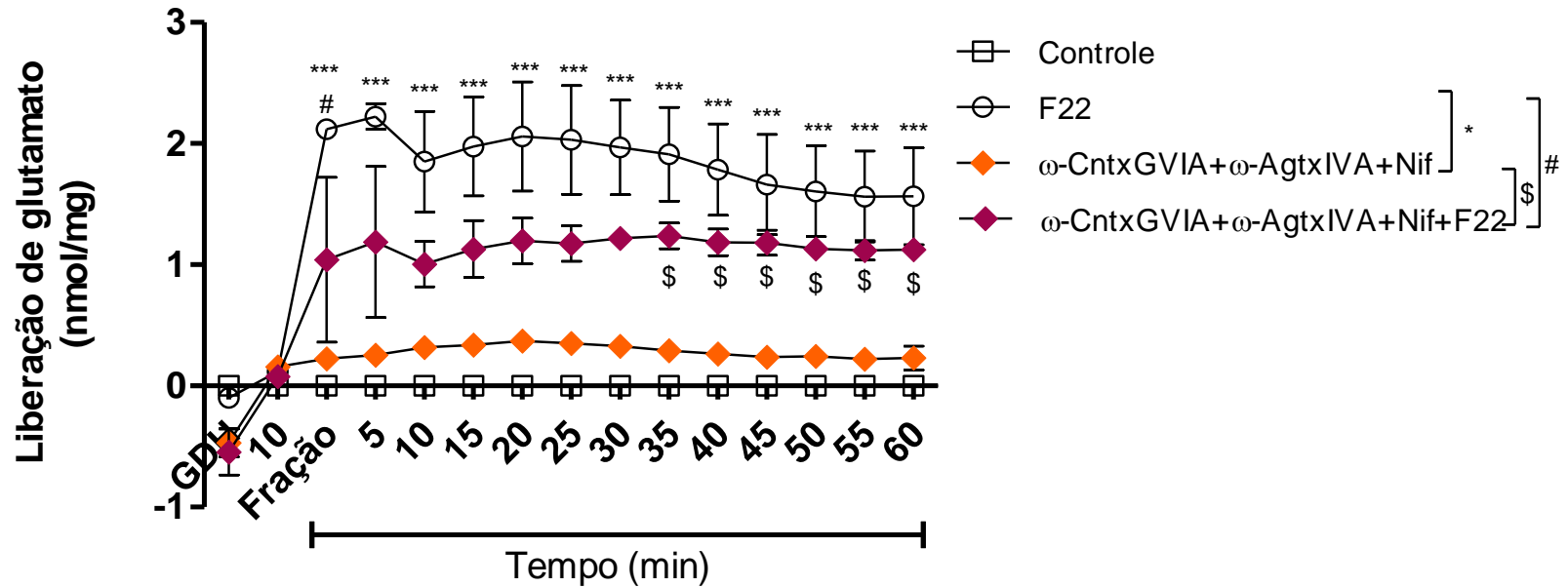


Figura 44: Efeito dos bloqueadores de canais para cálcio dependentes de voltagem, na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato induzida pela Fração 22. Liberação de L-glutamato por sinaptosomas incubados a 37° C, somente com a Fração 22 (F22) com 30  $\mu$ g/mL, ou com essa adicionada a sinaptosomas pré-incubados por 30 min com os bloqueadores  $\omega$ - conotoxina GVI A (10  $\mu$ M),  $\omega$ - agatoxina IVA (30 nM) e nifedipina, (3  $\mu$ M), conjuntamente. Os valores da liberação de glutamato tiveram subtraído a liberação basal do controle (não tratado) em cada tempo, e representam a média  $\pm$  SEM (n=3 em triplicata). A análise estatística foi feita utilizando ANOVA Two-way, com pós-teste de Bonferroni, sendo \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . No gráfico, os símbolos representam as análises estatísticas em diferentes comparações. Cada símbolo representa um bloqueador e análise específicos, sendo  $\omega$ - conotoxina GVI A+  $\omega$ - agatoxina IVA+ nifedipina vs F22 (\*);  $\omega$ - conotoxina GVI A+  $\omega$ - agatoxina IVA+ nifedipina+F22 vs F22 (#);  $\omega$ - conotoxina GVI A+  $\omega$ - agatoxina IVA+ nifedipina vs  $\omega$ - conotoxina GVI A+  $\omega$ - agatoxina IVA+ nifedipina+F22 (\$).

#### 4.5.1.5. Efeito de quelantes de cálcio na liberação de L-glutamato induzida pela Fração 22.

A liberação de L-Glu desencadeada pela F22 foi testada na presença dos quelantes de cálcio EGTA (10 mM), quelante de cálcio extracelular, e BAPTA-AM (10  $\mu$ M), quelante do cálcio intracelular. Foram utilizados os quelantes separados e conjuntamente, pré-incubados com a preparação por 30 minutos, a 37° C, antes da adição da fração. Os resultados estão apresentados na Figura 45. Observa-se que, na presença de EGTA e de EGTA+BAPTA-AM a fração teve sua atividade parcialmente inibida durante todo o período do experimento (60 minutos). Todavia, quando a mesma foi incubada com o BAPTA-AM (BAPTA-AM+F22) houve liberação parcial de L-Glu a partir de 30 minutos após exposição à fração, quando comparado ao efeito do BAPTA-AM, ou seja, parece haver uma reversão do efeito bloqueador do BAPTA a partir dos 30 minutos, possivelmente devido à permeação do cálcio extracelular através da membrana sinaptosomal.

O resultado sugere que a entrada de cálcio é essencial para que haja a liberação de L-Glu induzida pela F22, uma vez que nos ensaios da F22 incubada previamente com o quelante EGTA não houve a liberação do NTs, mostrando que a sua atividade é dependente do cálcio extracelular.

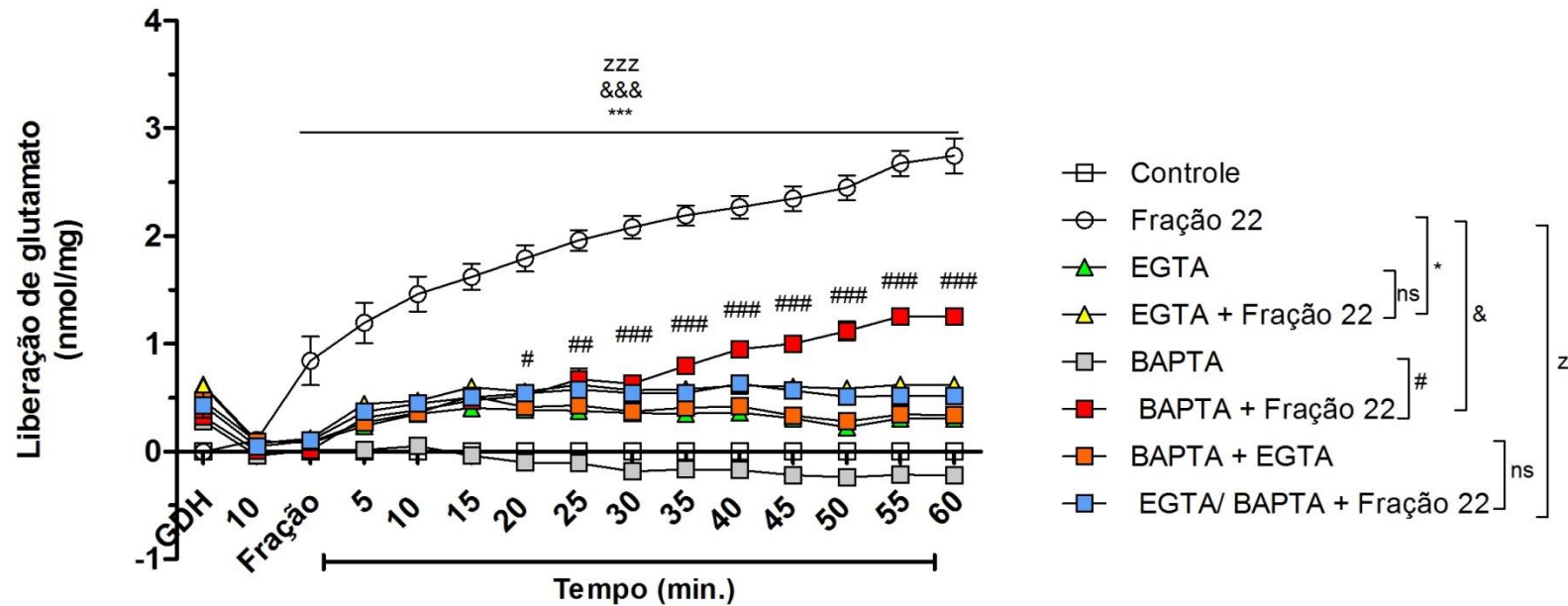


Figura 45: Efeito dos quelantes de cálcio na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais induzida pela Fração 22. Liberação de L-glutamato por sinaptosomas incubados a 37° C com F22 (30 µg/ml) ou pré-incubador por 30 min com BAPTA-AM (10 µM) e EGTA (10 nM), com posterior adição de F22. As leituras prosseguiram pelos tempos indicados. Os valores da liberação de glutamato tiveram subtraídas as médias da liberação basal, controle (não tratado) em cada tempo, e representam a média ± SEM (n=3 em triplicata). A análise estatística foi feita utilizando ANOVA Two-way, com pós-teste de Bonferroni, sendo # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001. No gráfico, os símbolos representam as análises estatísticas em diferentes comparações. Cada símbolo representa um bloqueador e análise específicos, sendo Fração22 vs EGTA+F22 (\*); Fração 22 vs BAPTA+F22 (&); Fração 22 vs EGTA/BAPTA+F22 (z); BAPTA vs BAPTA+F22 (#).

Para testar a hipótese proposta, avaliou-se a liberação de L-Glu na presença de dois bloqueadores dos iGluR, MK 801 e CNQX.

4.5.1.6. Efeito de bloqueadores dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos induzida pela Fração 22.

Os sinaptosomas foram pré-incubados com os bloqueadores MK801 (10  $\mu$ M) e CNQX (10  $\mu$ M) por 30 min e em seguida expostos à ação da F22 durante 60 minutos, enquanto a liberação de L-Glu foi monitorada. A análise da figura 46 revela que na presença dos antagonistas glutamatérgicos isolados, a liberação de L-Glu induzida pela F22 foi inibida em cerca de 80% em relação àquela apresentada somente pela fração. Todavia, estatisticamente pode-se observar uma sutil diferença entre os efeitos dos bloqueadores, uma vez que na presença do CNQX o início da liberação pela fração se deu a partir dos 5 min, enquanto que com o antagonista MK801 a liberação pela fração só é iniciada aos 20 minutos, ou seja, resposta é mais tardia.

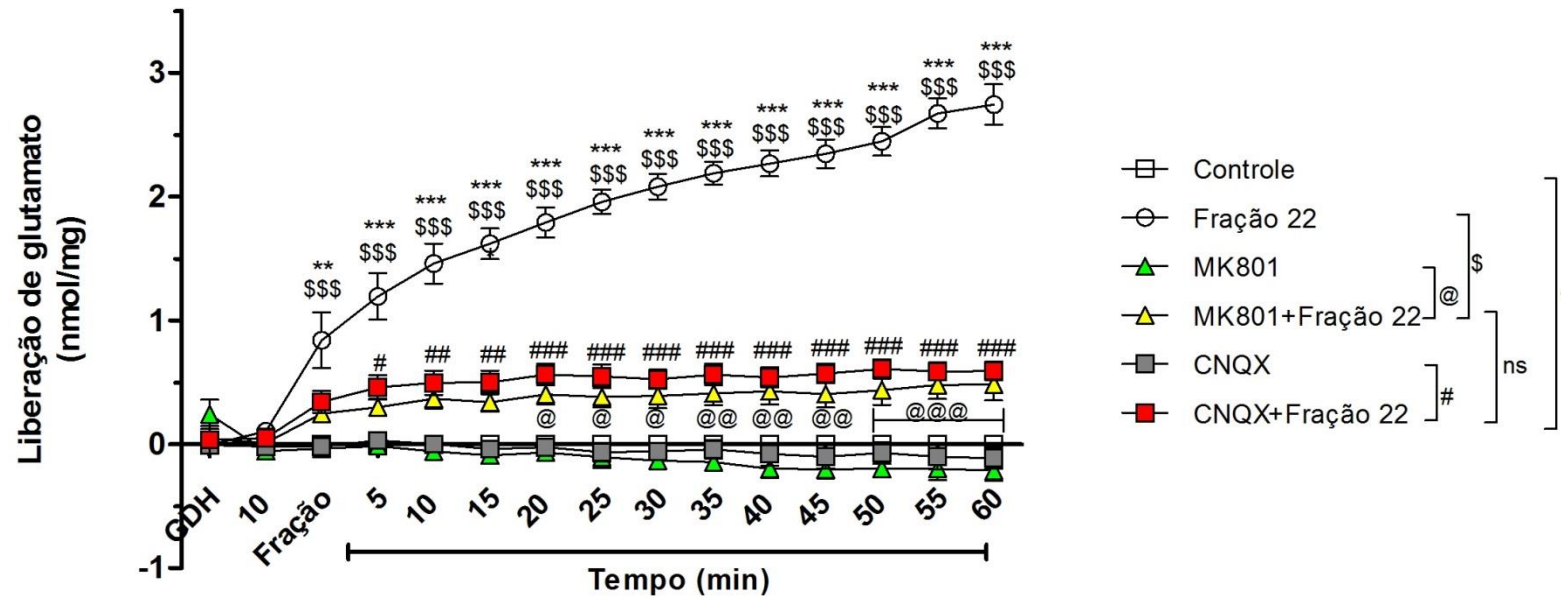


Figura 46: Efeito de bloqueadores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos sobre a liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato induzida pela Fração 22. A liberação de L-glutamato por sinaptosomas foi monitorada, a 37°C, na presença de F22 (30 µg/ml) e em condições onde os sinaptosomas foram pré-incubados por 30 min com os antagonistas MK801 (10 µM) e CNQX (10 µM). Os valores da liberação de glutamato tiveram subtraídas as médias da liberação basal observada no controle (não tratado) em cada tempo, e representam a média ± SEM (n=3 em triplicata). A análise estatística foi feita utilizando ANOVA Two-way, com pós-teste de Bonferroni, sendo # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001. No gráfico, os símbolos representam as análises estatísticas em diferentes comparações. Cada símbolo representa um bloqueador e análise específicos, sendo Fração 22 vs MK801+F22 (\$); Fração 22 vs CNQX+F22 (\*); MK801 vs MK801+F22 (@); CNQX vs CNQX+F22 (#).

4.5.1.7. *Contribuição efetiva dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA e AMPA/Cainato na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos induzida pela Fração 22*

Diante dos resultados obtidos, investigou-se a participação dos receptores NMDA e AMPA no intuito de tentar esclarecer a contribuição de cada um desses receptores na liberação de L-Glu induzida pela F22. Os bloqueadores MK801 (10  $\mu$ M) e CNQX (10  $\mu$ M) foram previamente incubados com os sinaptosomas por 30 minutos, concomitantemente, e expostos à ação da F22 na liberação de L-Glu durante 60 minutos. Pode-se observar na Figura 47 que na presença concomitante dos dois bloqueadores a liberação de L-Glu induzida pela F22 foi abolida completamente, dado revelado através da comparação entre o efeito dos bloqueadores e o efeito dos bloqueadores com adição da fração, uma vez que não houve diferença estatística significativa entre estes.

Em complemento, o resultado revela a participação de ambos os iGluR na liberação de L-Glu induzida pela F22, além da dependência da ativação de ambos os receptores para que ocorra a liberação do neurotransmissor.

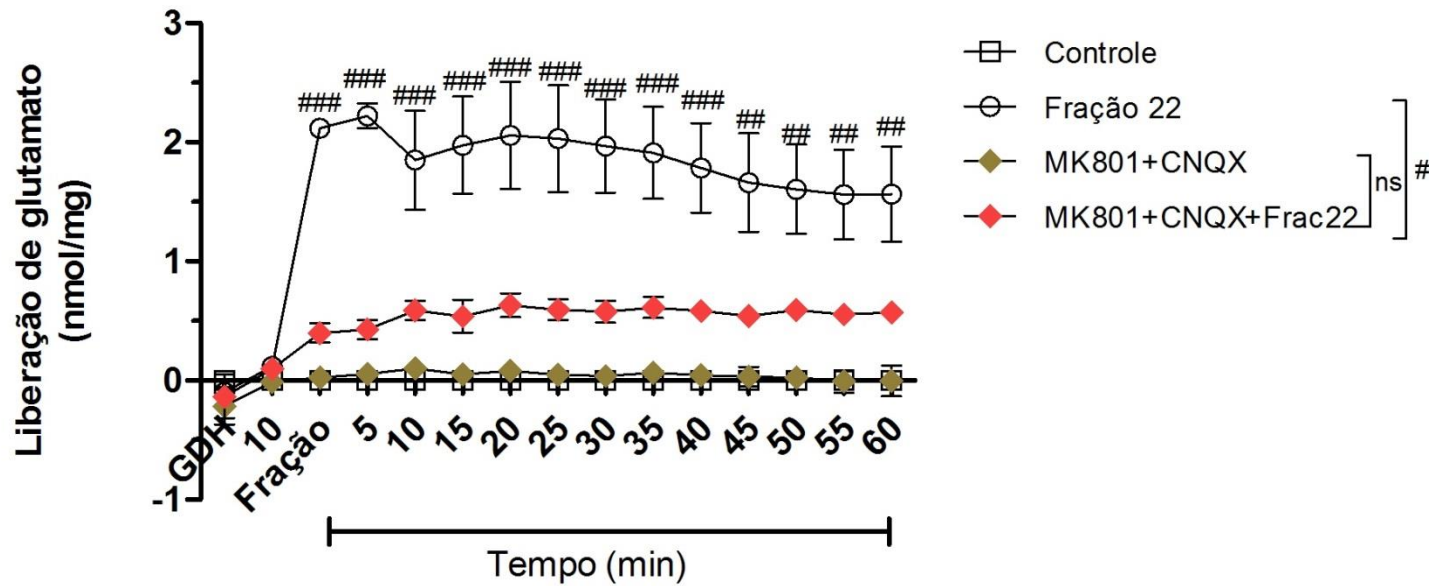


Figura 47: Contribuição dos receptores ionotrópicos de glutamato NMDA e AMPA na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos induzida pela Fração 22. O efeito da Fração 22 (30  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre a liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos foi comparado com o efeito da fração na liberação de L-glutamato quando os sinaptosomas foram previamente expostos por 30 min, a 37° C, aos antagonistas MK801 (10  $\mu\text{M}$ ) e CNQX (10  $\mu\text{M}$ ) em associação. Os valores da liberação de glutamato tiveram subtraídas as médias da liberação basal observada no controle (não tratado) em cada tempo, e representam a média  $\pm$  SEM (n=3 em duplicata). A análise estatística foi feita utilizando ANOVA Two-way, com pós-teste de Bonferroni, sendo ###  $p < 0,001$ .

#### 4.5.1.8. Efeito da variação do potencial de membrana na liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos induzida pela Fração 22

Na tentativa de esclarecer o papel de cada um desses receptores ionotrópicos glutamatérgicos na liberação de L-Glu, induzida pela F22 propôs-se verificar qual a influência do potencial de membrana neste processo, através de uma despolarização na membrana sinaptosomal, antes do tratamento com a F22. Para isso, utilizou-se o agente despolarizante KCl (45 mM) e poucos segundos depois foi adicionada a F22.

A figura 48 revelou que, quando a membrana sinaptosomal está no estado despolarizado (na presença do KCl), nos primeiros 10 minutos de exposição à fração, a liberação de L-Glu foi inibida em cerca de 50 %, e que o perfil de liberação após os 10 minutos, mimetizou o apresentado pelo KCl, sem a fração.

Comparando os perfis de liberação de L-Glu promovida pelo agente despolarizante KCl e pela F22, pode-se notar que há diferenças estatisticamente significativas. Nota-se que a fração promove uma intensa liberação de L-Glu nos primeiros 15 minutos, e que após esse período ocorre uma liberação que tende a valores estabilizados até 30 minutos. Ao passo que, o KCl causa uma liberação progressiva de L-Glu, que se torna mais evidente após os 30 minutos de exposição.

O resultado evidencia que a alteração no potencial de membrana prejudicou a liberação de L-Glu induzida pela F22.



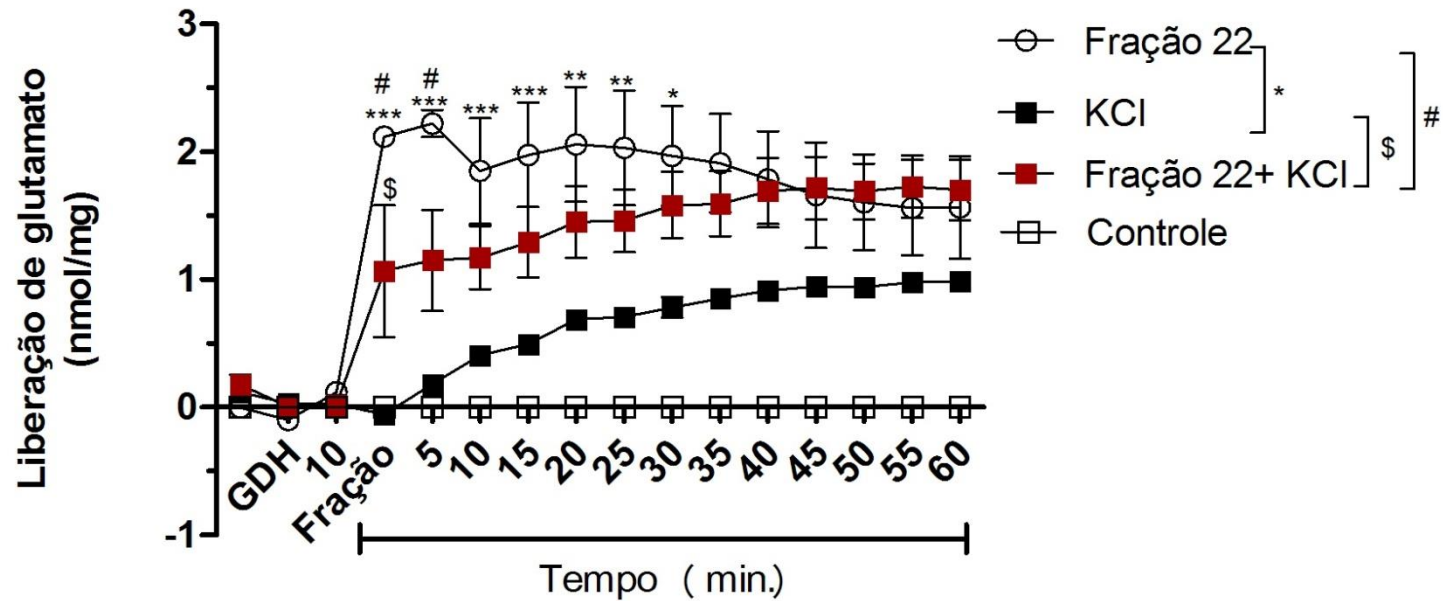
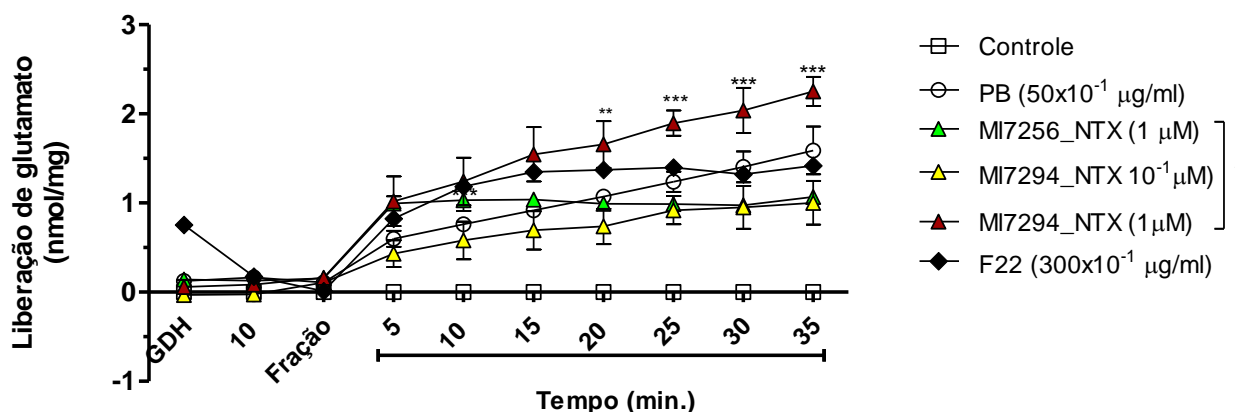


Figura 48: Efeito do potencial de membrana de sinaptosomas cérebro corticais de ratos na liberação de L-glutamato induzida pela Fração 22. Liberação de L-glutamato em sinaptosomas incubados a 37°C, com F22 (30 µg/ml), ou na presença de F22 e do agente despolarizante KCl (45 mM), ou incubados somente na presença de KCl (45 mM). Os valores da liberação de glutamato tiveram subtraídas as médias da liberação basal observada no controle (não tratado) em cada tempo, e representam a média ± SEM (n=3 em duplicata). A análise estatística foi feita utilizando ANOVA Two-way, com pós-teste de Bonferroni, sendo \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. No gráfico, os símbolos representam as análises estatísticas em diferentes comparações. Cada símbolo representa um bloqueador e análise específicos, sendo Fração 22 vs KCl (\*); Fração 22 vs KCl+F22 (#); KCl vs F22+KCl (\$).

#### 4.5.1.9. Liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos induzida por duas toxinas isoladas da Fração 22.

Após verificar-se que a F22 que contém três toxinas do tipo 3-Ftx (MM= 7.119; 7.256; 7.294 Da) induz aumento da liberação de L-Glu, decidiu-se verificar se essas toxinas poderiam de forma isolada, alterar a liberação de L-Glu. Duas (MI7256\_NTX e MI7294\_NTX) das três toxinas obtidas em estado puro utilizando-se cromatografia CIEX seguida de RPC, e identificadas por espectrometria de massas foram utilizadas nestes ensaios.

A Figura 49 mostra, a liberação de L-Glu evocada pela peçonha bruta (PB) (5  $\mu\text{g/ml}$ ), pela F22 (30  $\mu\text{g/ml}$ ) e pelas toxinas MI7256\_NTX (1  $\mu\text{M}$ ) e MI7294\_NTX (10<sup>-1</sup> e 1  $\mu\text{M}$ ). Os resultados mostram que as toxinas aumentaram significativamente, a liberação do L-Glu, assim como a peçonha bruta e a fração, quando comparadas ao controle. Em uma mesma concentração (1  $\mu\text{M}$ ), observa-se que a toxina de MI 7294\_NTX induziu uma maior liberação do neurotransmissor do que a toxina de MI 7256\_NTX, a mesma comparação não pode ser feita em relação a PB e a F22, considerando-se as diferentes concentrações utilizadas.



**Figura 49:** Liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de ratos por duas toxinas purificadas a partir da Fração 22. As toxinas purificadas, MI7256\_NTX (1  $\mu\text{M}$ ) e MI7294\_NTX (1  $\mu\text{M}$ ) foram testadas nos ensaios de liberação de L-glutamato. Os valores da liberação de glutamato tiveram subtraídas as médias da liberação basal observada no controle (não tratado) em cada tempo, e representam a média  $\pm$  SEM (n=3 em duplicata). KCl (33 mM) foi utilizado como controle positivo de liberação (dados não mostrados), e representam a média  $\pm$  SEM (n=3, em triplicata) A análise estatística foi feita utilizando ANOVA Two-way, com pós-teste de Bonferroni, \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001. As análises estatísticas da PB, F22 e Toxinas comparados ao controle mostraram significância (p < 0,05) da seguinte forma: controle vs PB (a partir dos 10 min); controle vs F22 (a partir dos 5 min); controle vs MI7256\_NTX (1  $\mu\text{M}$ ) e MI7294\_NTX (1  $\mu\text{M}$ ) (a partir dos 5 min); MI7294\_NTX (10<sup>-1</sup>  $\mu\text{M}$ ) (a partir dos 10 min).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA PEÇONHA, FRAÇÕES E TOXINAS ISOLADAS DA SERPENTE *Micrurus l. lemniscatus*

Estudos proteômicos e peptidômicos de peçonhas de serpentes *Micrurus* sp., com base na caracterização bioquímica e isolamento dos seus constituintes proteicos e peptídicos são considerados processos morosos e complexos, uma vez que requerem técnicas e métodos de fracionamento e análises aprimoradas. São utilizadas técnicas diferentes para tais análises, especialmente a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC); eletroforese em gel de poliacrilamida 1D (unidimensional) e 2D (bidimensional) (SDS-PAGE); espectrometria de massas; sequenciamento proteico; *immunoblotting* (*western blotting*). Esta relativa morosidade e complexidade justifica, em parte, a existência de poucos trabalhos publicados com toxinas isoladas ou frações semipurificadas destas peçonhas (FOX, et al., 2006).

Ainda justificando a escassez dos trabalhos de venoma e com os componentes isolados das serpentes *Micrurus* sp., ressalta-se o fato dessas serpentes apresentarem hábito fossorial ou semifossorial, o que torna difícil sua captura para a obtenção de peçonha, e, além disso, há dificuldade de manutenção desses animais em cativeiro, em virtude da dieta especializada e restrita as presas não-mamíferos (DA SILVA JR, 2001; DA SILVA JR, GRIFFIN, & AIRD, 1991)

Tentativas de aprimoramento na resolução e eficiência na separação dos componentes das peçonhas elapídicas tiveram os seus primórdios no final da década de 70. Em um dos estudos pioneiros envolvendo o isolamento por HPLC de uma PLA<sub>2</sub> de *Micrurus fulvius microgalbineus*, foram empregados dois métodos de fracionamento, uma cromatografia de exclusão molecular, que gerou cinco frações, seguida de uma cromatografia de troca iônica originando oito frações, sendo uma delas, a toxina pura, que teve o N-terminal sequenciado (POSSANI et al., 1979).

Em outro trabalho clássico e pioneiro com a peçonha da serpente *Naja m. mossambica*, desenvolvido por Bougis e col. (1986), observou-se que o uso de RPC-HPLC foi eficaz na separação dos principais componentes conhecidos dessas peçonhas, purificados em uma única etapa cromatográfica. A ordem de eluição foi:  $\alpha$ -NTX, PLA<sub>2</sub> e cardiotoxinas, com uma recuperação total da atividade biológica. Esse foi um dos

primeiros trabalhos a descrever o isolamento de uma cardiotoxina (3-Ftx) utilizando-se como parâmetro a hidrofobicidade, em HPLC.

Rosso e col. (1996) caracterizaram bioquimicamente uma  $\alpha$ -NTX e uma PLA<sub>2</sub> de *Micrurus n. nigrocinctus* utilizando-se RPC-HPLC. A sequência da toxina, com 60 resíduos de aminoácidos foi determinada e comparada com outras toxinas, com o uso das ferramentas FASTA e CLUSTAL, sendo os dados analisados em banco de dados NBRF-PIR.

Em outro trabalho caracterizou-se algumas PLA<sub>2</sub> e  $\alpha$ -NTXs de *Micrurus n. nigrocinctus* por meio de fracionamento por HPLC e FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). A peçonha bruta inicialmente foi fracionada por RPC-HPLC. Em seguida, as amostras foram submetidas à troca iônica em FPLC. Nesse trabalho, foram realizados ensaios de competição com as frações obtidas, em nAChR de *Torpedo californica*, mostrando que algumas frações se ligaram de forma concentração-dependente aos receptores, e outras foram reconhecidas por anticorpos contra neurotoxina II e  $\alpha$ -cobrotoxina de *Naja* sp., evidenciando a presença de  $\alpha$ -NTXs de cadeia curta. O N-terminal de 04 destas toxinas foi determinado. Além disso, observou-se que outras frações apresentaram atividade fosfolipásica, isolando-se 03 toxinas do tipo PLA<sub>2</sub> básicas, sendo que duas delas (denominadas nigroxina A e B) tiveram seus N-terminais sequenciados (ALAPE-GIRÓN, et al., 1996).

Francis e col. (1997) utilizaram FPLC com diferentes condições, para a purificação de PLA<sub>2</sub> e  $\alpha$ -NTXs de *Micrurus f. frontalis*. Foram obtidas 04 frações, cujas massas moleculares foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. A fração 01, era composta por proteínas de 20 e 9 kDa; a 02, de 9 kDa; e a terceira e quarta frações, por proteínas de massas moleculares entre 18-21 kDa. Essas duas últimas foram submetidas a análise por *western blotting*, utilizando-se um anticorpo contra uma PLA<sub>2</sub> hipotensora/hemorragica da serpente elapídica *Notechis s. scutatus*, que apresentou reação cruzada. Com a estratégia metodológica utilizada foi possível isolar e identificar a primeira toxina fosfolipásica hipotensora/hemorragica de *Micrurus* sp.

Perkins e col. (1995) fez um dos trabalhos de vanguarda, em análises de massas moleculares, de moléculas isoladas de peçonhas de serpentes, por espectrometria de massas, evidenciando a presença de frações contendo baixa massa molecular nas serpentes elapídicas *Dendroaspis j. kaimosae* (*black mamba*) e *M. fulvius*, que foram submetidas a análises por eletroforese capilar eletrospray (CE-ESI-SIM-MS), ESI-MS

(eletrospray) e MALDI-TOF-MS. Nas 51 frações analisadas de *Dendroaspis j. kaimosae* foram detectadas toxinas de massas moleculares entre 6-7, 7-8 e 8-9 kDa. Das 34 frações isoladas de *M. fulvius* foram encontradas toxinas com MM= 6-7 e 7-8 kDa apenas. Os métodos mostraram-se precisos e promissores na identificação das massas moleculares de cada fração, podendo-se perceber as pequenas variações entre as massas, fator limitante na descrição de massas pela técnica de eletroforese.

Entretanto, foi apenas no final do século passado que os trabalhos de venômica tornaram-se mais refinados e completos, trazendo análises acuradas de massas moleculares, de clonagem e expressão de toxinas e *immunoblotting*. A combinação da melhor resolução da eletroforese bidimensional (2D-PAGE), a alta sensibilidade da espectrometria de massas aos biocompostos, o aumento de depósitos de sequências proteicas e de DNA em bancos de dados, tem tornado os trabalhos de proteoma, peptidoma e venômica de alto nível (FAVREAU et al., 2006; GEVAERT et al., 2000). Isso vem permitindo uma caracterização minuciosa dos componentes das peçonhas de *Micrurus* sp. com seus alvos farmacológicos, além de possibilitar novas alternativas para a produção de antivenenos.

No intuito de se obter constituintes isolados, Oliveira e cols. (2000) clonaram e caracterizaram uma  $\alpha$ -NTXs de *M. corallinus*; a toxina foi clonada a partir do cDNA da toxina nxh1, obtido do transcriptoma da glândula de peçonha. Essa toxina apresenta 57 resíduos de aminoácidos e com sequência parcial do N-terminal (MICCOIVCYKRHASDSQTTT). Posteriormente, o grupo clonou uma PLA<sub>2</sub> básica (MM= 12, 75 kDa) (OLIVEIRA, et al., 2003). Em 2009, foi publicado o trabalho com o transcriptoma completo da peçonha desta serpente. Foram encontradas 1.438 ESTs sendo que as toxinas representaram apenas 46% dessas. As duas classes de toxinas proteicas com maior frequência foram as 3-Ftx (24%) e as PLA<sub>2</sub> (15%). Contudo, outras classes também apareceram como constituintes da peçonha, dentre elas, lectinas do tipo C, precursor de peptídeos natriuréticos, metaloproteases e L-amino oxidases. Ademais, foram selecionados 05 candidatos antigênicos (quatro 3-Ftx e uma PLA<sub>2</sub>) para um estudo de imunização por DNA, os quais foram reconhecidos pelo antiveneno comercial, revelando novas possibilidades para a produção de antiveneno (LEÃO, HO, & JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009).

Dal Belo e col (2005) caracterizaram e sequenciaram uma PLA<sub>2</sub> (MiDCA 1) de massa molecular 15,55 kDa, a partir da peçonha de *Micrurus d. carinicauda*. A peçonha foi purificada por RPC-HPLC, em diferentes condições, sendo resolvida em 22 frações.

O primeiro trabalho depurado de análise proteômica de peçonhas de *Micrurus* sp. foi desenvolvido em 2008, por Olamendi-Portugal e cols, com a peçonha de *M. surinamensis*. Para tal, foi utilizado fracionamento por RPC-HPLC. Para as análises qualitativas foram feitas eletroforese 2D-PAGE e espectrometria de massas por MALDI-TOF e ESI-IT. Nesse trabalho foram isoladas 15 frações, possuindo 47 massas moleculares diferentes, determinadas por ESI-IT e 81 massas determinadas por MALDI-TOF, sendo que 76 % compreendem toxinas entre 6-8 kDa, em que, a maioria é constituída por  $\alpha$ -NTXs. Nesse trabalho foram isoladas seis toxinas 3-Ftx (sendo Ms1 6553, Ms3 6938, Ms11 6671  $\alpha$ -NTXs de cadeia curta, e, Ms2 7299, Ms4 7303 e Ms5 7178, sendo  $\alpha$ -NTXs de cadeia longa). As toxinas foram caracterizadas, quanto à ação farmacológica, por ensaios eletrofisiológicos, em linhagem de miócitos, rhabdomyosarcoma TE671.

Nesse mesmo ano, foram isoladas frações de *Micrurus l. carvalhoi*, por um único passo cromatográfico em RPC-HPLC. As frações analisadas por ESI-MS: Mlx-8 (13,53 e 7,48 kDa), Mlx-9 (13,56 e 13,6 kDa), Mlx-11 (7,12; 7,19; 7,21 kDa) e Mlx-12 (22,3 e 22,37 kDa), foram utilizadas para ensaios *in vivo* no SNC, sendo determinada a presença de PLA<sub>2</sub> em duas delas (Mlx-8 e Mlx-9) (OLIVEIRA, et al., 2008).

Para a caracterização bioquímica da peçonha de *M. pyrrhocryptus*, a estratégia de purificação iniciou-se por cromatografia de exclusão molecular, seguida de RPC-HPLC. O perfil da exclusão molecular gerou 7 frações que foram analisadas por 2D-SDS-PAGE, na qual detectou-se a presença de dois grupos de toxinas um de 7 e outro de 14 kDa. As frações foram analisadas por ESI-TOF/MS mostrando a presença de quatro toxinas de 12-15 kDa; cinco toxinas 6-7 kDa; duas toxinas 7-8 kDa (DOKMETJIAN, , 2009).

Moreira e cols. (2010) isolaram as chamadas frontoxinas (I a VI) a partir da peçonha de *M. frontalis*, utilizando-se duas estratégias em RPC-HPLC. As frações de interesse foram recromatografadas por RPC-UFLC (Ultra Fast Protein Liquid Chromatography). Essas Frontoxinas (I a VI) apresentaram as seguintes massas moleculares: 7098,8; 7013,2; 7496,2; 7996,6; 7746,4; 7790,8, respectivamente, e sequências primárias dos N-terminais com domínios MIC; LIC; LTC e MTC. As toxinas II, III e IV inibiram os potenciais em miniatura da placa motora de rã (*Rana catesbeiana*) de modo concentração-dependente (0,5; 1; 2  $\mu$ M) efeito similar à D-tubocurarina.

A análise venômica da peçonha da *M. nigrocinctus*, após fracionamento por RPC-HPLC seguido por eletroforese SDS-PAGE, revelou a presença de 49 frações contendo toxinas proteicas, sendo 48 % de PLA<sub>2</sub>, 38 % de 3-Ftx, 4,3 % de metaloproteínas, 3,8 % de ohanatoxinas, 2,3 % de L-amino oxidases, 2,2 % de lectinas tipo C, 0,7 % de serinoproteínas e 0,5 % de nucleotidasas. Dentre a classe das toxinas 3-Ftx observou-se a presença majoritária de  $\alpha$ -NTXs e quatro toxinas muscarínicas (FERNÁNDEZ, et al., 2011).

Em outro trabalho, Salazar e cols. (2011) adotaram a metodologia de purificação por exclusão molecular para a peçonha de *Micrurus t. tener*, e relataram 16 frações, sendo que, F1-F5 apresentaram atividade anticoagulante e antiplaquetária. Os constituintes foram analisados por SDS-PAGE e a massa molecular das frações de interesse foi maior que 75 kDa, o que é pouco frequente em peçonhas de *Micrurus* sp.

Os proteomas das peçonhas de uma espécie de *M. mipartitus* de duas regiões diferentes da Costa Rica e da Colômbia foram obtidos após o fracionamento por RPC-HPLC. O perfil gerou 28 frações da espécime colombiana e 19 frações da costarriquenha, que foram analisadas por SDS-PAGE e MALDI-TOF-TOF/MS. Os componentes majoritários dessas peçonhas compreendem 3-Ftx e PLA<sub>2</sub>, contudo o perfil proteômico das duas serpentes, mesmo sendo essas da mesma espécie, mas de regiões diferentes, demonstrou diferenças em seus constituintes. A serpente costarriquenha apresentou 83 % de 3-Ftx, 8,2 % de PLA<sub>2</sub> e a presença de 0,3 % de AChE. Já a peçonha da serpente colombiana apresentou 61,1 % de 3-Ftx, 29 % de PLA<sub>2</sub> e a presença de inibidor do tipo kunitz (1,9 %) (REY-SUÁREZ, et al., 2011). Isso ratifica a possibilidade de determinada toxina aparecer em maior evidência, ou de não estar presente, quando se trabalha com um *pool* de peçonha de regiões distintas.

Resultados de um estudo proteômico com a peçonha de *M. altirostris* foram comparados com resultados de estudo de análise transcriptômica, partindo-se da glândula de veneno. A peçonha foi fracionada por RPC-HPLC, apresentando 31 frações, que foram analisadas por SDS-PAGE e espectrometria de massas ESI-TOF. Para o transcriptoma foi construída uma biblioteca de cDNA e foram geradas ESTs, organizadas em categorias, sendo 61 % das categorias referentes às toxinas. O perfil venômico revelou como componente majoritário as toxinas de 3-Ftx, por ambas as técnicas, sendo 79,5 % pela análise proteômica *versus* 86,4%, por transcriptoma. As PLA<sub>2</sub> ocuparam o segundo lugar, com 13,7 % (proteoma) contra 4,9 % (transcriptoma).

Outras classes protéicas foram encontradas na peçonha, além disso, muitas toxinas tiveram os seus N-terminais sequenciados (CORRÊA-NETO, et. al., 2011).

No trabalho de determinação do proteoma de quatro espécies de *Micrurus* sp. (*M. ibiboboca*, *M. spiixi*, *M. frontalis* e *M. lemniscatus*), publicado em 2011 por nosso grupo de pesquisa foi estabelecido o método de fracionamento dessas peçonhas em duas etapas cromatográficas por HPLC, sendo a primeira uma CIEX e a segunda RPC. Com essa metodologia obtivemos sucesso na separação de diversas classes de toxinas, dentre elas as 3-Ftx (6-8 kDa), em todas as espécies. Essas peçonhas foram analisadas por espectrometria de massas MALDI-TOF e ESI-Q-TOF, 2D-PAGE e *western blotting*, além da determinação de sequências parciais por Degradação de Edman e sequenciamento *de novo*, das diferentes toxinas. Os venoma das espécies mostraram diferenças nas frequências e diversidades dos constituintes proteicos e peptídicos (CISCOTTO, et al., 2011). Essa metodologia já havia sido utilizada para isolar uma toxina 3-Ftx, a Mic6c7NTX (MM= 7.043 Da) da peçonha da *M. ibiboboca*, com atividade sobre os canais  $Na_v$  de neurônios do sistema nervoso periférico (DONATO, 2008).

Em recente trabalho, Margres e col. (2013) apresentaram o transcriptoma da glândula de peçonha da serpente *M. fulvius*. Foram identificadas 1.950 moléculas não-tóxicas e apenas 116 toxinas. As PLA<sub>2</sub> foram os componentes majoritários, seguido das 3-Ftx, somando-se 86 % dos componentes da peçonha. Entretanto, os componentes não-tóxicos, revelaram o alto grau de complexidade dessa peçonha, associado aos eventos evolutivos intragenômicos.

Uma  $\alpha$ -NTX, MlatA1 (MM= 6673 Da), contendo 61 resíduos de aminoácidos foi obtida de *M. laticollaris* e N-terminal apresentando a sequência RYC. Essa toxina foi clonada e expressa em organismo heterólogo (CABAJAL-SAUCEDO, et al., 2013).

Comparando-se os trabalhos citados acima com o estudo apresentado no presente trabalho, percebe-se que, a primeira estratégia de fracionamento escolhida nesse trabalho (figura 23) compreendeu apenas uma etapa cromatográfica por RPC-HPLC, similar ao proposto por Bougis & Marchot (1986). No presente trabalho, utilizou-se uma coluna semi-preparativa C18, possibilitando-se a injeção de uma concentração maior da PB (10 mg de peso seco – 5 mg/ml) e conseqüentemente, um rendimento maior de proteínas. O eluente escolhido para a fase móvel e o monitoramento, a 214 e 280 nm, está de acordo com Rosso e cols. (1996). Moreira e



col. (2010) também fez uso de uma coluna semipreparativa, C4, em HPLC, porém uma segunda etapa cromatográfica foi adotada, em UFLC, com coluna analítica C18.

A segunda estratégia de fracionamento (figuras 27 e 28), uma CIEX seguida por RPC assemelha-se ao proposto por Alape-Girón e col. (1996), contudo, as colunas analíticas utilizadas foram diferentes. Essa estratégia cromatográfica já havia sido adotada com sucesso (CISCOTTO et al., 2011; DONATO, 2008), tanto para a análise venômica, quanto para a obtenção de uma toxina 3-Ftx com elevado grau de pureza. O perfil de massas moleculares obtido pelo fracionamento da peçonha de *M. lemniscatus* (tabela 5) aponta uma grande diversidade de toxinas em cada fração, sendo essas na sua maioria de 6-8 kDa. A figura 24 mostra a distribuição de proteínas obtidas na primeira estratégia cromatográfica, em que é demonstrada a eluição das toxinas 3-Ftx em dois grupos principais, eluídos em uma faixa de ACN de 19-30% e outro de 32-42%. Os dados mostram que há um predomínio das massas moleculares de 6 a 8 kDa, que são provavelmente referente às toxinas 3-Ftx, que se apresentam com carácter de hidrofobicidade dividido-as em dois grupos: toxinas que eluem com 20-30 %; e entre 30-40 % de solvente orgânico. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Ciscotto, et. al., (2011). Adicionalmente, a figura 25 revela que a diversidade dos constituintes dessa peçonha se encontra, majoritariamente, entre as toxinas de 6-8 kDa (75 %) e em segundo lugar, as de 12-14 kDa (8 %). Comparando essa estratégia com a adotada por nosso grupo (Ciscotto et. al., 2011), pode-se observar que a estratégia de uso de cromatografia CIEX seguida por RPC gera um perfil da peçonha no qual não estão presentes algumas das toxinas 3-Ftx, entretanto, toxinas com massa molecular entre 20-30 kDa e entre 40-45 kDa passam a compor o perfil. Esse perfil não se reproduz quando a peçonha é submetida inicialmente a uma cromatografia de fase reversa. Sugere-se que isso tenha ocorrido pelo fato dessas moléculas não terem sido detectadas pelo MALDI ou ainda que as proteínas maiores foram eluídas junto com a fração que não interagiu com a resina da coluna. Um outro fator que pode ser levado em consideração é que o *pool* de peçonha utilizado no trabalho publicado em 2011 não foi o mesmo do utilizado nesse trabalho, o que de fato pode trazer variações dos constituintes, de acordo com o que já foi discutido anteriormente (URDANETA et al., 2004; DA SILVA JR, 2001; DA SILVA JR, GRIFFIN, & AIRD, 1991).

Todavia, de acordo com Ciscotto e col., (2011), na peçonha de *M. lemniscatus* há presença de toxinas de massa molecular acima de 16 kDa, que não foram observadas por espectrometria de massas, logo optou-se em fazer um gel para verificar se essas

proteínas seriam localizadas. No gel foram localizadas as proteínas de alta massa formando bandas com o peso molecular do padrão na faixa dos 15 kD, entre 50-60 kDa; entre 80-90 kDa; além de proteínas na faixa dos 220 kDa (figura 26).

Nosso grupo de pesquisa vem obtendo *know-how* na purificação de moléculas de diferentes tipos de peçonhas e venenos, incluindo as de *Micrurus* sp., utilizando cromatografia de troca iônica em uma das etapas cromatográficas (CISCOTTO, et al., 2011; DONATO, 2008; RATES, et. al., 2007). A escolha do método cromatográfico está atrelada ao conhecimento prévio da composição bioquímica da peçonha para que sejam feitas escolhas adequadas do pH do tampão, trocador iônico (utilizados na fase móvel) e resina (fase estacionária), que são de fundamental importância para o sucesso de separação (SPADARO, 1997). Contudo, apesar da alta eficiência desse método, na maior parte das cromatografias, obteve-se êxito parcial na separação da toxina de interesse MI7294\_NTX.

No presente trabalho, a partir da estratégia de fracionamento adotada, foram obtidas diversas toxinas de 3-Ftx puras, e cinco com massas moleculares entre 6-8 kDa, tiveram o seu N-terminal sequenciado (tabela 6). Ademais, baseando-se no estudo de Perkins & Tomer (1995), o primeiro a analisar por espectrometria de massas MALDI-TOF-MS a peçonha de *Micrurus* sp., nesse trabalho foram feitas análises utilizando essa ferramenta, que mostrou-se adequada para a determinação das massas moleculares das frações isoladas (tabela 5).

Duas outras estratégias de fracionamento foram adotadas na tentativa de se obter um maior rendimento das toxinas puras. A terceira estratégia, envolvendo uma CIEEX, seguida de RPC I (coluna analítica Source 5 4.6 150), seguida de uma RPC II (coluna analítica Pepmap C18), mostrou-se satisfatória para a obtenção de algumas toxinas 3-Ftx puras (dados não mostrados), contudo o rendimento proteico permitiu apenas a análise por espectrometria de massas, sendo necessárias incontáveis repetições para viabilizar os estudos farmacológicos.

Na quarta estratégia, com base em outros trabalhos de fracionamento, optou-se em realizar uma RPC seguida de AIEEX. Em um trabalho realizado por Francis e cols (1997) usou-se cromatografia de troca aniônica na qual os constituintes da peçonha de *M. frontalis* foram fracionados com êxito. De modo similar foi realizada essa estratégia no presente trabalho, entretanto a fração 22, obtida na estratégia 1, não pode ser resolvida uma vez que não houve uma boa separação dos seus constituintes por esse método (dados não apresentados).

Em geral, os trabalhos mais atuais de venoma de serpentes *Micrurus* sp. (FERNÁNDEZ et al., 2011; REY-SUÁREZ et al., 2011; CISCOTTO et al., 2011; MOREIRA et al., 2010; OLAMENDI-PORTUGAL et al., 2008) fizeram suas análises de massas por MALDI-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization*), uma vez que esta técnica é rápida e eficiente na detecção das massas moleculares de peptídeos e proteínas. Além desses, trabalhos anteriores de proteômica do nosso grupo, com peçonhas de escorpião dentre outras, demonstram o sucesso do uso dessa técnica na caracterização dessas peçonhas (PIMENTA et al., 2003; 2001).

Em relação a outras técnicas de análises de massas por ionização, o MALDI apresenta vantagens por tolerar concentrações moderadas de sais, apresentar diretamente a massa molecular, além de detectar amostras em concentrações mínimas (pmol e fmol) (GLISH et al., 2003; GEVAERT et al., 2000). No presente trabalho, foram utilizadas duas matrizes para as análises, a  $\alpha$ -ciano e super DHB. A primeira mostrou-se mais eficiente para a detecção de massas entre 5-12 kDa, fracionadas da peçonha de *Micrurus l. lemniscatus*, e a segunda, quando os constituintes proteicos eram glicosilados (RATES, 2011). Dos trabalhos citados acima, alguns fizeram uso da matriz  $\alpha$ -ciano para as análises de massas.

A escolha do fracionamento da peçonha de outras *Micrurus* sp. em um único passo cromatográfico, por RPC, também foi adotada em outros trabalhos, tais como o que utilizou a peçonha de *M. nigrocinctus* (FERNÁNDEZ et al., 2011), *M. altirostris* (CORRÊA-NETO et al., 2011), *M. dumerilii carinicauda* (DAL BELO et al., 2005), *M. mipartitus* (REY-SUÁREZ et al., 2011), *Micrurus l. carvalhoi* (OLIVEIRA et al., 2008) e os de Rosso et al, 1996 e Bougis & Marchot, 1986. No presente trabalho, utilizou-se uma coluna semipreparativa C18, o que possibilitou a aplicação de 10 a 12 mg de peçonha, o que garantiu um bom rendimento proteico das frações, permitindo a realização dos ensaios farmacológicos, além de uma maior resolução na separação dos componentes proteicos e peptídicos, uma vez que o aumento do número de braços de carbono na matriz da coluna facilita a separação de moléculas de baixo peso molecular (GUIMARÃES & COLLINS, 1997).

Na segunda estratégia cromatográfica, representada na figura 27, também adotada no trabalho publicado em 2011, a peçonha bruta apresentou um perfil contendo dezessete frações. Em cada cromatografia foram utilizados 2 mg da PB, totalizando-se 20 cromatografias (40 mg de PB), monitoradas a 214 nm para não negligenciar moléculas peptídicas, e a 280 nm, possibilitando-se a detecção de moléculas que

continham aminoácidos com anéis aromáticos (RATES, 2011; RATES et al., 2007; DA SILVA JR e AIRD, 1991) ). Cada fração de interesse foi submetida à segunda dimensão por RPC, que mostrou ser o método mais eficiente para a obtenção de moléculas purificadas do 3-Ftx da peçonha de *M. lemniscatus* (CISCOTTO et al., 2011). O número de moléculas com elevado grau de pureza resultante dessa estratégia cromatográfica foi surpreendente, porém, com baixo rendimento protéico, sendo então fator limitante para a caracterização farmacológica desses componentes isolados.

Por esse motivo, optou-se em trabalhar com frações semipurificadas para a quase totalidade desse projeto. As toxinas com maior grau de pureza foram utilizadas para a confirmação das atividades farmacológicas. Além do mais, é preciso considerar que muitos efeitos biológicos induzidos por peçonhas, podem resultar do efeito sinérgico entre alguns de seus componentes. Neste sentido é desejável começar a investigação do efeito farmacológico com a peçonha bruta, e em seguida avaliar o efeito de seus componentes purificados e se possível, concluir os estudos com as moléculas puras.

As peçonhas das serpentes são misturas complexas de proteínas e polipeptídeos, muitos deles farmacologicamente ativos, que podem provocar alterações específicas nos mecanismos fisiofarmacológicos de suas presas (URDANETA et al., 2004). Os componentes majoritários são tipicamente polipeptídeos e proteínas de baixas massas moleculares, ricos em cisteína e com alvos moleculares específicos, correspondendo a 90-95% do peso seco da peçonha bruta (St PIERRE et al., 2005).

Analisando-se os perfis cromatográficos *versus* a distribuição dos componentes presentes nas peçonhas de diferentes *Micrurus* sp, observou-se que, na peçonha de *M. nigrocinctus* (FERNÁNDEZ et al. , 2011), o componente majoritário compreende as PLA<sub>2</sub> (48 %), seguido das 3-Ftx (38 %). Apareceram também nessa peçonha constituintes de 11 e 14 kDa (3,8 %), que foram parcialmente sequenciados e apresentaram similaridade com as ohanatoxinas (PUNG et al., 2006). No presente trabalho, toxinas entre 11-12 kDa (2,5 %) apareceram no venoma da *Micrurus l. lemniscatus*. Esta classe de toxinas aparece também na peçonha de *M. mipartitus* (Costa Rica) (REY-SUÁREZ et al. , 2011). Ainda relacionado ao trabalho de Fernández e cols. (2011), os espectros de massas mostraram um grande número de toxinas 3-Ftx que eluem juntas em uma dada fração, fato observado também no presente trabalho (dado não mostrado).

As proteínas de alta massa molecular (40-70 kDa), correspondendo às L-amino oxidases, nucleotidasas e metaloproteinases, que compõem a diversidade do venoma, por exemplo, de *M. nigrocinctus* (FERNÁNDEZ et al., 2011) que não haviam sido detectadas por espectrometria de massas (MALDI-TOF; ESI-Q-TOF) no presente trabalho. Logo, como haviam sido observadas anteriormente (CISCOTTO et al., 2011), resolveu-se investigar a possível presença dessas moléculas por técnicas de SDS-PAGE. As análises do gel apresentado na figura 26 mostra a presença de componentes entre 50-60; 70-80 kDa. No trabalho realizado por Oliveira e col. (2008), que envolveu o fracionamento da peçonha de *M. lemniscatus* em etapa única de RPC, no qual foram isoladas 19 frações, também não foi mencionada a presença de toxinas de alta massa molecular.

No trabalho de Leão e col. (2009) obteve-se o transcriptoma de *M. corallinus*, e as enzimas LAO aparecem com massa molecular de 58 kDa. Já o perfil proteômico de *M. mipartitus* colombiana (REY-SUÁREZ et al., 2011), revelou, por SDS-PAGE, uma toxina de 68 kDa, que apresentou similaridade com metaloproteinases, e outra com 53 kDa, referente a uma LAO. No mesmo trabalho, na peçonha de *M. mipartitus* costarriquenha aparece uma metaloproteinase com 60 kDa, e uma LAO com 48 kDa.

Após a realização de várias estratégias de purificação de toxinas nesse trabalho, obtiveram-se as toxinas 3-Ftx puras com massas moleculares 7.256 Da e 7.294 Da, que foram utilizadas nos ensaios de liberação de L-Glu. Estas toxinas foram eluídas, em primeiro momento, na fração 7 da CIEEX, com 0,6 M de NaCl e em seguida, com 30 e 50% de ACN/TFA 0,1%, respectivamente (figuras 27 e 28). Essas toxinas, juntamente com a toxina de massa molecular 7.119 Da, compunham a fração 22 (figura 23) resultante da cromatografia de RPC (estratégia 1), eluída com 31,3% de ACN/TFA 0,1%. Esta eluição em baixa porcentagem de solvente orgânico indica uma alta polaridade e baixa hidrofobicidade das moléculas, o que está de acordo com ROSSO (1996), que propõe que  $\alpha$ -NTXs eluem no início do gradiente de ACN.

Nos diversos trabalhos envolvendo peçonhas de diferentes espécies de serpentes elapídicas foram caracterizados vários subtipos de toxinas da família 3-Ftx. As peçonhas elapídicas dos gêneros *Naja* sp. (AFIFIYAN et al., 1999) e *Hemachatus* sp. apresentam toxinas 3-Ftx do tipo neurotoxinas e cardiotoxinas, com massas moleculares entre 6-9 kDa (BOUGIS et al., 1986). As peçonhas das serpentes elapídicas australianas *Oxyuranus* sp. e *Pseudonaja* sp. (St PIERRE et al., 2005; ZAMUDIO et al., 1996), de *Acanthophis* sp. (HODGSON & WICKJRAMARATNA, 2006) apresentam  $\alpha$ -NTXs de

cadeias curta e longa com massas entre 6-8 kDa. Os diversos trabalhos de caracterização bioquímica dos componentes polipeptídicos de *Micrurus* sp., também mostram a presença das  $\alpha$ -NTXs de cadeia curta, com massas moleculares entre 6-7 kDa e, com 7-8 kDa as  $\alpha$ -NTXs de cadeia longa (FERNÁNDEZ et al., 2011; REY-SUÁREZ et al., 2011; CORRÊA-NETO et al., 2011; CISCOTTO et al., 2011; MOREIRA et al., 2010; DOKMETJIAN et al., 2009; LEÃO et al., 2009; OLAMENDI-PORTUGAL et al., 2008; DONATO, 2008; OLIVEIRA et al., 2000; ALAPE-GIRÓN et al., 1996; PERKINS et al., 1995).

As toxinas em estudo nesse trabalho, MI7294\_NTX e MI7256\_NTX, foram nomeadas de acordo com a espécie, MI= *Micrurus lemniscatus*, seguida da massa molecular e do grupo de toxinas que compõem, NTX = neurotoxina. Outras nomenclaturas para as toxinas presentes nas diferentes peçonhas são descritas, como a adotada por Olamendi-Portugal e col. (2008), que denominou as toxinas 3-Ftx isoladas da serpente *M. surinamensis* de Ms1, Ms2, Ms3, Ms4, Ms5 e Ms11, todas com atividades pós-sinápticas. Outro exemplo é visto no trabalho de Moreira e col. (2010), que denominou as toxinas de “Frontoxinas”, pois essas derivaram da peçonhas de *M. frontalis*. As toxinas isoladas no presente trabalho apresentaram atividade pré-sináptica, sendo as primeiras toxinas 3-Ftx com atividade pré-sináptica descritas até o presente. Portanto, este fato talvez possa também ser considerado numa possível padronização da nomenclatura destas toxinas. Uma padronização na nomenclatura das toxinas 3-Ftx oriundas de peçonhas de serpentes seria fundamental para evitar-se confusões na literatura

Através do sequenciamento por degradação de Edman, foram obtidas sequências parciais dos N-terminais de algumas das toxinas isoladas de *M. lemniscatus* (tabela 7): MI6435 (30 resíduos de aa), MI6504 (41 resíduos de aa), MI6681 (21 resíduos de aa), MI7527 (51 resíduos de aa) e uma das toxinas de interesse, a MI7294\_NTX (30 resíduos de aa). Pela sequência observada para o N-terminal da MI7294\_NTX verifica-se que há uma predominância de aminoácidos com cadeia lateral alifática (13 resíduos): 1-2-5-9-10-18-21-26-27-29; 7 resíduos de aminoácidos com enxofre: 3-7-8-12-14-16-22; 4 resíduos de aminoácidos com cadeia lateral com grupamento hidroxila: 4-6-13-25; 4 resíduos de aminoácidos ácidos: 17-19-20-23; 3 resíduos de aminoácidos com anéis aromáticos: 4, 24,30; 1 resíduo de aminoácido básico: 11. A sequência total desta toxina não foi obtida até o momento devido a limitação de material. Novas purificações estão em andamento para a conclusão da referida sequência.

É sabido que toxinas 3-Ftx elapídicas, dentro do grupo das neurotoxinas, podem ser classificadas como  $\alpha$ -NTx de cadeia curta, com 60 a 62 resíduos de aminoácidos sendo oito de cisteína formando quatro pontes dissulfeto, ou de cadeia longa, com 66-79 resíduos de aminoácidos sendo dez de cisteína, formando cinco pontes dissulfeto (BARBER et al., 2013; St PIERRE et al., 2005). A toxina MI7294\_NTX apresentou cinco resíduos de cisteína no N-terminal e, portanto, é possível que essa componha um arranjo molecular com pontes dissulfeto similar às toxinas de cadeia longa.

Associando estrutura e função, um trabalho de revisão escrito por Mouhat et al., (2004), classifica estruturalmente a arquitetura das toxinas em três modelos: ICK ( $\beta\beta$  ou  $\beta\beta\beta$ ) e três-dedos ( $\beta_1\beta_1\beta_2\beta_2\beta_2$ ) e padrão  $\alpha/\beta$  ( $\beta_1\alpha\alpha\beta_2\beta_1\beta_1\beta_2\alpha\beta_1\beta_1$ ). As primeiras arquiteturas são encontradas em toxinas que agem em canais  $Na_v$ , as do tipo  $\beta\beta\beta$  estão presentes em algumas toxinas que agem em diferentes canais  $Na_v$  e  $K_v$ . O segundo tipo é encontrado apenas em toxinas da peçonha de serpentes Elapidae e Hydrophidae (cobras, mambas, kraits e serpentes marinhas). Assim, toxinas de 3-Ftx exibem três giros  $\beta$ -ancorados ( $\beta$ -stranded) que se estendem de um núcleo central contendo as quatro pontes dissulfeto conservadas, e essa aparência estrutural é o que nomeia o grupo. O número de toxinas que apresentam a estrutura de dobramento três-dígitos é ilimitado nas serpentes Elapidae e Hydrophidae (KINI, 2002).

As toxinas obtidas no presente trabalho tiveram suas sequências parciais alinhadas pelo programa BLASTP 2.2.29+, utilizando-se a ferramenta DELTA-BLAST, em banco de dados de proteínas Swiss-Prot (<[www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)>). Todas as sequências obtidas até o momento apresentaram homologia com sequências depositadas de toxinas elapídicas do tipo 3-Ftx (tabelas 6 e 7).

A toxina MI6435 apresentou 62% de identidade e 70 % de similaridade com a Ms11 (MM= 6.671,0) de *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal et al. 2008), identificada como uma  $\alpha$ -NTX de cadeia curta. Nos ensaios de toxicidade, Ms11 não se mostrou tóxica quando injetada em camundongo (5  $\mu$ g/g) ou peixe (1  $\mu$ g/g). Entretanto, em ensaios eletrofisiológicos de *whole cell patch clamp*, em linhagem de miócitos (rabdiosarcoma TE671), a toxina promoveu forte bloqueio da corrente para sódio nos nAChR, o que mostra o clássico efeito de uma  $\alpha$ -NTX.

A toxina MI6504 mostrou 57 % de identidade e 73 % de similaridade com a mipartoxina-1 (MM= 7.030 Da), de *M. Mipartitus*, que é uma toxina 3-Ftx de cadeia curta, do tipo I, sendo o componente mais abundante dessa peçonha, correspondendo a 28 %. Toxicologicamente, mipartoxina-1 apresentou efeito letal potente quando injetada

(i.p.) em camundongo (0,06 µg/g). Além disso, a toxina promoveu um bloqueio pós-sináptico dos nAChR na junção neuromuscular de camundongo e de pintainho (REY-SUÁREZ et al., 2012).

Já a MI6681 mostrou-se homóloga ao precursor da toxina muscarínica MTx38 da serpente *Ophiophagus hannah*, com 67 % de identidade e 100 % de similaridade, assim como 71 % de identidade e 100 % de similaridade com os precursores das Erabutoxinas “a”, “b” e “c” isoladas da serpente australiana marinha *Laticauda semifasciata*. Essas toxinas possuem entre 61 e 62 resíduos de aminoácidos, com massas moleculares em torno de 7 kDa e diferem apenas por um resíduo de aminoácido. As erabutoxinas “a” e “b” são os maiores constituintes da peçonha e apresentaram uma DL<sub>50</sub>= 0,15 µg/g em camundongo, contra DL<sub>50</sub>= 0,07 µg/g em ratos. Essas toxinas bloquearam os receptores da junção neuromuscular de anfíbios (TAMIYA & ARAI, 1966). Já a Erabutoxina “c” apresentou uma DL<sub>50</sub>= 0,13 µg/g em camundongo (i.m.), e na junção neuromuscular de anfíbio, inibiu a contração muscular evocada pela ACh, mas não a evocada pelo KCl (TAMIYA & ABE, 1972).

A toxina MI7527 também apresentou homologia com a Erabutoxina “c”, porém com baixa homologia, se comparada à toxina anterior, com 36 % de identidade e 98 % de similaridade.

Finalmente, a toxina de maior interesse desse trabalho, MI7294\_NTX (tabela 7) apresentou homologia principalmente com outras de 3-Ftx de *Micrurus* sp., ou seja, com o precursor da toxina MALT0063C (F5CPE2.1) de *M. Altirostris* (79% de identidade e 93 % de similaridade); com o precursor 3-Ftx1(C6JUP1.1) de *M. corallinus* (56% de identidade e 96 % de similaridade) e com a Mipartoxin-1 (B3EWF8.1), de *M. mipartitus* (63% de identidade e 90 % de similaridade). Corrêa-Neto e col. (2011) caracterizaram a toxina MALT0063C e o precursor de 3-Ftx1 (C6JUP1), isoladas de *Micrurus altirostris*. A toxina MALT0063 foi isolada da fração 11 e apresenta MM= 6819,6, com a seguinte sequência N-terminal parcial, determinada por degradação de Edman: LICYVSKEGAKMTCP. A toxina 3-Ftx1 com massa molecular próxima a 9 kDa, teve a seguinte sequência parcial, determinada por MS/MS: FYFSYQCTSK. Nenhuma dessas toxinas foi caracterizada farmacologicamente.

Estes resultados de homologia mostram a grande conservação estrutural dessa família de 3-Ftx. Os resultados de homologia sugerem que as toxinas MI6435, MI6504, MI6681 possam ser potenciais bloqueadores dos nAChR da junção neuromuscular de mamíferos e anfíbios. Caso sejam ativas nesses receptores, essas toxinas poderiam



também ser utilizadas como ferramentas farmacológicas em estudos para a elucidação de doenças neuromusculares como a Miastenia gravis e a Síndrome miastênica congênita. Entretanto, a possível ação destas toxinas nos receptores nAChR deverá ser confirmada.

As moléculas isoladas das peçonhas de *Micrurus* sp são pouco caracterizadas do ponto de vista farmacológico e bioquímico, ressalta-se que muito há para se explorar do ponto de vista da bioprospecção de moléculas de origem animal, com altos potenciais para utilização como modelos de drogas na terapêutica. É importante também, considerar a importância dessa caracterização para assegurar um melhor tratamento da patogenicidade promovida pelo envenenamento ocasionado por estas serpentes.

## 5.2 ESTUDOS DE NEUROTOXICIDADE E EXCITOTOXICIDADE PROMOVIDOS PELA PEÇONHA BRUTA, FRAÇÕES E TOXINAS MI7294\_NTX e MI7252\_NTX

Ensaio de toxicidade em modelos *in vitro* apresentaram um grande avanço para a investigação toxicológica, fornecendo ferramentas avançadas e com variáveis mais controladas, protocolos confiáveis, informações sobre mecanismos de ação. Esses avanços têm sido possíveis devido a diferentes abordagens com o objetivo de aprimorar os testes químicos e validar os procedimentos e explorar as bases celular e molecular da toxicidade (ZUCCO et al., 2004).

O uso de cultivo celular em ensaios biológicos pré-clínicos *in vitro* apresentam vantagens, tais como, o controle físico-químico de pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, além das condições fisiológicas que podem ser mantidas relativamente constantes (FRESHNEY, 1994). Em linhagens, a cada replicação celular as amostras serão idênticas e as características da linhagem irão se perpetuar por manter a homogeneidade dessas amostras. Adicionalmente, a cultura de células de linhagem é menos dispendiosa do que culturas primárias e testes *in vivo*, além de reduzir o uso de animais, evitando-se questões éticas e morais (FRESHNEY, 1994; CHU, 1995).

As células Neuro-2A constituem um exemplo de modelo de estudo e podem ser utilizadas para a investigação de atividades farmacológicas associadas à neurotoxicidade e neuroproteção. Inclusive, podem ser alvos de estudos de vias de sinalização envolvidas em patologias neurodegenerativas (LEDREUX, KRYS, & BERNARD, 2009).

A atividade neuroprotetora de quatro compostos isolados da alga vermelha *Galaxaura marginata* (Ellis & Solander) foi avaliada nas células Neuro-2A, que revelou, sobre condições oxidativas basais, que as substâncias alteraram as concentrações intracelulares de glutamato, glutamina e alanina, sem alterar o equilíbrio oxidativo das células. Além disso, avaliando-se a atividade mitocondrial das células Neuro-2A ( $10 \times 10^3$  células/poço) pelo método de MTT, esses compostos da alga vermelha produziram uma atividade bifásica no metabolismo mitocondrial, inibindo em baixas concentrações ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ) e estimulando em altas concentrações ( $10 \mu\text{g/ml}$ ), a viabilidade celular, avaliada pela formação de cristais de formazan (ROZAS, 2008). Esse estudo mostrou que essas células funcionam para testes de citotoxicidade/neuroproteção de novos biocompostos, dispondo da maquinaria celular adequada.

Ensaio de toxicidade celulares vêm sendo desenvolvidos para a investigação de atividades citotóxicas e neuroprotetoras de toxinas animais (DANTAS, 2013; MÉNDES, 2011; YAN, et al., 2007). Com base nesses trabalhos, inicialmente optou-se em usar a linhagem Neuro-2A para a investigação da atividade citotóxica da PB em diferentes concentrações ( $5 \times 10^{-5}$  –  $1 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ ). A densidade celular utilizada foi de  $5 \times 10^3$  células/poço, similar ao utilizado por ROZAS (2008). O ensaio com a PB (figura 29) mostrou que há, provavelmente, duas regiões de toxicidade dessa peçonha sendo uma, com toxicidade máxima por volta de 40%, nas concentrações entre  $5 \times 10^{-4}$  e  $25 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$  e outra em torno de 80%, nas concentrações mais altas ( $0,025 \times 10^3$  a  $0,25 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ ). Nas concentrações maiores houve quase que 100% de morte celular, similar à observada pelo KCl 3 M (controle positivo de morte). Considerando-se o efeito da PB como um todo, pode-se afirmar que esta apresenta toxicidade de modo concentração-dependente, apresentando  $IC_{50}$  por volta de  $15 \times 10^{-1}$  e  $50 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ , para cada região. Portanto, a concentração de escolha para os ensaios de toxicidade com uso de bloqueadores farmacológicos foi próxima à  $IC_{50}$  ( $50 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$  ou  $5 \mu\text{g/ml}$ ).

Méndez e col. (2011) fizeram uso de uma linhagem celular C2C12 (ATCC CRL-1772), de células miogênicas de camundongos contra diferentes peçonhas de serpentes elapídicas africanas do gênero *Naja* sp., e mostraram que a peçonha dessas serpentes apresentaram citotoxicidade a partir da concentração de  $20 \mu\text{g/ml}$ . Comparando-se estes dados com aqueles obtidos com a peçonha da *M. lemniscatus* (elapídica americana) pode-se verificar que esta última parece apresentar maior citotoxicidade em relação às peçonhas das serpentes *Naja* sp. (elapídicas africanas). É provável que as

variações nos perfis de toxicidade das peçonhas sejam pelas diferenças na composição relativa dos seus componentes. Por exemplo, a peçonha da *M. lemniscatus* apresenta uma proporção maior de toxinas 3-Ftx (75%), quando comparada às peçonhas das serpentes *Naja* sp. (cerca de 50%). É necessário enfatizar que, apesar de estar sendo sugerido que a peçonha de *M. lemniscatus* possa apresentar maior potencial citotóxico, as linhagens celulares utilizadas nos ensaios com as respectivas peçonhas são diferentes, o que inviabiliza uma comparação fidedigna.

Confirmado o efeito citotóxico em linhagem neuronal, a próxima etapa foi realizar a triagem das frações semipurificadas da peçonha da *M. lemniscatus* pela estratégia 1 de fracionamento (figura 23), nestas células. Todas as frações foram testadas na mesma concentração da PB ( $50 \times 10^{-1}$  µg/ml ou 5 µg/ml) e a maioria causou redução da viabilidade celular (figura 30A-D). As frações F1 a F8 (figura 30-A) apresentaram toxicidade por volta de 40 a 60 %, enquanto que, para as frações de F9 a F21 (figura 30-A; B) a toxicidade foi acima de 60 %, algumas chegando a quase 100 %. Um outro grupo de toxinas, entre F22 a F28 apresentou toxicidade por volta de 40 a 60 % (Figura 30-C). Já as últimas frações eluídas com maior concentração do solvente orgânico demonstraram toxicidade abaixo de 40 % (figura 30-D).

Observando-se a figura 31-A, percebe-se nitidamente que há uma região do perfil obtido da peçonha fracionada, com características capazes de promover a morte celular nesta linhagem de neuroblastoma. Em relação às propriedades físico-químicas inerentes a esta região da peçonha, pode-se dizer que as moléculas apresentam hidrofobicidade moderada, uma vez que são eluídas com 23 a 29 % de ACN. Essa região contém toxinas abundantes, principalmente com massas moleculares entre 6-7 kDa (tabela 5), oriundas de RPC. Vários pesquisadores observaram que as peçonhas elapídicas, entre elas as de *Micrurus* sp., possuem toxinas com 60 a 65 resíduos de aminoácidos do tipo 3-Ftx (KINI & DOLEY, 2010; 2002), com suas massas representadas na figura 31-B. Dessa classe de 3-Ftx, nesta faixa de massas moleculares, podem ser citadas as  $\alpha$ -NTX de cadeia curta (BARBER, ISBISTER, & HODGSON, 2013) e as cardiotoxinas e citotoxinas (TSETLIN, 1999). As frações do presente estudo apresentam como constituintes protéicos apenas 3-Ftx (6-8 kDa). Já uma segunda região contendo toxinas com menor toxicidade (F29 a F42), compreende uma faixa de eluição com maior concentração de ACN, por volta de 35 a 52 %, em que aparecem em alta frequência as toxinas de 7 a 8 kDa e as toxinas acima de 12 kDa (tabela 5). Correlacionando-se a morte celular promovida pela PB, referente às duas regiões

distintas de toxicidade e as suas respectivas frações, é provável que as toxinas de maior citotoxicidade representem aquelas que saem com menor porcentagem de ACN, sendo as 3-Ftx, ao passo que, as toxinas com menor toxicidade sejam representadas pelas PLA<sub>2</sub> ou toxinas 3-Ftx do tipo  $\alpha$ -NTX de cadeia longa ou MT toxinas.

Os envenenamentos por serpentes Elapidae compreendem uma verdadeira emergência médica devido à progressão rápida da Síndrome da Cobra (CHIPPAUX, 2007). Esta síndrome caracteriza-se, principalmente, por estresse respiratório, formigamento na região da picada, às vezes anestesia local que se estende por todo o membro afetado. Sinais não específicos como: angústia, náusea, vômitos, dor epigástrica, cefaléia, sede, convulsão e perda da consciência são também relatados (LARRÉCHÉ et al., 2008). As serpentes brasileiras do gênero *Micrurus* (serpentes corais, família Elapidae) provocam envenenamentos severos em humanos, caracterizado por uma neurotoxicidade de rápida evolução, que pode ser fatal (OLIVEIRA et al., 2008).

É sabido que, os sintomas clínicos associados ao SNP, como a paralisia motora e insuficiência respiratória, ocorrem devido ao bloqueio dos nAChR, presentes na placa motora (VITAL BRAZIL, 1987). Entretanto as causas das perturbações fisiológicas no SNC ainda não foram esclarecidas.

O hipocampo é a região mais utilizada para estudos das alterações morfofisiológicas do SNC, como na isquemia. Essa região apresenta um arranjo neuronal relativamente simples, quando comparado às outras regiões encefálicas (BROAD, 1984 *apud* PAGNUSSAT, 2005).

Logo, para a investigação do efeito citotóxico promovido pela PB e frações da *M. lemniscatus*, utilizou-se cultura primária de neurônios hipocampais de ratos neonatos até cinco dias de nascidos. Esta cultura apresentou majoritariamente neurônios piramidais (regiões CA1 e CA3), com distintos dendritos apicais, alguns dendritos basais e um único axônio (BANKER, 1977).

A figura 32 mostra os ensaios crônico 24 h (figura 32-C) e agudos de 1 (figura 32-A) e 3 horas (figura 32-B) com neurônios hipocampais no 7º dia de cultura, incubados com a PB, o que permitiu fazer uma análise da viabilidade celular em diferentes tempos e concentrações da peçonha. O tempo de 1 hora de exposição à PB só apresentou toxicidade na concentração mais alta, enquanto que os tempos de 3 e 24 h reduziram a viabilidade celular dos neurônios hipocampais a partir das concentrações menores, em torno de 40 %. Na concentração mais alta, no tempo de 24 h, houve uma

redução da viabilidade celular de 60 %. Quando comparadas as diferenças de toxicidade entre os três tempos (figura 33), verifica-se que, de 1 e 3 horas houve diferença estatística em todas as concentrações, salvo na concentração mais alta, enquanto que, entre os tempos de 3 e 24 horas não houve diferença. Entretanto, não se pode comparar os dados *in vitro* com os *in vivo*, considerando-se que ação da peçonha *in vivo* é bem mais complexa, e deve-se ainda levar em conta a travessia da barreira hematoencefálica.

Em teste de citotoxicidade realizado com neurônios hipocâmpais de embrião de ratos em cultura ( $3,5 \times 10^4$  células /poço), expostos à  $\beta$ -bungarotoxina, uma PLA2 isolada da serpente *Bungarus multicinctus*, verificou-se morte celular de modo dose-dependente ( $10^{-17}$  a  $10^{-9}$  M), utilizando-se os ensaios de liberação de LDH e MTT, e KCl (250 mM) como controle. Mostrou-se também, que a morte celular estava relacionada ao aumento de  $Ca^{2+}$  e à formação de ROS de modo tempo-dependente. Verificou-se ainda que, essa morte celular é dependente de cálcio intra e extracelular, e, por meio da técnica de TUNEL mostrou ser um evento apoptótico (SHAKHMAN et al., 2003).

A maior parte dos ensaios de viabilidade celular, representados pelas figuras 29-36, foi avaliada utilizando-se o método de MTT, sendo que, quase todos os ensaios foram realizados após 24 horas de tratamento com a PB ou frações. Esses ensaios de toxicidade são adotados como testes padrão pelo FDA (U.S. Food and Drug Administration), de acordo com a Organização Internacional para Standardization (ISO) (10993-5: 2009 - para avaliação biológica de dispositivos médicos: testes para citotoxicidade *in vitro*; ISO 10993-12: 2007 - para avaliação biológica de dispositivos médicos: preparação de amostras e materiais de referência), sendo dessa forma, um ensaio barato, seguro e confiável (FDA, 2012).

Ademais, vários trabalhos envolvendo toxicidade celular têm empregado o método do MTT, dentre eles, o trabalho de Bouazir e cols. (2006), que testou o efeito da toxina T-2, isolada do fungo *Fusarium fungi* em linhagem de macrófagos. Esses autores utilizaram também, para avaliação de toxicidade, o ensaio de captação pelo vermelho neutro (CVN) método igualmente, utilizado nesta tese.

O cérebro é um dos órgãos metabolicamente mais ativos, requerendo duas vezes mais energia que o coração em repouso. Este tecido representa 2% da massa corporal do homem adulto e consome em torno de 20% do total de  $O_2$  disponível para o organismo. Tendo em vista que a fosforilação oxidativa é responsável pela quase totalidade de ATP produzido no SNC, a regulação da respiração mitocondrial torna-se essencial para o

correto metabolismo energético cerebral (ERECINSKA et. al., 1994). Neste sentido, a disfunção mitocondrial tem sido apontada como o mecanismo-chave na neurodegeneração induzida por estímulos agudos e crônicos (MURPHY, 1999).

Estudos mostram que a apoptose neuronal apresenta um importante papel em condições neurodegenerativas, incluindo isquemia cerebral, e doenças como Alzheimer, Parkinson e Huntington's (RUBERG, et. al., 1997; PETTMANN e HENDERSON, 1998).

Um dos poucos trabalhos relacionando à neurotoxicidade central promovida por componentes isolados da peçonha de *M. lemniscatus* mostrou, por ensaios histológicos, que nas regiões CA1, CA3, CA4 e do giro denteado, que houve injúria hipocampal severa, levando a uma neurodegeneração e gliose (1-2,86 µg/µL, quando injetados i.v. em camundongos machos). A dose mais elevada da fração (4,3 µg/animal) foi capaz de ocasionar neurotoxicidade e morte dos animais (OLIVEIRA, et al., 2008). Os nossos resultados de toxicidade, avaliados por MTT em neurônios piramidais de hipocampo, apontam para uma neurotoxicidade da PB devido ao comprometimento da integridade mitocondrial dos neurônios piramidais e granulares de hipocampo, o que poderia estar associado aos eventos apoptóticos.

A toxicidade é um evento complexo que apresenta amplo espectro de efeitos, envolvendo desde alterações funcionais e metabólicas até a morte celular, sendo esta subdividida em apoptose ou necrose (EINSENBRAND, 2002).

O CVN caracteriza-se por se acumular nos lisossomas de células viáveis (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006) que incorporam esse corante vital, ligeiramente catiônico. De acordo com a capacidade lisossomal de incorporar o corante, é possível distinguir células viáveis das injuriadas ou mortas. Os ensaios realizados no presente trabalho mostraram que a PB em diferentes concentrações, prejudicou a viabilidade da membrana lisossomal (figura 37). Apenas a partir da concentração de  $5 \times 10^{-3}$  µg/ml houve redução mais acentuada da viabilidade celular através da integridade lisossomal dos neurônios piramidais, quando expostos por 24 h, com 30-45% de morte celular. Os resultados sugerem que, apenas concentrações mais elevadas de PB poderiam promover morte celular por necrose.

Injúrias reversíveis ou irreversíveis levam a célula a apoptose ou necrose, dependendo do tempo e/ou intensidade do estresse ao qual a mesma é submetida. Estudos revelam que a apoptose e a necrose não são necessariamente, caminhos

patológicos distintos, apresentando muitas vezes os mesmos mensageiros, ativadores ou inibidores bioquímicos (FORMIGLI, 2000).

As imagens de fluorescência (figura 38) com calceína-AM e 1-homodímero de etídio indicam que, a partir da concentração de  $5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$  de PB há um aumento pronunciado de morte celular de modo dependente de concentração.

Em trabalho recentemente publicado pelo grupo de Sandoval e col. (2014) mostrou-se que neurônios hipocampais tratados com duas PLA2 (Mlx8 e Mlx9), isoladas da PB de *M. lemniscatus*, por 1 e 3 h, na concentração de 7,4 nM, mostraram a formação de vacúolos citoplasmáticos cheios com detritos celulares. Os aglomerados de mitocôndrias apresentaram estruturas mitofágicas semelhantes, que são incomuns para os padrões de morte celular programada por autofagia. Finalmente, demonstrou-se que as duas toxinas induziram uma morte celular híbrida com apoptose, autofagia e características necróticas. Nesse trabalho também foi demonstrado um aumento do cálcio citosólico na presença da fração em sinaptosoma (figura 45). Resultados preliminares de vias de morte celular realizados em cultura de hipocampo com a PB indicaram haver morte por apoptose e necrose (dados não mostrados). Logo, conforme os resultados com neurônios de hipocampo em cultura, pode-se concluir que há fortes indícios da participação das vias apoptótica e necrótica.

Toxinas protéicas de animais são conhecidas por perturbar os processos fisiológicos ao se ligarem a elementos-chaves como a um receptor, canal iônico ou uma enzima (TRÉMEAU, et al., 1995). No intuito de investigar a participação de algum receptor ou canal iônico, nos eventos de citotoxicidade, foram utilizados antagonistas e agonistas farmacológicos.

Os mAChR são divididos em cinco subtipos (M1-M5), que estão distribuídos de modo distinto no SNC e SNP (CAULFIELD & BIRDSHALL., 1998). Em nível central, sabe-se que o subtipo M1 modula a excitabilidade de neurônios hipocampais inibindo a liberação de L-Glu para as fibras colaterais de Schaffer (FERNANDEZ DE SEVILLA & BUNO, 2003) e M4 medeia a supressão colinérgica da liberação de L-Glu (SHIREY et al., 2008).

Como já era conhecido que a peçonha da *M. lemniscatus* apresenta majoritariamente toxinas do tipo 3-Ftx sendo estas,  $\alpha$ -NTX, com ações sobre os nAChR pós-sinápticos e MTs, com ações sobre os mAChR, resolveu-se investigar se estes receptores colinérgicos poderiam estar envolvidos nos eventos de citotoxicidade. Para tal, foram utilizadas drogas que interferem em diferentes níveis do sistema colinérgico

(um antagonista inespecífico muscarínico - atropina, um antagonista inespecífico nicotínico - D-tubocurarina, um agonista inespecífico dos receptores colinérgicos - carbacol e um bloqueador da enzima acetilcolinesterase (piridostigmina). Para os ensaios farmacológicos, a concentração de escolha da PB foi de 5 µg/ml, uma vez que esta apresentou uma redução da viabilidade celular em cerca de 58%. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com atropina e piridostigmina não reverteram a toxicidade ocasionada pela PB, ao passo que, a D-tubocurarina parece ter revertido a toxicidade (figura 34). Isso mostra que esse bloqueador impediu a toxicidade pela PB, o que poderia ser explicado pela grande presença de toxinas do tipo  $\alpha$ -NTX (CISCOTTO, 2011).

Já os canais  $Na_v$  são alvos moleculares para vários grupos de neurotoxinas que provocam fortes alterações funcionais nos canais por se ligarem a sítios e subtipos de canais específicos (CESTELE e CATTERALL, 2000; CATTERALL, et al., 2007). Farmacologicamente, as toxinas que apresentam os canais  $Na_v$  como alvos farmacológicos podem ser classificadas em três grupos, baseados em seus efeitos funcionais e pela localização dos seus sítios receptores: (i) toxinas bloqueadoras do poro; (ii) toxinas que afetam o *gating* dos sítios receptores imersos na membrana; (iii) toxinas que afetam o *gating* dos sítios receptores extracelulares (CESTELE e CATTERALL, 2000). No entanto, a figura 36 mostra que o bloqueio do poro do canal  $Na_v$  não impediu a morte neuronal ocasionada pela PB indicando que, possivelmente esses canais não são alvos farmacológicos preferenciais dessa peçonha. Para confirmação desse resultado, ensaios eletrofisiológicos de *whole cell patch clamp* em neurônios periféricos do gânglio da raiz dorsal foram executados e não revelaram bloqueio das correntes sensíveis e resistentes à TTX (dados não mostrados). Ademais, os  $Na_v$  são essenciais para os eventos de neurotransmissão, uma vez que sua ativação altera o potencial de membrana do neurônio pré-sináptico que consecutivamente irá induzir a abertura dos canais  $Ca_v$ , ocorrendo a entrada de  $Ca^{2+}$  para a liberação do NTs na fenda sináptica.

Classicamente, é sabido que o L-Glu também age como uma substância tóxica, causando a morte neuronal quando níveis elevados desse NTs são liberados por períodos prolongados (FORLENZA, 2005; ROGAWSKI & WENK, 2003).

Os ensaios com os antagonistas dos iGluR MK801 (NMDA) e CNQX (AMPA/cainato) demonstraram que o bloqueio do receptor de NMDA impede a citotoxicidade ocasionada pela PB de *M. lemniscatus* (figura 35). Isto pode ser ratificado pelo trabalho



de Rammsayer (2006), em que o evento de toxicidade pode ser desencadeado pela atividade excessiva dos receptores de NMDA e pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nos neurônios, elevando a concentração citosólica deste íon. Esse evento ocorre, em parte, devido à transferência desse cátion para a matriz mitocondrial, que é carregada negativamente. Níveis elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial podem influenciar na função dessa organela, como por exemplo, na fosforilação oxidativa/cadeia transportadora de elétrons, bem como na produção de espécies reativas de oxigênio, que são consequências oriundas dos eventos de toxicidade mediada pelo L-Glu (McALLISTER et al., 2008)

Estudos prévios revelaram que a peçonha de *M. lemniscatus* possuía apenas NTXs do tipo  $\alpha$ -NTX, ou seja, com atividade em receptores pós-sinápticos (VITAL BRAZIL, 1987; CECCHINI, et al., 2005). Entretanto, estudos recentes de nosso Laboratório (Montandon, 2013) mostraram que a PB de *M. lemniscatus* liberou L-Glu de sinaptosomas cérebro-corticais de ratos, que é um modelo pré-sináptico. Nesse trabalho a PB ( $1 \times 10^{-4}$ , 1 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) promoveu a liberação de L-Glu (cerca de 4 nmol/mg de proteína). Portanto, mostrou-se pela primeira vez que, essa peçonha apresenta atividade farmacológica pré-sináptica no SNC, o que poderia estar correlacionado às perturbações neurológicas apresentadas no quadro de envenenamento por esta serpente. No entanto, não se pode afirmar com certeza esta correlação, considerando-se a falta de informações sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica, aos componentes desta peçonha.

A hipótese da excitotoxicidade glutamatérgica reporta que, estados excessivos de L-Glu causam disfunções neuronais e degenerações (LAU, et al., 2010). A excitotoxicidade estaria relacionada, primeiramente, com injúrias isquêmicas no SNC e com patologias com mecanismos similares, e em segundo lugar, com injúrias traumáticas cerebrais. A exacerbação na liberação desse NTs de modo crônico, estaria associada às doenças neurodegenerativas, além de ser responsável pelos mecanismos agudos de excitotoxicidade (SPEDDING et al., 2003; LAU et al., 2010). Essa neurotransmissão alterada pode aumentar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  iniciando uma cascata de sinalização intracelular, resultando em estresse oxidativo (FLORES, et. al., 2011).

Considerando-se os resultados dos ensaios de citotoxicidade em neurônios hipocámpais, em que os iGluR do tipo NMDA estariam envolvidos na redução da viabilidade celular promovida pela PB e, considerando-se também que essa peçonha promove a liberação de L-Glu em sinaptosomas cérebro-corticais, optou-se por

investigar quais vias e tipos de receptores poderiam estar mediando tais processos, ou seja, neurotoxicidade central e liberação de L-Glu.

O hipocampo e o córtex possuem importante papel em funções cognitivas. O mecanismo biológico através do qual essas duas estruturas interagem para processar uma informação e formar uma memória, ainda não está bem esclarecido. É sabido que existem conexões entre o hipocampo e o córtex e essa integração, em parte, é mediada através de núcleos do tálamo (BOKOR et al., 2002; VERTES, 2002).

Cultura primária de neurônios hipocámpais de ratos neonatos apresentam dois tipos de células piramidais com ápices dendríticos distintos, alguns dendritos basais e um axônio emergindo do pericário. As células piramidais das regiões superior (CA1) e inferior (CA3), apesar de apresentarem diferenças de tamanho e na aparência morfológica, possuem conexões aferentes, que em cultura formam conexões sinápticas entre si. Nestas culturas, cerca de 2% são constituídos de células não-neuronais do tipo fibroblastos, que se diferenciam em astrócitos após 24 h de cultura (BANKER, 1977; GROMOVA, et. al., 1983).

Os principais componentes do córtex cerebral compreendem neurônios piramidais, correspondendo a 70% e neurônios intrínsecos, que compreendem células de Golgi tipo II e de axônio curto que apresentam conexões excitatórias e inibitórias (VALVERDE, 2002). Logo, parece que a maquinaria das células piramidais do hipocampo e córtex apresentam similaridades estruturais, além de neuroanatomicamente apresentarem conexões diretas.

Sinaptosomas cérebro-corticais são constantemente empregados como modelos pré-sinápticos para estudos de liberação e modulação de NTs do SNC (ALEKSEENKO et al., 2012). Alguns trabalhos utilizando toxinas isoladas de artrópodes (SILVA, 2012; VIEIRA et al., 2003) e de serpentes (LOMEU et. al., 2014; MONTANDON, 2013) foram realizados no intuito de avaliar a liberação de L-Glu promovida por estas toxinas e peçonhas utilizando essa técnica.

A viabilidade das vesículas sinaptosomais foi checada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (figura 39). A LDH constitui uma classe de isoenzimas e são consideradas como marcadores citoplasmáticos, uma vez que são encontradas no meio extracelular apenas após a lise da membrana plasmática. No cérebro estão presentes as frações  $LDH_2 > LDH_3 > LDH_1 > LDH_4$  (MOURA et. al., 2008). Sobrenadantes resultantes do meio de incubação de sinaptosomas com a PB ( $5 \times 10^{-4}$  a  $500 \mu\text{g/mL}$ ), a F22 ( $5 \times 10^{-1}$  e  $5 \mu\text{g/mL}$ ) ou a toxina MI7294\_NTX ( $1 \mu\text{M}$ ) foram testados quanto à

atividade da LDH. Os resultados indicaram que PB, bem como seus constituintes testados, nas condições utilizadas para os testes farmacológicos, não afetaram a integridade da membrana sinaptosomal.

Demonstrou-se neste trabalho que a F22 (MM= 7.199, 7.256, 7294±10 Da) induziu a liberação de L-Glu de modo tempo e concentração-dependentes (Fig.42). Verificou-se que, nas condições experimentais testadas, a maior liberação de L-Glu pela F22 foi de 2,3 nmol/mg, valor este, já descontado da liberação basal que foi em torno de 3 nmol/mg. O KCl (33 mM), um agente despolarizante, utilizado como um controle positivo de liberação, apresentou uma liberação por volta de 12 nmol/mg (Fig 41). Este controle positivo indica que os sinaptosomas estão funcionais, o que valida os ensaios de liberação.

Considerando-se o que já foi afirmado acima, que a PB de *M. lemniscatus* promoveu neurotoxicidade em neurônios, o que foi inibido pelo bloqueio dos iGluR do tipo NMDA, e que estes receptores estariam envolvidos no mecanismo de excitotoxicidade. Resolveu-se investigar a possível participação dos iGluR na liberação de L-Glu evocada pela F22. O resultado observado (figura 46) indicou que a liberação de L-Glu foi reduzida quando os sinaptosomas foram pré-incubados com o MK801, a partir de 15 min de incubação com a F22 (30 µg/mL). Entretanto, quando os sinaptosomas foram pré-incubados com o CNQX, a inibição da liberação de L-Glu pela F22 pareceu ser mais acentuada e ocorreu de modo mais precoce, iniciando com 10 min de incubação. Os iGluR estão envolvidos direta ou indiretamente com o influxo de Ca<sup>2+</sup> no SNC, além de estarem comprometidos nos eventos de excitotoxicidade.

Choi (1985) mostrou que o influxo de Ca<sup>2+</sup> via receptores de NMDA, seria a causa da neurotoxicidade em células de neurônios piramidais corticais. Posteriormente, foi proposto que esses receptores poderiam ser essencialmente, os responsáveis pela entrada de Ca<sup>2+</sup> mediando os processos neurodegenerativos (TYMIANSKI et al., 1993). Logo, foi de fundamental importância a investigação da participação do cálcio na liberação de L-Glu promovida pela F22.

Foram utilizados bloqueadores específicos de canais Cav do tipo N (ω-conotoxina GVIA), do tipo P/Q (ω-agatoxina IVA) e do tipo L (Nifedipina). O resultado demonstrou que os canais Cav do tipo N, P/Q e L têm um papel importante na liberação de L-Glu pela F22, entretanto, não bloqueiam 100% da liberação (Figuras 43 e 44). Alamilla & Gillespie (2013) mostraram que ensaios eletrofisiológicos em fatias de cérebro dos núcleos mediais do corpo trapezóide, que fazem parte do sistema auditivo,

os canais  $Ca_v$  do tipo L, P/Q e N tiveram uma contribuição significativa na liberação de L-Glu em animais recém-nascidos ( $P_3$ ), contudo, em animais acima de 10 dias de vida ( $P_{10}$ - $P_{12}$ ), a liberação de L-Glu passou a ser mediada pelos canais P/Q principalmente, seguidos dos canais do tipo N. Ou seja, apesar de ter sido observada uma aparente maior redução da liberação de L-Glu pela F22 na presença do bloqueador nifedipina, esse evento pode estar relacionado a baixa participação desses canais na liberação de L-Glu. Em adição, no SNC os canais  $Ca_v$  do tipo L são encontrados na maior parte das vezes no soma e dendritos e não nos terminais axônicos (TSIEN, et. al., 1988). Em complemento, observou-se que quando utilizado os bloqueadores Cádmio e Níquel, bloqueadores inespecíficos de todas as correntes de  $Ca^{2+}$  sensíveis a voltagem, a liberação de L-Glu até os 20 min não foi inibida significativamente (dados não mostrados) mostrando a possível participação de outra via, que não exclusivamente através dos canais  $Ca_v$ , no mecanismo de liberação desse NT elicitada pela F22.

Para confirmar se a liberação de L-Glu pela F22 seria dependente de  $Ca^{2+}$  foram utilizados quelantes de cálcio extracelular (EGTA) e intracelular (BAPTA-AM). O resultado obtido mostrou que a liberação de L-Glu elicitada pela F22 era completamente dependente do  $Ca^{2+}$  extracelular, uma vez que esta foi abolida totalmente na presença do EGTA e do EGTA+BAPTA (figura 45). O resultado mostrou também que até os primeiros 20 min houve um prejuízo na liberação de L-Glu quando os sinaptosomas foram pré-incubados com o BAPTA, evidenciando a participação do cálcio intracelular no processo de liberação. O bloqueio pelo BAPTA foi parcialmente revertido no decorrer do tempo, pressupondo-se que os estoques do quelante intracelular tenham sido saturados com a entrada  $Ca^{2+}$  extracelular. Entretanto, não foi utilizada uma ferramenta de fluorescência específica (FLUO-4 AM, FLUO-3 AM ou FURA2-AM, por exemplo) para confirmar essa hipótese.

Em síntese, os experimentos de viabilidade celular apontaram que a toxicidade promovida pela PB em neurônios piramidais e granulares de hipocampo (pré-/pós-sinápticos) era revertida na presença do antagonista do receptor iGluR do tipo NMDA; que esses receptores permeiam a entrada de  $Ca^{2+}$  nos neurônios, e a exacerbação desse influxo pode promover eventos de excitotoxicidade. Em contrapartida, em modelo pré-sináptico de sinaptosoma cérebro-cortical, os canais  $Ca_v$  estão envolvidos parcialmente na liberação de L-Glu elicitada pela F22 isolada da PB, e que essa liberação é dependente de  $Ca^{2+}$  intra e extracelular. Logo, a próxima pergunta seria se a F22 estaria

funcionando como um agonista do receptor de NMDA e desse modo, contribuindo para o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Os resultados mostraram que os antagonistas MK801 e CNQX aboliram cerca de 78-80 % da liberação de L-Glu promovida por F22 quando incubados separadamente (figura 46) ou em associação (figura 47). Um trabalho realizado por Shashank & Murray (2003) com neurônios neocorticais de embriões de murino em cultura, avaliou o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos receptores AMPA/cainato na presença de diferentes bloqueadores dos canais  $\text{Ca}_v$  e iGluR. Eles mostraram que o tratamento com o antagonista MK801 (100 nM) e  $\omega$ -agatoxina IVA (100 nM) reduziram significativamente o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , não observado quando tratados com nifedipina (1  $\mu\text{M}$ ) e  $\omega$ -conotoxina GVIA (100 nM). Além disso, o tratamento com o antagonista do iGluR AMPA/cainato NBQX aboliu completamente o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Logo, os autores concluíram que a ativação do iGluR AMPA/cainato é acompanhada pela ativação do receptor de NMDA e dos canais  $\text{Ca}_v$  tipo P/Q. No presente estudo, o bloqueio dos iGluR pelos antagonistas MK801 e CNQX mostrou que houve uma redução quase total na liberação de L-Glu pela F22, assim como que o canal  $\text{Ca}_v$  do tipo P/Q teve uma participação significativa inibindo cerca de 57 % da liberação de L-Glu promovida pela F22.

Os receptores de AMPA medeiam a transmissão sináptica rápida do SNC e estão envolvidos em eventos fisiológicos como a sinaptogênese e plasticidade sináptica (SONG & HUGANIR, 2002). Ademais, esses receptores são heterogêneos e podem conter quatro subunidades GluR1-GluR4, sendo que a presença da subunidade GluR2 torna o receptor impermeável ao  $\text{Ca}^{2+}$ . O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos receptores AMPA que não contêm a subunidade GluR2 modula a transmissão sináptica e a comunicação entre neurônios e células da glia (LIU & CULL-CANDY, 2000). Tendo em vista que os receptores AMPA/cainato para serem ativados necessitam que o neurônio se encontre no potencial de membrana em repouso, para investigar se de fato haveria uma real participação de desses no mecanismo de liberação de L-Glu promovido pela F22, decidiu-se promover uma despolarização da membrana na presença do agente despolarizante KCl (45 mM) associado à F22 (figura 48), o que de fato foi confirmado pela inibição parcial de 50 % da liberação de L-Glu nos primeiros 10 minutos de experimento. Mostrando haver de fato a participação dos iGluR AMPA/cainato na liberação de L-Glu induzida pela F22.

Por fim, investigando-se qual toxina da F22 seria a responsável pela liberação de L-Glu foram testadas duas toxinas puras das três presentes nessa fração. O resultado observado mostrou que ambas são responsáveis pela liberação de L-Glu porém com perfis diferentes de liberação (figura 49). A toxina MI7256\_NTX apesar de ser majoritária na fração, parece ser responsável pela liberação de L-Glu nos primeiros 5 minutos, agindo de forma sinérgica com a toxina MI7294\_NTX, que seria a responsável pela liberação contínua deste NT. Vale ressaltar ainda que pelo ensaio de LDH, a F22 e a toxina MI7294\_NTX não aumentaram a atividade dessa enzima (figura 39), indicando que o mecanismo de liberação de L-Glu não-espontâneo (pré-sináptico) ocorre via receptor.

Por outro lado, é possível que o mecanismo de ação de uma ou ambas toxinas 3-Ftx seja por ativação do receptor AMPA/cainato pré-sináptico, que por sua vez promoveria a despolarização da membrana pelo influxo de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Esta despolarização levaria à remoção do íon  $\text{Mg}^{2+}$  do receptor de NMDA (pré-sináptico), permeando a entrada de mais  $\text{Ca}^{2+}$ , bem como ativando os canais  $\text{Ca}_v$  e, aumentando ainda mais o influxo desse íon e de L-Glu, gerando uma excitotoxicidade em neurônios pós-sinápticos. Estudos prévios mostraram que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos receptores AMPA/Cainato contribuem para a excitotoxicidade mediada pelo L-Glu (BRORSON, MANZOLILLO, & MILLER, 1994; LU, et. al., 1996). O L-Glu liberado estaria ligando-se aos receptores glutamatérgicos pós-sinápticos de AMPA/Cainato e, em especial ao de NMDA, contribuindo para os eventos de neurotoxicidade no SNC, observados no quadro de envenenamento por estas serpentes.

Adicionalmente, esse estudo mostra novas possibilidades para outras investigações com a peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus* e outras elapídicas. O presente trabalho evidencia pela primeira vez, a ação pré-sináptica de toxinas 3-Ftx dessa peçonha e suas ações sobre o sistema glutamatérgico.

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho envolvendo a peçonha de *Micrurus lemniscatus* permitiu as seguintes conclusões, que estão agrupadas por etapas do trabalho:

### A) PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA:

- A peçonha é complexa e de difícil purificação, sendo que, um único passo cromatográfico (RPC) não foi suficiente para o isolamento de toxinas envolvidas nos eventos de toxicidade celular e liberação de L-glutamato, interesse maior deste estudo. Contudo a metodologia utilizada gerou frações semipuras com bom rendimento protéico;
- O fracionamento bidimensional por cromatografia líquida de alta pressão (CIEX seguida de uma RPC) possibilitou a obtenção de toxinas puras, cujas sequências N-terminais foram determinadas, o que permitiu, por busca de similaridade em bancos de dados, suas identificações e inferências de suas funções;
- A diversidade desta peçonha foi evidenciada e mostrou conter: toxinas três-dígitos, (MM= 6-8 kDa), identificadas como componentes majoritários da peçonha, PLA<sub>2</sub> (12-16 kDa); toxinas de 11, 9 e 8 kDa e peptídeos (1 e 3 kDa). Estas moléculas, na sua quase totalidade, são ainda inexploradas, no que concerne a estudos bioquímicos e farmacológicos;
- As toxinas três-dígitos, obtidas em estado puro e com N-terminal sequenciado, apresentaram similaridade com outras toxinas três-dígitos já caracterizadas, do tipo citotoxinas e  $\alpha$ -neurotoxinas de outras *Micrurus* sp. e serpentes elapídicas.

### B) ESTUDOS DE CITOXICIDADE

- A peçonha bruta foi capaz de promover citotoxicidade em células de linhagem neuronal Neuro-2A de neuroblastoma de camundongo, nas concentrações de  $5 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/ml}$  a 1000  $\mu\text{g/ml}$ , expostas por 24 horas;
- A varredura (*screening*) das frações semipuras obtidas pelo fracionamento da peçonha bruta, indicou uma região (Frações 9 a 22) que apresentou moderada e alta citotoxicidade em células de linhagem neuronal, Neuro-2A;

- A peçonha bruta causou citotoxicidade nos neurônios hipocâmpais, apenas no tempo de incubação de 24 h, nas concentrações de  $5 \times 10^{-5}$  a  $5 \times 10^{-2}$  e 5  $\mu\text{g/ml}$  avaliadas pelo método de MTT, o que indica possíveis eventos apoptóticos envolvidos que necessitam ser explorados;
- A citotoxicidade basal promovida pela peçonha bruta nos neurônios hipocâmpais foi parcialmente revertida na presença do bloqueador glutamatérgico ionotrópico do receptor de NMDA;
- A viabilidade da atividade lisossomal dos neurônios hipocâmpais (expostos por 24 h) foi afetada na presença da peçonha bruta, em quase todas as concentrações testadas, o que mostra o possível envolvimento de eventos de necrose;
- Os ensaios de morte celular, por fluorescência, demonstraram qualitativamente, a morte neuronal de modo concentração-dependente;
- A integridade sinaptosomal pelo ensaio da enzima lactato desidrogenase não foi aparentemente prejudicada pela Fração 22 e toxina MI7294\_NTX, nas doses testadas.

### **C) ESTUDOS FARMACOLÓGICOS – LIBERAÇÃO DE L-GLUTAMATO**

- A Fração 22 contendo três toxinas três-dígitos (MI7119\_NTX; MI7256\_NTX; MI7294\_NTX) induziu a liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro - corticais de ratos adultos jovens, de modo concentração-dependente;
- A liberação de L-glutamato induzida pela Fração 22 é dependente de cálcio extra e intracelular, sendo abolida completamente na ausência do cálcio extracelular;
- Os canais  $\text{Ca}_v$  pré-sinápticos participam da liberação de L-glutamato pela Fração 22, contudo o bloqueio destes não inibe completamente a liberação do neurotransmissor;
- A liberação de L-glutamato induzida pela Fração 22 é abolida, de forma significativa, com o bloqueio dos receptores de NMDA e de AMPA/Cainato;
- Alterações no potencial de repouso da membrana sinaptosomal (despolarização pelo KCl) reduziram a liberação de L-glutamato induzida pela Fração 22, o que dá suporte ao envolvimento dos receptores de AMPA/Cainato no evento de liberação de L-glutamato;
- Das toxinas isoladas MI7256\_NTX e MI7294\_NTX da Fração 22, duas foram testadas e causaram liberação de L-glutamato, em conformidade com o



observado pela Fração 22. Uma destas toxinas foi mais potente em liberar o neurotransmissor (M17294\_NTX);

- Enfim, neste trabalho evidenciaram-se as primeiras toxinas três-dígitos de *Micrurus* sp. com atividade pré-sináptica, e atividade sobre o sistema glutamatérgico.

#### **D) POSSÍVEL MECANISMO**

- É possível que o mecanismo de ação de uma ou ambas toxinas 3-Ftx seja por ativação do receptor AMPA/Cainato pré-sináptico, que por sua vez promoveria a despolarização da membrana pelo influxo de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Esta despolarização levaria à remoção do íon  $\text{Mg}^{2+}$  do receptor de NMDA (pré-sináptico), permeando a entrada de mais  $\text{Ca}^{2+}$ , bem como ativando os canais  $\text{Ca}_v$  do tipo P/Q, N e L, aumentando ainda mais o influxo desse íon e, por consequência, liberando mais L-Glu, o que geraria uma excitotoxicidade em neurônios pós-sinápticos. O L-Glu liberado estaria ligando-se aos receptores glutamatérgicos pós-sinápticos de AMPA/Cainato e, em especial ao de NMDA, contribuindo para os eventos de neurotoxicidade no SNC, observados no quadro de envenenamento por estas serpentes (figura 50).

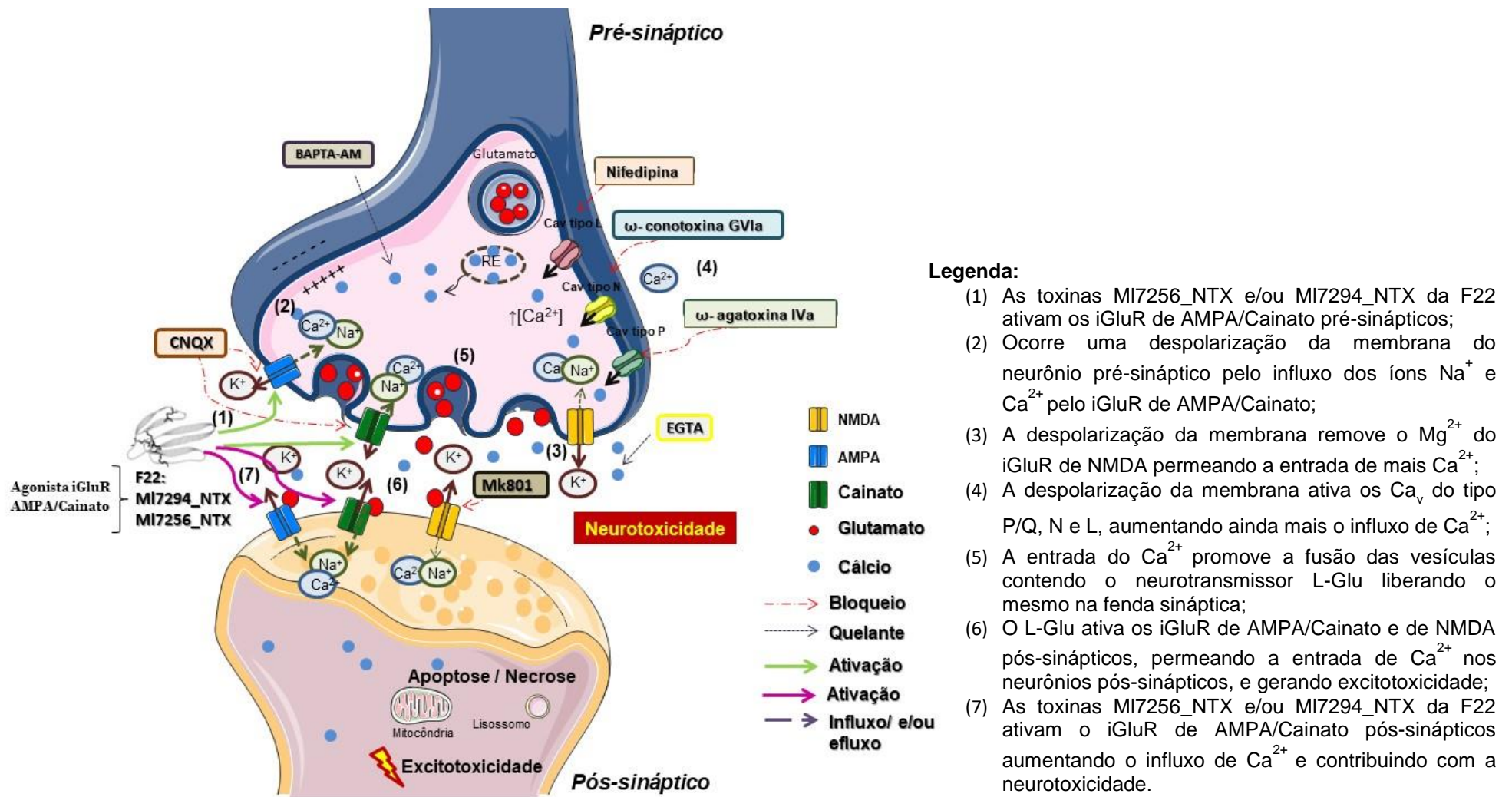


Figura 50: Provável mecanismo de ação da toxinas 3-Ftx MI7294\_NTX e MI7256\_NTX presentes na F22 isolada da peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus*.

## 7. PERSPECTIVAS

- Obtenção da sequência completa por degradação de Edman e/ou sequenciamento de novo por MALDI TOF-TOF MS das toxinas três-dígitos MI7256\_NTX e MI7294\_NTX isoladas da peçonha de *Micrurus lemniscatus*;
- Ensaios de toxicidade celular com as toxinas isoladas pelos métodos colorimétricos de MTT e CVN e por microscopia de fluorescência com calceína-AM/etídio em células de linhagem neuronal Neuro-2A e de neurônios piramidais hipocampais e corticais de ratos;
- Ensaios de ciclo celular e fragmentação de DNA por citometria de fluxo utilizando anexina V-FITC e iodeto de propídio para a investigação do envolvimento da peçonha bruta e das toxinas MI7256\_NTX e MI7294\_NTX na indução de apoptose celular;
- Ensaios fluorimétricos de liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro corticais e hipocampais de ratos adultos, com as toxinas MI7256\_NTX e MI7294\_NTX e os bloqueadores glutamatérgicos ionotrópicos, visando-se estudar o mecanismo de ação destas toxinas;
- Ensaios de microscopia eletrônica para a análise da síntese, estocagem e liberação de L-glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais e hipocampais de ratos adultos na presença da peçonha bruta e das toxinas MI7256\_NTX e MI7294\_NTX de *Micrurus lemniscatus*;
- Ensaios de competição com as toxinas MI7256\_NTX e MI7294\_NTX e ligantes radioativos triciados de receptores ionotrópicos glutamatérgicos NMDA e AMPA/Cainato em neurônios piramidais hipocampais e corticais de ratos;
- Registros eletrofisiológicos extracelulares *ex-vivo* em cortes histológicos de córtex e hipocampo de ratos com as toxinas MI7256\_NTX e MI7294\_NTX na presença de bloqueadores dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos NMDA e AMPA/Cainato;
- Ensaios de biodistribuição *in vivo* com as toxinas MI7256\_NTX e MI7294\_NTX marcadas com tecnécio, em ratos adultos, com ênfase no sistema nervoso central;
- Estudos para se verificar a possível permeabilidade das toxinas pela barreira hematoencefálica.

## 8 REFERÊNCIAS

- AFIFIYAN, F., ARMUGAM, A., TAN, C., GOPALAKRISHNAKONE, P., & JEYASEELAN, K. (1999). Postsynaptic alpha-neurotoxin gene of the spitting Cobra, *Naja naja sputatrix*: structure, organization and phylogenetic analysis. *Genome Research*, pp. 260-66.
- AIRD, S., & DA SILVA JR, N. (1991). Comparative enzymatic composition of brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99B, pp. 287-294.
- ALAMILLA, J., & GILLESPIE, D. (2013). Maturation of Calcium-dependent GABA, Glycine, and Glutamate release in the Glycinergic MNTB-LSO pathway. *Plos ONE*, 8, pp. 1-10.
- ALAPE-GIRÓN, A., LOMONTE, B., GUSTSFSSON, B., DA SILVA JR, N., & THELESTAM, M. (1994). Electrophoretic and immunochemical studies of *Micrurus* snake venoms. *Toxicon*, 32, pp. 713-23.
- ALAPE-GIRÓN, A., STILES, B., SCHMIDT, J., GIRÓN-CORTES, M., THELESTAM, M., JORNVALL, H., & BERGMAN, T. (1996). Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding proteins and phospholipases A2 from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *FEBS Letters*, 380, pp. 29-32.
- ALBUQUERQUE, H., DA COSTA, T., & CAVALCANTI, M. (2004). Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* notificados no estado da Paraíba. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 5.
- ALEKSEENKO, A. e. (2012). Glutamate-induced free radical formation in rat brain synaptosomes is not dependent on intrasynaptosomal mitochondria membrane potential. *Neuroscience Letters*, 513, pp. 238-42.
- AMARAL, D., & WITTER, M. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31, pp. 571-91.
- AMAZZAL, L., LAPÔTRE, A., QUINGNON, F., & BAGREL, D. (2007). Mangiferin protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity mediated by oxidative stress in Neuro-2A cells. *Neuroscience Letters*, 418, pp. 159-64.
- ARUNDINE, M., & TYMIANSKI, M. (2003). Molecular mechanism of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34, pp. 325-37.
- ATLANTE, A., CALISSANO, P., BOBBA, A., AZZARITI, A., MARRA, E., & PASSARELA, S. (2000). Cytochrome c is release from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS

- scavenger and a respiratory substrate in cerebellar neuron undergoing excitotoxic death. *J. Biol. Chem.*, 275, pp. 37159-66.
- BABICH, H., & BORENFREUND, E. (1991). Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, pp. 2101-03.
- BAJJALIEH, S., & SCHELLER, R. (1995). The biochemistry of neurotransmitter secretion. *The Jour.l of Biol. Chem.*, 270, pp. 1971-4.
- BANKER, G. e. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Research*, 126, pp. 397-425.
- BARBER, C., ISBISTER, G., & HODGSON, W. (2013). Alpha neurotoxins. *Toxicon*, 66, pp. 47-58.
- BARROS, A., FERNANDES, D., FERREIRA, L., & DOS SANTOS, M. (1994). Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (coral snake). *Toxicon*, 32, pp. 445-52.
- BASTA-KAIM, A., BUDZISZEWSLA, B., JAWORSKA-FEIL, L., TETICH, M., KUBERA, M., LESKIEWICZ, M., . . . LASON, W. (2006). Antipsychotic drugs inhibit the human corticotropin-releasing-hormone gene promoter activity in Neuro-2A cells - an involvement of protein kinases. *Neuropsychopharmacology*, 31, pp. 853-65.
- BELEBONI, R., GUIZZO, R., FONTANA, A., PIZZO, A., CAROLINO, R., GOBBONETTO, L., . . . DOS SANTOS, W. (2006). Neurochemical characterization of a neuroprotective compound from *Parawixia bistriata* spider venom that inhibits synaptosomal uptake of GABA and glycine. *Molecular Pharmacology.*, 69, pp. 1998-2006.
- BILWES, A., REES, B., MORAS, D., MENEZ, R., & MENEZ, A. (1994). X-ray structure at 1.55 Å of toxin gamma a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes. *J. Mol. Biol.*, 239, pp. 122-36.
- BINDA, A., KABBANI, N., LIN, R., & LEVENSON, R. (2002). D2 and D3 dopamine receptor cell surface localization mediated by interaction with protein 4.1N. *Mol. Pharmacol.*, 62, pp. 507-13.
- BOCHNER, R. e. (mai-jun de 2002). Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. *Cad. Saúde Pública.*, 18, pp. 735-46.
- BOCHNER, R. e. (jan-fev de 2003). Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cad. Saúde Pública*, 1, pp. 7-16.

- BOHLEN, C., CHESLER, A., SHARIF-NAEINI, R., MEDZIHRADESKY, K., ZHOU, S., KING, D., . . . JULIUS, D. (2011). A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature*, *479*, pp. 410-14.
- BOKOR, H. C. (2002). Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *European Journal Neurosci*, *16*, pp. 1227-1239.
- BONFOCO, E., KRAINE, D., & ANKARCRONA, M. e. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, *92*, pp. 7162-66.
- BOUAZIR, C., ABID-ESSEFI, S., BOUSLIMI, A., GOLLI, E., & BACHA, H. (2006). Cytotoxicity and related effects of T-2 toxin on cultured VERO cells. *Toxicon*, *48*, pp. 343-52.
- BOUGIS, P., MARCHOT, P., & ROCHAT, H. (1986). Characterization of elapidae venom components using optimized reverse-phase high-performance liquid chromatographic conditions and screening assays for alfa-neurotoxin and phospholipase A2 activities. *Biochemistry*, *25*, pp. 7235-43.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, *72*, pp. 248-54.
- BRORSON, J., MANZOLILLO, & MILLER, R. (1994). Ca<sup>2+</sup> entry via AMPA/KA Receptors and Excitotoxicity in culture cerebellar Purkinje cells. *The Journal of Neuroscience*, *14*, pp. 187-97.
- BUCHARETCHI, F., HYSLOP, S., VIEIRA, R., TOLEDO, A., MADUREIRA, P., & DE CAPITANI, E. (May-June de 2006). Bites by Coral Snakes (*Micrurus* spp.) in Campinas, State of São Paulo, Southeastern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, *3*, pp. 141-45.
- BURKE, J., & DENNIS, E. (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of Lipid Research.*, pp. S237-42.
- CABAJAL-SAUCEDO, A., LÓPEZ-VERA, E., BÉNARD-VALLE, M., SMITH, E., ZAMUDIO, F., ROODT, A., & OLVERA, -R. A. (2013). Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus latocollaris* (Squamata: Elapidae). *Toxicon*, *66*, pp. 64-74.
- CAIRRÃO, M., RIBEIRO, A., PIZZO, A., & al., e. (2002). Parawixia bistriata and Scaptocosa raptoria venoms inhibition of GABA uptake and convulsant effects. *Pharm. Biol.*, *40*, pp. 472-77.

- CALDERÓN, F., BONNEFONT, A., MUÑOZ, F., FERNÁNDEZ, V., VIDELA, L., & INESTROSA, N. (1999). PC12 and Neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-amyloid complexes, amyloid25-35 fragment, glutamate and hydrogen peroxide. *J. Neurosc. Research*, 56, pp. 620-31.
- CALIXTO, J. (2003). Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*, 55, pp. 37-9.
- CARDOSO, J., & FRANÇA, F. e. (2003). *Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos Acidentes*. São Paulo: Sarvier.
- CAROFOLI, E. (1992). The Ca<sup>2+</sup> pump of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 4, pp. 2115-18.
- CARVALHO, C., & ALENCAR, I. e. (2007). Serpentes da região de Manaus , Amazônia Central, Brasil. *Biol. Geral. Exper.*, 7, pp. 41-59.
- CARVALHO, N., GARCIA, R., FERREIRA, A., BATISTA, D., CASSOLA, A., MARIA, D., . . . SANDOVAL, M. (2014). Neurotoxicity of coral snake phospholipase A2 in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Research*, 1554, pp. 1-16.
- CASAI-SILVA, L. (2012). Toxinas como ferramentas biotecnológicas e farmacológicas. *Gazeta Médica da Bahia.*, 82, pp. 54-60.
- CATTERALL, W., CESTÈLE, S., YAROV-YAROVY, V., YU, H., KONOKI, K., & SCHEUER, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49, pp. 124-41.
- CAULFIELD, & BIRDSHALL. (1998). International union of pharmacology XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacology*, 50, p. 279.
- CECCHINI, A., MARCUSSI, S., SILVEIRA, L., BORJA-OLIVEIRA, C., RODRIGUES-SIMIONI, L., AMARA, S., . . . SOARES, A. (2005). Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A.*, 140, pp. 125-34.
- CESTÈLE, S., & CATTERALL, W. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimic.*, 82, pp. 883-92.
- CHANGEUX, J. (1990). The nicotinic acetylcholine receptor. An allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacology*, 11, pp. 485-92.
- CHATTERJEE, D., CHAKRABORTY, M., & ANDERSON, G. (1992). Differentiation of Neuro-2A neuroblastoma cells by an antibody to GM3 ganglioside. *Brain Research*, 583, pp. 31-44.

- CHEN, Z., ZHANG, H., GU, Z., CHEN, B., HAN, R., REID, P., & al., e. (2006). A long-form alpha-neurotoxin from cobra venom produces potent opioid-independent analgesia. *Acta Pharmacological Sinica.*, 27, pp. 402-08.
- CHIAPPINELLI, V. (1983). Kappa-bungarotoxin: a probe for the neuronal nicotinic receptor in the avian ciliary ganglion. *Brain Research*, 277, pp. 9-22.
- CHICUREL, M., & HARRIS, K. (1992). Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurology*, 325, pp. 169-82.
- CHOI, D. (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neuroscience Lett.*, 58, pp. 293-7.
- CHU, I. (1995). Alternative methods to animal testing: a Canadian health protection branch perspective. *Alternative to Laboratory Animals*, 23, pp. 257-61.
- CISCOTTO, P. H. (agosto de 2011). Análises proteômicas, anti-venômicas e isolamento de novas proteínas com atividade citotóxica de venenos elapídicos (Tese de doutorado). 165f. Belo Horizonte, MG, Brasil: Depto de Bioquímica e Imunologia. ICB/UFMG.
- CISCOTTO, P., RATES, B., SILVA, D., RICHARDSON, M., SILVA, L. P., ANDRADE, H., . . . PIMENTA, A. (2011). Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J. Proteomics.*, 74, pp. 1810-25.
- CORRÊA-NETO, C., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I., SILVA, D., HO, P., LEITÃO-DE-ARAÚJO, M., ALVES, M. S., . . . CALVETE, J. (2011). Snake venomomics and Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *Micrurus corallinus*. *Journal of Proteomics.*, 74, pp. 1795-809.
- CURA, J., BLANZACO, D., BRISSON, C., CURA, M., CABROL, R., LARRATEGUY, L., . . . VIDAL, J. (2002). Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA2, NSC-624244) in patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research.*, 8, pp. 1033-41.
- CUSHMAN, D., CHEUNG, H., SABO, E., & ONDETTI, M. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*, 25, pp. 5484-91.
- DA SILVA JR, N. e. (2001(a)). Phylogeny of South American Triad Coral Snakes (Elapidae: *Micrurus*) Based on Molecular Characters. *Herpetologica*, 1(57), pp. 1-22.



- DA SILVA JR, N., & SITES JR, J. (2001b). Phylogeny of South American triad coral snakes (Elapidae: Micrurus) based on molecular characters. *Herpetologica*, 57, pp. 1-22.
- DA SILVA JR, N., GRIFFIN, P., & AIRD, S. (1991). Comparative chromatography of brazilian coral snake (Micrurus) venoms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100B, pp. 117-26.
- DA SILVA, D., DE MEDEIROS, W., BATISTA, I., LEBRUN, I., PIMENTA, D., ABDALLA, F., & SANDOVAL, M. (2011). Characterization of a new muscarinic toxin from the venom of the brazilian coral snake *Micrurus lemniscatus* in rat hippocampus. *Life Sciences*, 89, pp. 931-38.
- DAL BELO, C., LEITE, G., TOYAMA, M., MARANGONI, S., CORRADO, A., FONTANA, M., . . . RODRIGUES-SIMIONI, L. (2005). Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase A2 from *Micrurus dumerilii* carinicauda venom. *Toxicon*, 46, pp. 736-50.
- DANBOLT, N. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology.*, 65, pp. 1-105.
- DANTAS, A. (2013). Peçonha bruta de *Loxosceles similis* (Moenkhaus, 1898) ativa uma via apoptótica dependente de caspases em fibroblastos dérmicos humanos (Dissertação de Mestrado). Belo Horizonte, MG: Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia. ICB/UFMG.
- DE CARVALHO, L. (2007). Participação dos receptores GABAA no potencial excitatório pós-sináptico em hipocampo e amígdala de ratos wistar audiogênicos (WAR).(Dissertação de Mestrado). Belo Horizonte, MG: Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia. ICB/UFMG.
- DE LIMA, M., LOMEIO, R., GONÇALVES, A., SILVA, C., REIS, P., DONATO, M., . . . PIMENTA, A. (2012). Arthropd toxins with potential application in health. *Gazeta Médica da Bahia*, 82 (Supl. I), pp. 46-53.
- DE SOUZA, W.(coordenador). (agosto de 2010). Doenças Negligenciadas. 58p. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.
- De WEILLE, J., SCHWEITZ, H., MAES, P., TATAR, A., & LAZDUNSKI, M. (1991). Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, pp. 2437-40.
- DÍAZ-HERNANDEZ, M., DEL PUERTO, A., DÍAZ-HERNANDEZ, J., DIEZ-ZAERA, M., LUCAS, J., GARRIDO, J., & MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2008). Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J. Cell Sci.*, 121, pp. 3717-28.
- DICKINSON, B., JO, J., SEOK, H., SONG, G., WHITCOMB, D., DAVIES, C., . . . CHO, K. (2009). A novel mechanism of hippocampal LTD involving muscarinic

- receptor-triggered interactions between AMPARs, GRIP and liprin-alpha. *Molecular Brain*, 2, pp. 1-12.
- DINGLEDINE, R., BORGES, K., BOWIE, D., & TRAYNELIS, S. (1999). The glutamate receptors ion channels. *Pharmacological Reviews.*, 51, pp. 7-61.
- DOKMETJIAN, J., DEL CANTO, S., VINZÓN, S., BISCOGLIO, M., & BONINO, J. (2009). Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon*, 53, pp. 375-82.
- DONATO, M. (2008). Purificação, Caracterização Bioquímica e Eletrofisiológica da Toxina Mic6c7NTX da Peçonha da Serpente *Micrurus ibiboboca* (Merrem, 1820). Dissertação de Mestrado. 156f. João Pessoa, PB: UFPB, LTF, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.
- DOS SANTOS, G., CASAIS E SILVA, L., M., S. M., & VILLAREAL, C. (2012). Antinociceptive properties of *Micrurus lemniscatus* venom. *Toxicon*, 60, pp. 1005-12.
- DUFTON, M., & HIDER, R. (1988). Structure and pharmacology of elapid cytotoxins. *Pharmacol. Ther.*, 36, pp. 1-40.
- DUFTON, M., & HIDER, R. (1988). Structure and pharmacology of elapid cytotoxins. *Pharmacology Therapy*, 36, pp. 1-40.
- DUNKLEY, P., HEATH, J., HARRISON, S., JARVIE, P., & GLENFIELD, P. (1988). A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Research*, 441, pp. 59-71.
- DUNKLEY, P., JARVIE, P., & ROBINSON, P. (2008). A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nature Protocols*, 3, pp. 1718-28.
- EGLIN, R., CHOPPIN, A., DILLON, M., & HEDGE, S. (1999). Muscarinic receptors ligands and their therapeutic potential. *Curr. Opin. Chem. Biol.* , pp. 426-32.
- EINSENBRAND, G. e. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40, pp. 193-236.
- ELIAS, G., & NICOLL, R. (2007). Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *TRENDS in Cell Biology*, 17, pp. 343-53.
- ERECINSKA, M., & NELSON, D. (1994). Effects of 3-nitropropionic acid on synaptosomal energy and transmitter metabolism: relevance to neurodegenerative brain diseases. *Journal of Neurochemistry*, 63, pp. 1033-41.
- FACHIM, H., CUNHA, A., PEREIRA, A., BELEBONI, R., GOBBO-NETO, L., LOPES, N., . . . DOS SANTOS, W. (2011). Neurobiological activity of Parawixin 10, a novel anticonvulsant compound isolated from *Parawixia*

- bistriata spider venom (Araneidae: Araneal). *Epilepsy & Behavior.*, 22, pp. 158-64.
- FARINELLI, S., & NICKLAS, W. (1992). Glutamate metabolism in rat cortical astrocyte cultures. *J. Neurochem.*, 58, pp. 1905-15.
- FAVREAU, P., MENIN, L., MICHALET, S., PERRET, F., CHENEVAL, P., STÖCKLIN, M., . . . STÖCKLIN, R. (2006). Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen. *Toxicon*, 47, pp. 676-87.
- FDA. (13 de 02 de 2012). Acesso em 04 de 08 de 2014, disponível em U.S Food and Drug Administration: [www.accessdata.fda.gov/colrh\\_docs/pdf11/k111405.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/colrh_docs/pdf11/k111405.pdf)
- FDA. (2012). *Drugs*. Acesso em 10 de agosto de 2014, disponível em FDA: US Food and Drug Administration: <http://www.fda.gov/Drugs/default.htm>
- FEITOSA, R., MELO, I., & MONTEIRO, H. (jul-ago de 1997). Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no estado do Ceará/Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.*, 30, pp. 295-301.
- FELDER, C., BYMASTER, F., & WARD, J. (2000). Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *Journal Med. Chem.*, pp. 4333-53.
- FÉLIX-OLIVEIRA, A., DIAS, R., COLINO-OLIVEIRA, M., ROMBO, D., & SEBASTIÃO, A. (2014). Homeostatic plasticity induced by brief activity deprivation enhances long-term potentiation in the mature rat hippocampus. *J. Neurophysiol.*
- FERKANY, J., ZACZEC, R., & COYLE, J. (1982). Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature*, 298, pp. 757-59.
- FERNANDEZ DE SEVILLA, D., & BUNO, W. (2003). Presynaptic inhibition of Schaffer collateral synapses by stimulation hippocampal cholinergic afferent fibres. *Journal of Neuroscience.*, 17, pp. 555-58.
- FERNÁNDEZ, J., ALAPE-GIRÓN, A., ANGULO, Y., SANZ, L. G., CALVETE, J., & LOMONTE, B. (2011). Venomic and antivenomic analyses of the Central American Coral snake, MICRURUS NICROCINCTUS (Elapidae). *Journal of Proteome*, 10, pp. 1816-27.
- FERREIRA, S., BARTELT, D., & GREENE, L. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. *Biochemistry*, 9, pp. 2583-93.

- FISKUM, G. (2000). Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *J. Neurotrauma*, 17, pp. 843-55.
- FISKUM, G., STARKOV, A., POLSTER, B., & CHINOPOULOS, C. (2003). Mitochondrial mechanism of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 991, pp. 111-19.
- FONNUM, M. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.*, 42, pp. 1-11.
- FONTANA, A., GUIZZO, R., DE OLIVEIRA, B., & al., e. (2003). Purification of a neuroprotective component of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate. *Br. J. Pharmacolog.*, 139, pp. 1297-309.
- FORMIGLI, L. e. (2000). Apoptosis: morphological and biochemical exploration of a synthetic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of Cellular Physiology.*, 182, pp. 41-9.
- FOTAKIS, G. e. (2006). Sulfur amino acid deprivation in cadmium chloride toxicity in hepatoma cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology.*, 22, pp. 334-7.
- FOX, J., MA, L., NELSON, K., SHERMAN, N., & SERRANO, S. (2006). Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. *Toxicon*, 47, pp. 700-14.
- FRANCIS, B., DA SILVA JR, J., SEEBART, C., CASAS E SILVA, L., SCHMIT, J., & KAISER, I. (1997). Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipase A2 and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon*, 35, pp. 1193-203.
- FRANCIS, B., WILLIAMS, E., & SEEBART, C. e. (1993). Protein isolated from the venom of the common tiger snake (*Notechis s.scutatus*) promote hypotension and hemorrhage. *Toxicon*, 31, pp. 447-58.
- FRESHNEY, N. e. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of hsp27. *Cell Press*, 78, pp. 1039-1049.
- FRY, B. (1999). Structure-function properties of venom components from Australian elapids. *Toxicon.*, 37, pp. 11-32.
- FRY, B., ROELANTS, K., CHAMPAGNE, D., SCHEIB, H., TYNDALL, J., KING, G., . . . DE LA VEGA, R. (2009). The Toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu. Rev. Genom. Humsn Gene.*, 10, pp. 483-511.

- GEIGER, J., MELCHER, T., KOH, D., & al., e. (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*, 15, pp. 193-204.
- GELFUSO, E., CUNHA, A., MORTARI, M., LIBERATO, J., PARAVENTI, K., BELEBONI, R., . . . DOS SANTOS, W. (2007). Neuropharmacological profile of FrPbAII, purified from the venom of the social spider *Parawixia bistriata* (Araneae, Araneidae), in wistar rats. *Life Science*, 80, pp. 566-72.
- GENOUX, D., & MONTGOMERY, J. (2007). Glutamate receptors plasticity at excitatory synapses in the brain. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34, pp. 1053-63.
- GEVAERT, K., & VANDEKERCKHOVE, J. (2000). Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis*, 21, pp. 1145-54.
- GIBBS, J., SOMBATI, S., DELORENZO, R., & COULTER, D. (1997). Physiological and pharmacological alterations in postsynaptic GABA A receptor function in a hippocampal culture model of chronic spontaneous seizures. *J. Neurophysiol.*, 77, pp. 2139-52.
- GIRISH, K., SHASHIDHARAMURTHY, R., NAGARAJU, S., GOWDA, T., & KEMPARAJU, K. (2004). Isolation and characterization of hyaluronidase a "spreading factor" from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie*, 86, pp. 193-202.
- GLISH, G., & VACHET, R. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature*, 2, pp. 140-50.
- GOLDBERG, A., GREENBERG, M., & DARNEY, P. (2001). Misoprostol and pregnancy. *Engl. j. Med.*, 344, pp. 38-47.
- GÓMEZ-VILLAFUERTE, R., DEL PUERTO, A., DÍAZ-HERNÁNDEZ, M., BUSTILLO, D., DÍAZ-HERNÁNDEZ, J., HUERTA, P., . . . MIRAS-PORTUGAL, M. (2009). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependet kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritogenesis in neuroblastoma cells. *FEBS J.*, 276, pp. 5307-25.
- GREIG, A., DONEVAN, S., MUJTABA, T., PARKS, T., & RAO, M. (2000). Characterization of the AMPA-activated receptors present on motoneuron. *J. Neurochemistry*, 79, pp. 179-91.
- GROMOVA, H., CHUBAKOV, A., CHUMASOV, E., & KONOVALOV, H. (1983). Serotonin as a stimulator of hippocampal cell differentiation in tissue culture. *Journal of Developmental Neuroscience*, pp. 339-49.

- GUIMARÃES, L., & COLLINS, C. (1997). Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Em C. COLLINS, G. BRAGA, & P. (. BONATO, *Introdução a métodos cromatográficos* (pp. 183-236). Campinas, SP: Unicamp.
- GUTIÉRREZ, J., ROJAS, G., DA SILVA JR, N., & NÚÑEZ, J. (1992). Experimental mycrocrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snake). *Toxicon*, 30, pp. 1299-1302.
- GUTIÉRREZ-MARTÍN, Y., BUSTILLO, D., GÓMEZ-VILLAFUERTES, R., SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J., TORREGROSA-HETLAND, C., BINZ, T., . . . ARTALEJO, A. (2011). P2X7 receptors trigger ATP exocytosis and modify secretory vesicle dynamics in Neuroblastoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, pp. 11370-81.
- HANASAKI, K. (2004). Mammalian Phospholipase A2: phospholipase A2 receptor. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, pp. 1165-67.
- HARRIS, K., & STEVENS, J. (1989). Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neuroscience*, 9, pp. 2982-97.
- HARRIS, K., & SULTAN, P. (1995). Variation in the number, localization and size of synaptic vesicles provides an anatomical basis for the nonuniform probability of release at hippocampus CA1 synapses. *Neuropharmacology*, 34, pp. 1387-95.
- HARVEY, A. (2001). Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon*, 39, pp. 15-26.
- HARVEY, M., APARICIO, E., & GONZALEZ, A. (2003). Revision of the venomous snakes of Bolivia: Part I. The coralsnakes (Elapidae: *Micrurus*). *Annals of Carnegie Museum*, 72, pp. 1-52.
- HERRERA, M., FERNÁNDEZ, J., VARGAS, M., VILLALTA, M., SEGURA, Á., LEÓN, G., . . . GUTIÉRREZ, J. (2012). Comparative proteomic analysis of the venom of the taipan snake, *Oxyuranus scutellatus*, from Papua New Guinea and Australia: role of neurotoxic and procoagulant effects in venom toxicity. *J. Proteomics*, 75, pp. 2128-40.
- HIGASHI, H., GUIDOLIN, R., CARICATI, C., FERNANDES, I., MARCELINO, J., MORAIS, J., . . . TAKEHARA, H. (1995). Antigenic cross-reactivity among components of Brazilian Elapidae snake venoms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28, pp. 767-71.
- HODGSON, W., & WICKJRAMARATNA, J. (2006). Snake venoms and their toxins: An Australian perspective. *Toxicon*, 48, pp. 931-40.
- ISAAC, J., NICOLL, R., & MALENKA, R. (1995). Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron*, 15, pp. 427-34.

- JERUSALINSKY, D., KORNISIUK, E., ALFARO, P., QUILLFELDT, J., ALONSO, M., VERDE, E., . . . HARVEY, A. (1998). Muscarinic toxin selective for M4 receptors impairs memory in the rat. *Learning and Memory*, 9, pp. 1407-11.
- JOHNSON, J., & ASCHER, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, pp. 529-31.
- JOLKKONEN, M., VAN GIERSBERGEN, P., HELLMAN, U., WERNSTEDT, C., ORAS, A., SATYAPAN, N. A., & KARLSSON, E. (1995). Muscarinic toxins from the black mamba *Dendroaspis polylepis*. *Journal of Biochemistry.*, 234, pp. 579-85.
- KANDELL, E., SCHUWARTZ, J., & JESSEL, T. (2003). *Princípios da Neurociências*. Barueri, SP: Manole.
- KANG, K., YAMABE, N., WEN, Y., FUKUI, M., & ZHU, B. (2013). Beneficial effects of natural phenolics on Levodopa methylation and oxidative neurodegeneration. *Brain Res.*, 1497, pp. 1-14.
- KARLSSON, D., JOLKKONEN, M., MULUGETA, E., ONALI, P., & ADEM, A. (2000). Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie.*, 82, pp. 793-806.
- KATTAH, L., FERRAZ, V., SANTORO, M., CAMARGOS, E., DINIZ, C., & DE LIMA, M. (2002). Analysis of fatty acids releases by cronotoxin in rat brain synaptosomes. *Toxicon*, 40, pp. 43-9.
- KATZ, B., & MILEDI, R. (1970). Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J. Physiology*, 207, pp. 789-801.
- KEIZER, D., WEST, P., LEE, E., YOSHIKAMI, D., OLIVERA, M., BULAJ, G., & NORTON, R. (2003). Structural basis for tetrodotoxin-resistant sodium channel binding by u-conotoxin SmIIIa. *The Journal of Biological Chemistry.*, 278, pp. 46805-13.
- KIM, H., KIM, T., CHOI, S., HONG, Y., YANG, J., SUNG, K.-W., . . . YOON, S. (2013). Fluoxetine suppresses synaptically induced  $[Ca^{2+}]_i$  spikes and excitotoxicity in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Research*, 1490, pp. 23-34.
- KINI, e. a. (19 de novembro de 2009). *US Patente N° 2009/0285825 A1*.
- KINI, M. e. (11 de março de 2010). *US Patente N° 2010/0062980 A1*.
- KINI, R. (2002). Molecular moulds with multiple missions: functional sites in three-finger toxins. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology.*, 29, pp. 815-22.

- KINI, R., & DOLEY, R. (2010). Structure, function, and evolution of three-fingers toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon*, 56, pp. 855-67.
- KITCHENS, C., & VAN MIEROP, L. (1987). Envenomation by the eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*): a study of 39 victims. *Journal American Medicine Animal.*, 258, pp. 1615-18.
- KOH, D., ARMUGAM, A., & JEYASEELAN, K. (2006). Snake venom components and their application in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Science.*, 63, pp. 3030-41.
- KUBOWISTZ, F., & OTT, C. (1943). Isolierung and krystallisation eines garugferments aus tumoren. *Biochem Z.*, 319, pp. 94-117.
- LAMBEAU, G., ANCIAN, P., NICOLAS, J.-P., BEIBOERS, S., MOINIER, D., VERHEIJ, H., & LAZDUNSKI, M. (1995). Structural elements of secretory Phospholipase A2 involved in the binding to M-type receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, pp. 5534-40.
- LAU, A., & TYMIANSKI, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Eur. J. Physiology.*, 460, pp. 525-42.
- LARRÉCHÉ, S., MION, G., CLAPSON, P., DEBIEN, B., WYBRECHT, D., & GOYFFON, M. (2008). Neurotoxins from snake venom. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation.*, 27, pp. 310-316.
- LEÃO, L., HO, P., & JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. (2009). Transcriptomic basis for a antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics.*, 10, pp. 1-14.
- LEDREUX, A., KRYS, S., & BERNARD, C. (2009). Suitability of the Neuro-2A cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins). *Toxicon*, 53, pp. 300-8.
- LEÓN-OTEGUI, M. e. (2011). Opposite effects of P2X7 and P2Y2 nucleotide receptors on a-secretase-dependent. *FEBS Letters*, 585, pp. 2255-62.
- LI, J., ZHANG, M., SUN, B., XING, G., SONG, Y., GUO, H., . . . ZHAO, Y. (2012). Separation and purification of fullerenols for improved biocompatibility. *Carbon*, 50, pp. 460-9.
- LIMA, A., CAMPOS, C., & RIBEIRO, J. (mai-jun de 2009). Perfil epidemiológico de acidentes ofídicos do estado do Amapá. *Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.*, 42, pp. 329-35.
- LIMA, J., MARTELLI JR., H., MARTELLI, D., DA SILVA, M., DE CARVALHO, S., CANELA, J., & BONAN, P. (set-out de 2009). Perfil dos acidentes ofídicos no



- norte do estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.*, 42, pp. 561-64.
- LIOT, G., BOSSY, B., & LUBITZ, S. e. (2009). Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ*, 16, pp. 899-909.
- LIU, S., & CULL-CANDY, S. (2000). Synaptic activity at calcium-permeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype. *Nature*, 405, pp. 454-58.
- LOMEU, R. (2014). Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. *Toxicon*, 85, pp. 5-16.
- LOWRY, O., ROSENBROUGH, N., FARR, A., & RANDALL, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, pp. 265-75.
- LU, Y., YIN, H., CHIANG, J., & WEISS, J. (1996). Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA/kainate and NMDA channels: high rate of Ca<sup>2+</sup> influx underlies potent induction of injury. *Journal of Neuroscience*, 16, pp. 5457-65.
- LUETJENS, C., BUI, N., SENGPHEL, B., MÜNSTERMANN, G., POPPE, M., KROHN, A., . . . PREHN, J. (2000). Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *J. NEUROSCI.*, 20, pp. 5715-23.
- MANENT, J., & REPRESA, A. (2007). Neurotransmitter and brain maturation: early paracrine actions of GABA and glutamate modulate neuronal migration. *Neuroscientist.*, 13, pp. 268-79.
- MANOCK, S., SUAREZ, G., GRAHAM, D., AVILA-AGUERO, M., & WARREL, D. (2008). Neurotoxic Envenoming by South American Coral Snake (*Micrurus lemniscatus helleri*): case report from Eastern Ecuador and review. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.*, 102, pp. 1127-32.
- MARCHOT, P., PROWSE, C., KANTER, J., CAMP, S., ALKERMANN, E., RADIC, Z., . . . TAYLOR, P. (1997). Expression and activity of mutants of fasciculins, a peptidic acetylcholinesterase inhibitor from Mamba venom. *The Jour. of Biol. Chemistry*, 272, pp. 3502-10.
- MARGRES, M., ARONOW, K., LOYACANO, J., & ROKYTA, D. (2013). The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC Genomics.*, 14, pp. 1-18.
- MARKS, S., MANNELLA, C., & SCHAER, M. (1990). Coral snake envenomation in the dog: report of four cases and review of the literature. *Journal American Animal Hospital.*, 26, pp. 629-34.

- MATTSON, J. M., BARGER, S., BEGLEY, J., & MARK, R. (1995). Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol.*, 46, pp. 187-216.
- MATUTE, C., ALBERIDI, E., IBARRETXE, G., & SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. (2002). Excitotoxicity in glia cells. *Eur. J. Pharmacology.*, 447, pp. 239-46.
- MAYER, M., & VYKLICKY Jr, L. (1989). The action of zinc on synaptic transmission and neuronal excitability in cultures of mouse hippocampus. *J. Physiology*, 415, pp. 351-65.
- MAYER, M., WESTBROOK, G., & GUTHRIE, P. (1984). Voltagem-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309, pp. 261-63.
- McALLISTER, J., SANGEETA, G., BERRY, D., PARK, M., SADEGHI, S., WANG, K., . . . SWERDLOW, R. (2008). Effects of Memantine on mitochondrial function. *Biochem. Pharmacology.*, 75, pp. 956-64.
- McDOWELL, R., DENNIS, M., LOUIE, A., SHUSTER, M., MULKERRIN, M., & LAZARUS, R. (1992). Mambin, a potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor structurally related to the short neurotoxins. *Biochemistry*, 31, pp. 4766-72.
- McKENNA, M. (2007). The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J. Neuroscience Research.*, 85, pp. 3347-58.
- McKENNA, M., TILDON, J., STEVENSON, J., BOATRIGH, R., & HUANG, S. (1993). Regulation of energy metabolism in synaptic terminal and culture rat brain astrocytes: differences revealed using aminooxyacetate. *Dev. Neuroscience.*, 15, pp. 320-29.
- McKINNEY, R. (2010). Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. *Journal Physiology.*, 588, pp. 107-16.
- MCMAHON, H., & NICHOLLS, D. (1991). The bioenergetics of neurotransmitter release. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1059, pp. 243-64.
- MÉNDES, I. e. (2011). Comparative study of the cytolytic activity of snake venoms from African spitting cobras (*Naja* spp., Elapidae) and its neutralization by a polyspecific antivenom. *Toxicon*, 58, pp. 558-64.
- MÉNEZ, A., STÖCKLIN, R., & MEBS, D. (2006). Venomics or: The venomous systems genome project. *Toxicon*, 47, pp. 255-59.
- METHFESSEL, C. e. (17 de outubro de 2002). *Estados Unidos Patente N° 2002/0150975A1*.

- MEYER, E., & OTERO, D. (1985). Pharmacological and ionic characterizations of the muscarinic receptors modulating [3H] acetylcholine release from rat cortical synaptosomes. *J. Neuros.*, 5, pp. 1202-07.
- MILLERS, E.-K., JOHNSON, L., BIRREL, G., MASCI, P., LAVIN, M., & JERSEY, J. (2013). The structure of Humam Microplasmin in complex with Textilinin-1, an Aprotinin-like inhibitor from the Australian Brown Snake. *PLOS ONE*, 8.
- MONSMA JR, F., BRASSARD, D., & SIBLEY, D. (1989). Identification and characterization of D1 and D2 dopamine receptors in cultured neuroblastoma and retinoblastoma clonal cell lines. *Brain Research*, 492, pp. 314-24.
- MONTANDON, A. (2013). 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), por algumas de suas Frações Semi-purificadas. 135p. Belo Horizonte/MG.
- MORAES, F., SOUSA-E-SILVA, M., BARBARO, K., LEITÃO, M., & FURTADO, M. (2003). Biological and immunochemical characterization of *Micrurus altirostris* venom and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon.*, 41, pp. 71-9.
- MORALES-VILLAGRAN, & TAPIA, R. (1996). Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochemistry International*, 28, pp. 35-40.
- MORDVINTSEV, D., D.I., R., MAKAROVA, M., KAMENSKY, A., LEVTSKAYA, N., OGAY, A., . . . UTKIN, Y. (2007). Behavioral effects in mice and intoxication symptomatology of weak neurotoxin from cobra *Naja kaouthia*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 100, pp. 273-78.
- MORDVINTSEV, D., POLYAK, Y., RODIONOV, D., JAKUBIK, J., DOLEZAL, V., KARLSSON, E., . . . UTKIN, Y. (2009). Weak toxin WTX from *Naja kaouthia* cobra venom interacts with both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *FEBS J.*, 276, pp. 5065-75.
- MOREIRA, K., PRATES, M., ANDRADE, F., SILVA, L., BEIRÃO, P., KUSHMERICK, C., . . . BLOCH JR, C. (2010). Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. *Toxicon*, 56, pp. 55-63.
- MORGAN, D., BORYS, D., STANFORD, R., KJAR, D., & TOBLEMAN, W. (2007). Texas Coral Snake (*Micrurus tener*) bites. *Southern Medical Journal*, 100, pp. 152-56.

- MORRIS, R. (1989). Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by N-methyl-D-aspartate antagonist AP5. *J. Neuroscience*, 9, pp. 3040-57.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, pp. 55-63.
- MOUHAT, S., JOUIRON, B., MOSBAH, A., DE WAAARD, M., & SABATIER, J.-M. (2004). Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Journal of Biochemistry*, 378, pp. 717-26.
- MOURA, R. A., WADA, C., PURCHIO, A., & ALMEIDA, T. (2008). *Técnicas de Laboratórios* (3. ed. ed.). Rio de Janeiro: Atheneu.
- MS, M. d.-S., & [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual\\_aap.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_aap.pdf), 2. C. (2012). Acesso em 05 de dezembro de 2013, disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual\\_aap.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_aap.pdf), 2012. Caderno 14.
- MULUGUETA, E., KARLSSON, E., ISLAM, A., KALARI, R., MANGAT, H., WINBLAD, B., & ADEM, A. (2003). loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Research*, 960, pp. 259-62.
- MUNAWAR, A., TRUSCH, M., GEORGIEVA, D., HILDEBRAND, D., KWIATKOWSKI, M., BEHNKEN, H., . . . BETZEL, C. (2014). Elapidic snake venom analyses show the specificity of the peptide composition at the level of genera *Naja* and *Notechis*. *Toxins*, 6, pp. 850-68.
- MURAMAKI, M., TAKETOMI, Y., MIKI, Y., SATO, H., HIRABAYASHI, T., & YAMAMOTO, K. (2011). Recent progress in PLA2 research: from cells to animals to humans. *Prog. Lipid. Research*, 50, pp. 152-92.
- MURPHY, A. e. (1999). Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup>-mediated mitochondrial dysfunction in neural cell death. *Biochem Soc Symp.*, 66, pp. 334-41.
- NICHOLLS, D. (1995). *Proteins, Transmitters and Synapses*. Oxford: Blackwell Science.
- NICHOLLS, D., & SIHRA, T. (1986). Synaptosomes possess an exocytotic pool of glutamate. *Nature*, 321, pp. 772-73.
- NICHOLLS, D., SIHRA, T., & SANCHEZ-PIETRO, J. (1987). Calcium-dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.*, 49, pp. 50-7.

- NICIU, M., KELMENDI, B., & SANACORA, G. (2010). Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.*, 100, pp. 656-64.
- NIRTHANAN, S., CHARPANTIER, E., GOPALAKRISHNAKONE, P., GWEE, M., KHOO, H., CHEAH, L., . . . KINI, R. (2002). Cadoxin, a novel toxin from *Bungarus candidus*, is a reversible antagonist of muscle (alphabeta $\gamma$ ) but a poorly reversible antagonist of neuronal  $\alpha$ -7 nAChR. *J. Biol. Chem.*, 277, pp. 17811-20.
- NIRTHANAN, S., GOPALAKRISHNAKONE, P., GWEE, M., KHOO, H., & KINI, R. (2003). Non-conventional toxins from Elapid venoms. *Toxicon*, 41, pp. 397-407.
- NUNES, C. S. (2012). Análise da liberação de L-glutamato de sinaptosomas de córtex cerebral de rato pela toxina PnTx2-6 da peçonha da aranha armadeira (*Phoneutra nigriventer*). Avaliação inicial da atividade do peptídeo sintético (PnTx-19) na liberação de L-glutamato. Belo Horizonte, MG, Brasil: Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia. ICB/UFMG.
- OLAMENDI-PORTUGAL, T., BATISTA, C., RESTANO-CASSULINI, R., PANDO, V., VILLA-HERNANDEZ, O., ZAVALA-MARTÍNEZ-VARGAS, A., . . . POSSANI, L. (2008). Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*. Novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*, 8, pp. 1919-32.
- OLIVEIRA, D., HARASAWA, C., SEIBERT, C., CASAS E SILVA, L., PIMENTA, D., LEBRUN, I., & SANDOVAL, M. (2008). Phospholipase A2 isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: behavioral, electroencephalographic, and neurophysiological aspects. *Brain Research Bulletin.*, 75, pp. 629-39.
- OLIVEIRA, J., SILVA, A., SOARES, M., STEPHANO, M., DIAS, W., & HO, P. (2000). Cloning and characterization of an alpha-neurotoxin-type protein specific for the coral snake *Micrurus corallinus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 267, pp. 887-91.
- OLIVEIRA, U., ASSUI, A., DA SILVA, A., DE OLIVEIRA, J., & HO, P. (2003). Cloning and characterization of a basic phospholipase A2 homologue from *Micrurus corallinus* (coral snake) venom gland. *Toxicon*, 42, pp. 249-55.
- OLNEY, J. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.*, 164, pp. 719-21.
- OLNEY, J., COLLINS, R., & SLOVITER, R. (1986). Excitotoxicity mechanism of epileptic brain damage. *Adv. Neurol.*, 44, pp. 857-77.
- OSIPOV, A., KASHEVEROV, I., MAKAROVA, Y., STARKOV, V., VORONTSOVA, O., ZIGANSHIN, R., . . . UTKIN, Y. (2008). Naturally

occurring disulphide-bond dimers of three-fingered toxins: a paradigm of biological activity diversification. *J. Biol. Chem.*, 283, pp. 14571-580.

- OSIPOV, A., STAPOVA, M., TSETLIN, V., & UTKIN, Y. (2004). The first representation of glycosylated three-fingers toxins. Cytotoxin from the *Naja kaouthia* cobra venom. *European J. Biochem.*, 271, pp. 2018-27.
- OTERO, D., WILBEKIN, F., & MEYER, E. (1985). Effects of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (AH5183) on rat cortical synaptosome choline uptake, acetylcholine storage and release. *Brain Research*, 359, pp. 208-14.
- OWNBY, C. L., SELISTRE DE ARAUJO, H. S., WHITE, S. P., & FLETCHER, J. E. (1999). Lysine 49 phospholipase A2 proteins. *Toxicon*, 37, pp. 411-45.
- PAGNUSSAT, A. (2005). Caracterização da morte celular em neurônios da região CA1 o hipocampo de ratos submetidos a isquemia global transitória e reperfusão. Dissertação de Mestrado. p. 87 p. .
- PAHARI, S., MACKESSY, S., & KINI, M. (2007). The venom gland transcriptome of the Desert Massauga Rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of the venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea). *BMC Mol. Biol.*, 8, p. 115.
- PARDAL, P., PARDAL, J., GADELHA, M., RODRIGUES, L., FEITOSA, D., PRUDENTE, A., & FAN, H. (Nov-Dec de 2010). Envenomation by *Micrurus Coral* Snakes in the Brazilian Amazon Region: Report of two Cases. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 52, pp. 333-37.
- PARRI, H., HERNANDEZ, C., & DINGLEY, K. (2011). Research update: alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mechanisms in Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.*, 82, pp. 931-42.
- PAWLAK, J., MACKESSY, S., FRY, B., BHATIA, M., MOURIER, G., FRUCHART-GAILLARD, C., . . . KINI, R. (2006). Denmotoxin, a three-finger toxin from the Colubrid snake *Boiga dendrophila* (Mangrove catsnake) with bird -specific activity. *J. Biol. Chem.*, 281, pp. 29030-41.
- PAWLAK, J., MACKESSY, S., SIXBERRY, N., STURA, E., LE DU, M., MENEZ, R., . . . KINI, R. (2008). Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity. *FASEB J.*, 23, pp. 534-45.
- PAXINOS, G. (2004). *The rat neurons system*. (3.ed. ed.). London: Oval Road.
- PEREIRA-FILHO, G. (2007). Composição faunística, ecológica e História natural de uma Taxocenose de Serpentes de Floresta Atlântica da Paraíba, Brasil. *Dissertação de Mestrado*, 156P. João Pessoa, PB: UFPB.

- PERKINS, J., & TOMER, K. (1995). Characterization of the lower-molecular-mass fraction of venoms from *Dendroaspis jamesoni kaimosae* and *Micrurus fulvius* using capillary-electrophoresis electrospray mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.*, 233, pp. 815-27.
- PETERSON, M., & DVM, M. (2006). Snake bite: coral snakes. *Clinical Techniques in small animal practice.*, pp. 183-86.
- PETTMANN, B. e. (1998). Neuronal cell death. *Neuron*, 20, pp. 633-47.
- PIMENTA, A., DE MARCO, A., DE LIMA, M., MARTIN-EAUCLAIRE, M., & BOUGIS, P. (2003). Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, pp. 413-18.
- PIMENTA, A., STÖCKLIN, R., FAVREAU, P., BOUGIS, P., & MARTINS-EAUCLAIRE, M. (2001). Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15, pp. 1562-72.
- PINHEIRO, A., DA SILVA, A., PRADO, M., CORDEIRO, M., RICHARDSON, M., BATISTA, M., . . . GOMEZ, M. (2009). Phoneutra spider toxins block ischemia-induced glutamate release neuronal death and loss neurotransmission in hippocampus. *Hippocampus.*, 19, pp. 1123-29.
- PINHEIRO, P., & MULLE, C. (2008). Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanism action. *Nature Reviews Neurosc.*, pp. 1-14.
- PINHO, F., OLIVEIRA, E., & FALEIROS, F. (2004). Acidente ofídico no estado de Goiás. *Revista da Associação Médica Brasileira* ., 50, pp. 93-6.
- PIRES, M. (2011). Revisão taxonômica do Complexo *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Elapidae).(Tese de doutorado). São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.Área: Zoologia.
- PIRES, M., DA SILVA JR., N., FEITOSA, D., PRUDENTE, A., PEREIRA FILHO, G., & ZAHER, H. (2014). A new species of triadal coral snake of the genus *Micrurus* Wagler, 1824 (Serpentes: Elapidae) from northeastern Brazil. *Zootaxa*, 3811, pp. 569-84.
- POH, S., MOURIER, G., THAI, R., ARMUGAM, A., MOLGO, J., SERVENT, D., . . . MENEZ, A. (2002). A synthetic weak neurotoxin binds with low affinity to Torpedo and chicken  $\alpha 7nAChR$ . *Eur. J. Biochem.*, 269, pp. 4247-56.
- POSSANI, L., ALAGÓ, A., FLETCHER JR, P., VARELA, M., & JULIÁ, J. (1979). Purification and characterization of a Phospholipase A2 from the venom of the coral snake, *Micrurus fulvius microgalbineus* (Brown and Smith). *Biochem. Journal*, 179, pp. 603-6.

- PRASARNPUN, S., AWAD, W., & HARRIS, J. (2005). Envenoming bites by kraits: the biological basis of treatment-resistant neuromuscular paralysis. *Brain*, *128*, pp. 2987-96.
- PU, X., & WONG, P. E. (1995). A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon*, *33*, pp. 1425-31.
- PUNG, Y., KUMAR, S., RAJAGOPALAN, N., FRY, B., KUMAR, P., & KINI, R. (2006). Ohanin, a novel protein from king cobra venom: its cDNA and genomic organization. *Gene*, *371*, pp. 246-56.
- RAJAGOPALAN, N., PUNG, Y., WONG, P., KUMAK, P., & KINI, R. (2007). Beta-cardiotoxin: a new three-finger toxin from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom with betha-blocker activity. *FASEB J.*, *21*, pp. 3685-95.
- RAJKOWSKA, G., SELEMON, L., & GOLDMAN-RAKIC, P. (1998). Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and HUNtington disease. *Arch. Gen. Psychiatr.*, *55*, pp. 215-24.
- RAMMSAYER, T. (2006). Effects of pharmacologically induced changes in NMDA receptor activity on human timing and sensorimotor performance. *Brain Research*, *16*, pp. 1073-74: 407-16.
- RATES, B. (2011). Análise peptidômica de venenos animais. Tese de doutorado. 126p. Belo Horizonte, MG: Depto de Bioquímica e Imunologia. ICB/UFMG.
- RATES, B., BEMQUERER, M., RICHARDSON, M., BORGES, M., MORALES, R., & DE LIMA, M. (2007). Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata* (Centipepe, Scolopendromorpha): shedding light on venoms from a neglected group. *Toxicon*, *49*, pp. 810-26.
- REED, U. (2002). Doenças neuromusculares. *Jornal de Pediatria.*, *78. Supl1.*, pp. S89-103.
- REIS, H., PRADO, M., KALAPOTHAKIS, E., CORDEIRO, M., DINIZ, C., DE MARCO, L., . . . ROMANI-SILVA, M. A. (1999). Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3-4) from the spider a *Phoneutra nigriventer*. *Biochem. J.*, *343*, pp. 413-18.
- RENZI, D., VALTONILA, M., & FOSTER, R. (1993). The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *Alternative to Laboratory Animals*, *21*, pp. 89-96.
- REY-SUÁREZ, P., FLORIANO, R., ROSTELATO-FERREIRA, S., SALDARRIAGA, -C. M., NÚÑEZ, V., RODRIGUES-SIMIONI, L., & LOMONTE, B. (2012). Mipartoxin-1, a novel three-finger toxin, is the major component in the venom of the redtail coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae). *Toxicon*, *60*, pp. 851-63.



- REY-SUÁREZ, P., NÚÑEZ, V., GUTIÉRREZ, J., & LOMONTE, B. (2011). Proteomic and biological characterization of the venom of the redbtail coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *J. Proteomics.*, 75, pp. 655-67.
- ROCK, D., & MACDONALDO, R. (1992). The polyamine spermine has multiple actions on N-methyl-D-aspartate receptor single-channel currents in cultured cortical neurons. *Mol. Pharmacol.*, 41, pp. 83-8.
- ROGAWSKI, M., & WENK, G. (2003). The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.*, 9, pp. 275-308.
- ROJAS, C., GONÇALVES, M., & ALMEIDA-SANTOS, S. (2007). Epidemiology of snakebite in the northwestern region the state of São paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Saúde e Produtividade.*, 8, pp. 193-204.
- ROLLENHAGEN, A., & LÜBKE, J. H. (2006). The morphology of excitatory central synapses: from structure to function. *Cell Tissue Res.*, 326, pp. 221-37.
- ROSSO, J.-P., VARGAS-ROSSO, O., GUTIÉRREZ, J., & ROCHAT, H. B. (1996). Characterization of a alpha-neurotoxin and phospholipase A2 activities from *Micrurus* venoms. *Eur. J. Biochem.*, 238, pp. 231-39.
- ROZAS, E. E. (2008). Intracellular increase of glutamate in neuroblastoma cells induced by polar substances of *Galaxaura marginata* (Rhodophyta, Nemaliales). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(1), pp. 53-62.
- ROZE, J. (1982). New world coral snake (Elapidae): a taxonomic and biological summary. *Mem. Inst. Butantan.*, 46, pp. 305-38.
- RUBERG, M. e. (1997). Neuronal death caused by apoptosis in Parkinson's disease. *Rev. Neurol.*, pp. 499-508.
- SAHA, A., GOMES, A., CHAKRAVARTY, A., BISWAS, A., GIRI, B., DASGUPTA, S., & GOMES, A. (2006). CNS and anticonvulsant activity of a non-protein toxin (KC-MMTx) isolated from King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Toxicon*, 47, pp. 296-303.
- SALAZAR, A., VIVAS, J., SÁNCHEZ, E., RODRÍGUES-ACOSTA, A., IBARRA, C., GIL, A., . . . GUERRERO, B. (2011). Hemostatic and toxicological diversities in venom of *Micrurus tener tener*, *Micrurus fulvius fulvius* and *micrurus isozonus* coral snakes. *Toxicon*, 58, pp. 35-45.
- SANTOS, D., VERLY, M., PILO-VELOSO, D., DE MARIA, M., DE CARVALHO, M., CISALPINO, P., . . . DE LIMA, M. (2010). LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. *Amino Acids.*, 39, pp. 135-44.

- SATTLER, R., XIONG, Z., & LU, W. e. (1999). Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, 284, pp. 1845-48.
- SAÚDE, M. D. (24 de abril de 2014). [http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/animaisp/bases/anima isbrnet.def](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/animaisp/bases/anima%20isbrnet.def). Acesso em 16 de julho de 2014, disponível em Acidentes por animais peçonhentos. SINAN net.
- Saúde., M. d. (2013). *Ministério da Saúde*. Acesso em 28 de setembro de 2014, disponível em Ministério da Saúde: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/11/Maleato-de-enalapril.pdf>
- Saúde., S. d. (2004). DISTRIBUIÇÃO E UTILIZAÇÃO DE SOROS ANTIOFÍDICOS NO BRASIL, 2001 A 2003. Brasília, Brasil: Ministério da Saúde.
- SCHLETT, K. (2006). Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. *Current Topics Medicinal Chemistry*, 6, pp. 949-60.
- SCHLUMBERGER, W., HORNIG, N., LANGE, S., PROBST, C., KOMOROWSKI, L., FECHNER, K., . . . STÖCKER, W. (2014). Differential diagnosis of membranous nephropathy with autoantibodies to phospholipase A2 receptors. *Autoimmunity Reviews*, 13, pp. 108-13.
- SCHULER, L., PASTUSZAK, A., SANSEVERINO, T., ORIOLI, L., BRUNONI, D., ASHTON-PROLLA, P., . . . KOREN, G. (1999). Pregnancy outcome after expose to misoprostol in Brazil: a prospective, controlled study. *Reprod. Toxicol.*, 13, pp. 147-51.
- SCHWEITZ, H., PACAUD, P., DIOCHOT, S., MOINIER, D., & LAZDUNSKI, M. (1999). MIT1, a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Lett.*, 461, pp. 183-88.
- SELING, D., & MALENKA, R. (1997). Extracellular field potential recording in brain slices. *AxoBits*, 20, pp. 7-10.
- SERAFIM, F., REALI, M., CRUZ-HOFLING, M., & FONTANA, M. (2002). Action of *Micrurus dumerilii crinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. *Toxicon*, 40, pp. 167-74.
- SERRANO, S., & MAROUN, R. (2005). Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, 45, pp. 1115-32.
- SERVENT, D., & FRUCHART-GAILLARD, C. (2009). Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J. of Neurochemistry*, 109, pp. 1193-202.

- SERVENT, D., WINCKLER, D. V., HU, H., KESSLER, P., DREVET, P., BERTRAND, D., & MENEZ, A. (1997). Only snake curaremimetic toxins with a fifth disulphide bond have high affinity for the neuronal alpha 7 nAChR. *J. Biol. Chem.*, 272, pp. 24279-86.
- SHASHANK, D., & MURRAY, J. (2003). Fluorescent detection of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA/kainate receptor activation in murine neocortical neurons. *Neuroscience Letters*, 351, pp. 145-48.
- SHIREY, J., XIANG, Z., ORTON, D., BRADY, A., JOHNSON, K., WILLIAMS, R., . . . NISWENDER, C. C. (2008). An allosteric potentiator of M4 mAChR modulates hippocampal synaptic transmission. *Nature Chemical Biology*, 4, pp. 42-50.
- SHIU, J., CHEN, C., CHANG, L., CHEN, Y., LO, Y., LIU, Y., & CHUANG, W. (2004). Solution structure of gamma-bungarotoxin: the functional significance of amino acid residues flanking the RGD motif in integrin binding. *Proteins*, 57, pp. 839-49.
- SIANG, A., DOLEY, R., VONK, F., & KINI, M. (2010). Transcriptomic analysis of the venom gland of the red-headed krait (*Bungarus flaviceps*) using expressed sequence tags. *BMC Molecular Biology*, 11, pp. 1-12.
- SILVA, C. (2012). Análise da liberação de L-glutamato de sinaptossomas de córtex cerebral de rato pela toxina PnTx2-6 da peçonha da aranha armadeira (*Phoneutria nigriventer*). Avaliação inicial da atividade do peptídeo sintético (PnTx-19) na liberação de L-glutamato. *Dissertação de Mestrado*, 112p. Belo Horizonte, MG: UFMG.
- SILVA, M. C. (2013). Investigação da atividade muscarínica da peçonha da serpente *Micurus lemniscatus* em fêlo isolado de cobaia. (Dissertação de Mestrado). 111f. Belo Horizonte, MG, Brasil: Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia. ICB/UFMG.
- SINITOX/FIOCRUZ/MS. (29 de jan de 2014). <http://www.fiocruz.br/sinitox/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=386>. Acesso em 16 de jul de 2014, disponível em Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas.
- SIX, D. A., & DENNIS, E. A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488, pp. 1-19.
- SONG, I., & HUGANIR, R. (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neuroscience*, 25, pp. 578-88.

- SONNEWALD, U., & McKENNA, M. (2002). Metabolic compartmentation in cortical synaptosomes: influence of glucose and preferential incorporation of endogenous glutamate into GABA. *Neurochem. Res.*, 27, pp. 43-50.
- SOURENSE, B. (2000). *Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento*. São Paulo: Atheneu.
- SPADARO, A. (1997). Cromatografia por troca iônica. Em C. COLLINS, G. BRAGA, & P. BONATO, *Introdução a métodos cromatográficos*. (pp. 71-94). Campinas: UNICAMP.
- SPEEDING, M., NEAU, I., & HARSING, L. (2003). Brain plasticity and pathology in psychiatric disease: sites of action for potential therapy. *Current Opinion in Pharmacology.*, 3, pp. 33-40.
- SPEEDING, M., NEAU, I., & HARSING, L. (2003). Brain plasticity and pathology in psychiatric disease: sites of action for potential therapy. *Current Opinion in Pharmacology.*, 3, pp. 33-40.
- SPLAWSKI, I., TIMOTHY, K., SHARPE, L., DECHER, N., KUMAR, P., BLOISE, R., . . . KEATING, M. (2004). Cav1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell.*, 119, pp. 19-31.
- St PIERRE, L., WOODS, R., EARL, S., MASCI, P., & LAVIN, M. (2005). Identification and analysis of venom gland-specific genes from the coastal taipan (*Oxyuranus scutellatus*) and related species. *Cellular and Molecular Life Science.*, 62, pp. 2679-93.
- STANTON, K. (1996). LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus.*, 6, pp. 35-42.
- SÜDHOF, T. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neuroscience.*, 27, pp. 509-47.
- SUGIMURA, M., KITAYAMA, S., MORITA, K., IRIFUNG, M., TAKARADA, T., KAWAHARA, M., & DOHI, T. (2001). Effects of volatile and intravenous anesthetic on the uptake of GABA, glutamate and dopamine by their transporters heterologously expressed in COS cells and in rat brain synaptosomes. *Toxicol. Letters*, 123, pp. 69-76.
- SUZUKI, M., ITOH, T., BANDARANAYAKE, B., RANASINGHE, J., ATHAUDA, S., & MORIYAMA, A. (2010). Molecular diversity in venom proteins of the Russell's viper (*Daboia r. russellii*) and the Indian cobra (*Naja naja*) in Sri Lanka. *Biomedical Research.*, 31, pp. 71-81.
- SUZUKI, M., NELSON, A., EICKSTAEDT, J., WALLACE, K., WRIGHT, L., & SVENDSEN, C. (2006). Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in

- human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur. J. Neurosci.*, 24, pp. 645-53.
- SVENDSEN, C., SPURGEON, D., HANKARD, P., & WEEKS, J. (2004). A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, pp. 20-9.
- TAMBOUGI, D., SANTOS, M., FURTADO, M., FREITAS, M., SILVA, W., & KIPNIS, T. (1994). Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. *Brazilian Journal Pharmacology.*, 112, pp. 723-27.
- TAMIJI, J., & CRAWFORD, D. (2010). Misoprostol elevates intracellular calcium in Neuro-2A cells via protein kinase A. *Biochemical and Biophysical Research.*, 399, pp. 565-70.
- TAMIYA, N., & ABE, H. (1972). The isolation, properties and amino acid sequence of Erabutoxin c, a minor neurotoxic component of the venom of a sea snake *Laticauda semifasciata*. *Biochem. J.*, 130, pp. 547-55.
- TAMIYA, N., & ARAI, H. (1966). Crystallization of erabutoxins a e b from *Laticauda semifasciata* venom. *Biochem. J.*, 99, pp. 624-30.
- TANAKA, G., FURTADO, M., PORTARO, F., SANT'ANNA, O., & TAMBOURGI, D. (2010). Diversity of *Micrurus* Snakes Species Related to their Venom Toxic Effects and the Prospective of Antivenom Neutralization. *PLOS Neglected Tropical Diseases.*, 4, pp. 1-12.
- TENNETI, L., & LIPTON, S. (2000). Involvement of activated caspase-3-like proteases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J. Neurochem.*, 74, pp. 134-42.
- THAYE, S., & WANG, G. (1995). Glutamate-induced calcium loads: effects on energy metabolism and neuronal viability. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 22, pp. 303-4.
- THORNTON, D., JONES, K., JIANG, Z., ZHANG, H., LIU, G., & CORNWELL, D. (1995). Antioxidant and cytotoxic tocophenyl quinones in normal and cancer cells. *Free Radical Biology e Medicine.*, 18, pp. 963-76.
- TORRES, A., KINI, R., SELVANAYAGAM, N., & KUCHEL, P. (2001). NMR structure of bucandin, a neurotoxin from the venom of the Malayan krait (*Bungarus candidus*). *Biochem. J.*, 360, pp. 539-48.
- TORRES, F. (2011). Clonagem e expressão heteróloga de PnTx2-6, uma toxina ativa na função erétil. Obtenção e caracterização parcial de seus mutantes. (Tese de Doutorado). Belo Horizonte, MG, Brasil: Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia. ICB/UFMG.

- TSETLIN, V. (1999). Snake venom alpha-NTX and other 'three-finger' proteins. *European Journal Biochem.*, 264, pp. 281-6.
- TSETLIN, V., & HUCHO, F. (2004). Snake and snail toxins acting nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Letters*, 557, pp. 9-13.
- TSIEN, R., LIPSCOMBE, D., MADISON, D., BLEY, K., & FOX, A. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neuroscience.*, 11, pp. 431-38.
- TYMIANSKI, M., CHARLTON, M., & CARLEN, P. e. (1993). Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J. Neurosci.*, 13, pp. 2085-2104.
- URDANETA, A., BOLAÑOS, F., & GUTIÉRREZ, J. (2004). Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) on its natural prey in captivity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Parte C.*, 138, pp. 485-92.
- VALVERDE, F. (2002). Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex. *Rev Neurol.* , 34, pp. 758-80.
- VAN DER ZEE, E., & LUITEN, P. (1999). Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Progress in Neurobiology*, 58, pp. 409-71.
- VECINO, E., HERNÁNDEZ, M., & GARCIA, M. (2004). Cell death in the developing vertebrate retina. *Int. J. Dev. Biol.*, 48, pp. 965-74.
- VERGARA, I., PEDRAZA, -E. M., PANIAGUA, D., RESTANO-CASSULINI, R., ZAMUDIO, F., BATISTA, C., . . . ALAGÓN, A. (2014). Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipase. *J. Proteomics.*, 105, pp. 295-306.
- VERTES, R. P. (2002). Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J Comp. Neurol.*, 442, pp. 163-87.
- VIEIRA, L., KUSHMERICK, C., & REIS, H. e. (2003). PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K<sup>+</sup>-evoked increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release in synaptosomes. *Neurochemistry International*, 42, pp. 277-82.
- VIGNER, M., & COLLINGRIDGE, G. (1997). The synaptic activation of kainate receptors. *Nature*, 388, pp. 179-82.

- VITAL BRAZIL, O. (1987). Mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 29, pp. 119-26.
- VITAL BRAZIL, O., & VIEIRA, R. (jan/fev de 1996). Neostigmine in the treatment of snake accidents caused by *Micrurus frontalis*: report of two cases. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 38, pp. 61-7.
- WANG, G., & THAYER, S. (1996). Sequestration of glutamate-induced Ca<sup>2+</sup> loads by mitochondria in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.*, 76, pp. 1611-21.
- WANG, Y., & QIN, Z.-H. (2010). Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis.*, 15, pp. 1382-402.
- WANG, Y., GU, Z., & CAO, Y. e. (2006). Lysosomal enzyme cathepsin B is involved in kainic acid-induced excitotoxicity in rat striatum. *Brain Research*, 1071, pp. 245-49.
- WARREL, D. (2010). *Guidelines for the management of snake-bites*. WHO (Regional Office South-East Asia).
- WATANABE, Y., GOULD, E., DANIELS, D., CAMERON, H., & McEWEN, B. (1992). Tianeptine attenuates stress-induced morphological changes in the hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.*, 222, pp. 157-62.
- WHO. (2014). *Neglected tropical diseases*. (WHO) Acesso em 15 de julho de 2014, disponível em [www.who.int/neglected\\_diseases/disiases/snakebites/en](http://www.who.int/neglected_diseases/disiases/snakebites/en)
- WOOLLEY, C., & McEWEN, B. (1993). Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 336, pp. 293-306.
- W-P, T., & LIN-SHIAU, S.-Y. (2003). Calcium-activated NO production plays a role in neuronal death induced by beta-bungarotoxin in primary cultures of cerebellar granular neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 367, pp. 451-61.
- XU, C., MA, D., YU, H., LI, Z., LIANG, J., LIN, G., . . . LAI, R. (2007). A bactericidal homodimeric phospholipase A2 from *Bungarus fasciatus* venom. *Peptides*, 28, pp. 969-73.
- YAN, C.-H., YANG, Y.-P., QIN, Z.-H., GU, Z.-L., REID, P., & LIANG, Z.-Q. (2007). Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. *Acta Pharmcol Sin*, 28, pp. 540-48.
- YASUDA, O., MORIMOTO, S., CHEN, Y., JIANG, B., KIMURA, T., SAKAKIBARA, S., . . . OGIHARA, T. (1993). Calciseptine binding to a 1,4-dihydropyridine recognition site of the L-type calcium channel of rat synaptosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194, pp. 587-94.

- ZAMUDIO, F., WOLF, K., MARTINS, B., POSSANI, L., & CHIAPPINELLI, V. (1996). Two novel alpha-neurotoxins isolated from the Taipan snake, *Oxyuranus scutellatus*, exhibit reduced affinity for nicotinic acetylcholine receptors in brain and skeletal muscle. *Biochemistry*, 35, pp. 7910-16.
- ZAPPETTINI, S., GRILLI, M., OLIVERO, G., MURA, E., PREDA, S., GOVONI, S., . . . MARCHI, M. (2012). Beta amyloid differently modulate nicotinic and muscarinic receptor subtypes witc stimulate in vitro and in vivo the release of glycine in the rat hippocampus. *Frontier in Pharmacology.*, 3, pp. 1-9.
- ZHANG, L., ZHANG, Y., JIANG, D., REID, P., JIANG, X. Q., REID, P., . . . ZHANG, Y. (2012). Alpha-cobratoxin inhibits T-type calcium currents through muscarinic M4 reveptor and Go-protein betha gama subunits-dependent kinase A pathways in dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology*, 62, pp. 1062-72.
- ZHANG, Y., ZHANG, L., WANG, F., ZHANG, Y., WANG, J., QIN, Z., . . . TAO, J. (2011). Activation of M3 muscarinic receptor inhibits T-type Ca<sup>2+</sup> channel currents via pertussis toxin-sensitive novel protein kinase C pathway in small dorsal root ganglion neurons. *Cellular Signalling*, 23, pp. 1057-67.
- ZUCCO, F., DE ANGELIS, I., TESTAI, E., & STAMMATI, A. (2004). Toxicology investigations with cell culture system: 20 years after. *Toxicol in vitro.*, 18, pp. 153-63.