

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

**Investigação da atividade muscarínica do veneno da  
serpente *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) em óleo  
isolado de cobaia**

**MARCELA CRISTINE SILVA**

Belo Horizonte  
2013

MARCELA CRISTINE SILVA

**Investigação da atividade muscarínica do veneno da  
serpente *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) em íleo  
isolado de cobaia**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia e Farmacologia.

Área de Concentração: Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia

Co-orientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2013

043

Silva, Marcela Cristine.

Investigação da atividade muscarínica do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) em íleo isolado de cobaia [manuscrito] / Marcela Cristine Silva. - 2014.

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

Orientadora: Maria Elena de Lima Perez Garcia. Co-orientadora: Bagnólia Araújo da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

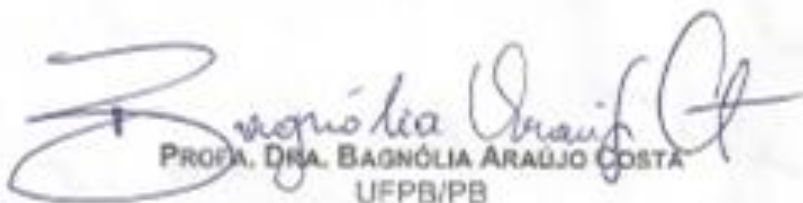
1. *Micrurus* - Veneno - Teses. 2. Receptor muscarínico. 3. Íleo - Teses. 4. Fisiologia - Teses. I. Perez-Garcia, Maria Elena de Lima. II. Silva, Bagnólia Araújo da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612

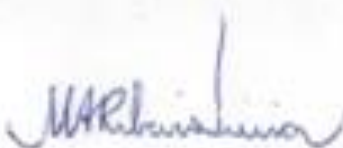
**"INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE MUSCARÍNICA DO VENENO DA  
SERPENTE *MICRURUS LEMNISCATUS* (LINNAEUS, 1758) EM  
ÍLEO ISOLADO DE COBAIA"**

**MARCELA CRISTINE SILVA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 30 de agosto de 2013, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
PROFA. DRA. BAGNÓLIA ARAÚJO COSTA  
UFPB/PB

  
PROF. DR. MÁRCIO FLÁVIO DUTRA MORAES  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
PROFA. DRA. MARIA APARECIDA RIBEIRO VIEIRA  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
PROFA. DRA. MARIA ELENA DE LIMA PEREZ GARCIA  
ICB/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, 30 de agosto de 2013

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

Órgãos financiadores: CNPq, CAPES-TOXINOLOGIA, INCTTOX-FAPESP e FAPEMIG.

## DEDICATÓRIA

*A meu avô (in memoriam) que estaria orgulhoso por mais essa conquista.*

*À Fabíola Cesário (Bibi), discente do Programa e amiga, que se foi cedo demais, não tendo tempo de concluir sua brilhante trajetória.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Jamais realizaria este estudo sem o incentivo, generosidade, orientação, apoio técnico, disposição, credibilidade e amizade de muitas pessoas. Todos, aqui listados, merecem meus mais genuínos sentimentos de gratidão e reconhecimento.

Agradeço ao Clóvis, meu orientador (durante a graduação na Universidade Federal de Viçosa) e amigo, por sempre me incentivar, desafiar e apoiar - inclusive financeiramente - permitindo que meus sonhos e ambições se realizassem. Jamais me esquecerei da sua frase: “Se um dia você puder me pagar, você paga; se não, foi um bom investimento”. Obrigada por me fazer acreditar que seria possível e contribuir ativamente para isso.

Ao Linozinho, eterno tutor e sempre solícito. Obrigada pela preocupação, conversas, conselhos e auxílios durante esses 6 anos de convivência.

À Maria Elena, minha orientadora, por me orientar e dar todo suporte necessário para realização do projeto. Pela paciência, dedicação e delicadeza às pessoas e ao laboratório. Por compreender minhas limitações e personalidade difícil, além dos auxílios constantes e da preocupação com meu bem estar.

À Bagnólia, minha co-orientadora, por me receber no Laboratório de Farmacologia Funcional “Prof. George Thomas”, na Universidade Federal da Paraíba, em João Pessoa, com toda atenção e disponibilidade. Obrigada pelas discussões teóricas, sugestões e carinho.

Aos membros da banca, Prof. Márcio Flávio Dutra Moraes e Maria Aparecida Ribeiro Vieira pela prontidão e contribuições concedidas.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, Nilda e Cintya pelos esclarecimentos constantes e boa convivência.

Ao Orlando pela eficiência e auxílio nas questões financeiras.

Aos funcionários dos diferentes setores, pela atenção em solucionar os problemas.

Ao Jamil, pela disponibilidade e prontidão em ajudar, além dos importantes ensinamentos. Pelos sorrisos, bom humor e inúmeros “bom dia”, “boa tarde” e “boa noite”.

Ao Julinho, pelo cuidado especial com os cobaias, manutenção dos equipamentos e também pelos momentos de descontração.

Aos animais que foram utilizados neste trabalho, minha gratidão e respeito.

À Fundação Ezequiel Dias, pela concessão do veneno.

Aos colaboradores Anderson Santos, orientado pelo Prof. Rodrigo Resende, pelo auxílio nos ensaios de liberação de acetilcolina e às meninas do Laboratório de Enzimologia e Físico-química de Proteínas (Thaís Castro, Lívia Souza e Elândia Santos) pela ajuda nas quantificações proteicas.

À Micheline Donato, pela purificação e caracterização bioquímica do material de trabalho. Pela companhia nos experimentos ao longo da madrugada, caronas e por intermediar o contato com a Bagnólia. Também por abrir as portas da sua casa na Paraíba, me proporcionando o prazer de conviver com a Naldinha, Tião e toda sua família, aos quais tenho muito a agradecer pela hospitalidade e carinho.

Aos “relaxados” nordestinos, Gislaíne “Mundiça”, Carol “Folhas”, Iara Luna, Luiz Henrique, Luiz Agra e Rafael Travassos por toda receptividade, apoio, passeios, risadas, comilanças e amizade. Em especial ao Ítalo Rossi, pelos auxílios diretos e constantes, presencial e a distância, colaborando para meu aprendizado e para o desenvolvimento do projeto.

A equipe do vôlei feminino da UFMG e seus agregados, pelos momentos de lazer, diversão e coreografias. Pre-para!

Aos amigos e contemporâneos no Programa, pelas dificuldades e alegrias compartilhadas durante as disciplinas. Em especial às “djovens”, gracinhas do meu mestrado, Lo e Lu, que acompanharam minha trajetória mais de perto.

Aos colegas LVTAnos, pelas discussões, apoio e companhia nos experimentos. O meu muito obrigado para Brunet’s, Anitcha, Ju, Xandy, Ana Cristina “catoca”, Poly e Pablito, amigos conquistados e sempre presentes nas conversas de buteco, nas “playlists”, nos momentos culturais, desabafos, choros, orações, “pobrezas” e até mesmo nas “adivinhações”.

À Aglaíet’s, estudante de iniciação científica que vem me acompanhando nos últimos 5 meses. Obrigado pela simplicidade, interesse, companhia, conversas sinceras e por esse relacionamento tão verdadeiro. A tentativa de ensinar e orientar, uma pessoa tão especial, contribuiu muito para o meu crescimento pessoal e profissional.



Aos amigos de longa data que mesmo distantes fisicamente sempre estiveram presentes: Veiazinha, Granadet's, Pollyzinha, Chicãozinho, Nat e Paulo. Obrigada por compreenderem as limitações impostas pela distância e por proporcionarem maravilhosos reencontros.

À Paulete, Carol, Michely e ao Alvinzinho, por tornarem minhas poucas horas em casa, as mais agradáveis. Obrigada pela paciência, sessões cinema, sessões desabafo, risadas, coreografias ensaiadas, festinhas e por fazerem da república um lar.

À família Alves de Barros, não só por me acolherem durante os 5 meses sem bolsa mas também por me adotarem – como a 5ª filha – com todo desprendimento e coração aberto, permitindo que eu fizesse parte dessa história tão bonita. Brasil, Vanessinha, Pollyzinha, Carol, Pedro e Ângela, minha segunda família, com vocês vivenciei muita generosidade, amor ao próximo e esclarecimento, nas conversas noturnas e também no Gotas de Luz.

Aos meus familiares, por compreenderem que minha ausência era necessária para alcançar o objetivo almejado. Obrigada pelo amparo, amor e dedicação nos momentos em que pude estar presente.

Ao Daniel (Mocinho), companheiro e cúmplice desde o processo seletivo. Fascinante! Como diria a Bibi: “Carona produtiva”. Obrigada pela confiança e credibilidade em mim depositados. Obrigada pelos olhares sinceros, pelos abraços acolhedores, pela relação construída, pelas gentilezas e amizade. “Há muito tempo eu não crescia o que eu cresci contigo”. Obrigada a Agra e toda família Valente de Oliveira pela amável convivência desde o primeiro encontro e pelo amparo às minhas dificuldades e problemas de saúde.

Enfim, à minha mãe, pelos exemplos de garra, humildade, simplicidade e amor que me incentivam desde que me entendo por gente. Por me ensinar que a minha força de vontade era mais importante que a minha condição financeira. Por me fazer acreditar que meus sonhos eram possíveis e por se desdobrar para tentar realizá-los, mesmo que isso implicasse abdicar dos seus. Por apoiar incondicionalmente as minhas escolhas. Por sofrer e vibrar comigo a cada conquista. Por cada trouxa lavada e gota de suor derramada, eu me ORGULHO!

“Cada pessoa que passa por nós representa um passo na nossa evolução. Cada uma, com seu jeito particular, traz uma lição que a gente deve gravar. Na presença e na ausência (ainda mais) sempre há o que aprender com elas. Com Marias e Joãos a gente aprende a ser leve, ser livre, ser cult, nerd, romântico. Aprende a falar palavrão, algumas palavras em alemão, aprende a beber e gostar de comer coisas que gente nem conhecia. Passamos de um amigo ao outro descobrindo como ser nós mesmos. A gente se encontra na parte de cada um que nos toca e nos apossamos dessa metade que nos completa! Não importa quanto tempo duram estas aulas: uma vida toda, a infância, o início da adolescência, o horário de trabalho, estamos sempre aprendendo mesmo que, invariavelmente, algumas pessoas tenham que se ausentar (talvez para sempre), pois a vida é seletiva: para preenchê-la é preciso esvaziar-se. Eu perdi muitos amigos ao longo do caminho, ganhei outros tantos, mas jamais me esqueci por completo de qualquer um deles. Mesmo que seja apenas pelo som de uma risada já distante, por uma cicatriz no joelho ou ainda pela cumplicidade há muito compartilhada, trago em mim a marca indelével de quem me ajudou a ser quem eu sou.”

Autor desconhecido

SILVA, Marcela Cristine. Investigação da atividade muscarínica do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) em íleo de cobaia. Dissertação (Mestrado). 120 pág. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2013.

## RESUMO

Apesar da grande diversidade de espécies do gênero *Micrurus* (Elapidae) nas Américas, incluindo o Brasil, poucos estudos foram feitos utilizando o veneno bruto (VB) ou toxinas purificadas do mesmo. Algumas neurotoxinas presentes nesses venenos atuam sobre os receptores muscarínicos, envolvidos na neurotransmissão colinérgica. Estas toxinas, chamadas toxinas muscarínicas (6-8 kDa), são as moléculas mais frequentes em venenos de *Micrurus lemniscatus*. No presente trabalho, propôs-se investigar a atividade muscarínica do VB e de suas frações semi-purificadas no músculo liso longitudinal (MLL) de íleo de cobaia. O VB foi cedido pela Fundação Ezequiel Dias (Funed, Belo Horizonte, Brasil) e fracionado por fase reversa-HPLC ou troca-iônica CIEX, seguido de uma fase reversa. As massas foram avaliadas por espectrometria de massa MALDI-TOF e as proteínas totais foram estimadas de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951). Segmentos de MLL de íleo de cobaia foram dissecados e suspensos em banho de órgãos isolado, em tampão Krebs-Ringer-Henseleit sob aeração com mistura carbogênica. As contrações isométricas foram monitoradas na presença de VB ou de frações semi-purificadas, bem como destes componentes na presença dos antagonistas (atropina, 4-DAMP e metoctramina). O agonista muscarínico carbacol (CCh) foi utilizado como controle positivo. Trinta e quatro frações semi-purificadas foram obtidas, sendo que 18 dessas frações, com massa molecular entre 7-7,6 kDa foram testadas sobre a preparação de MLL. As concentrações de antagonistas foram definidas de acordo com as respostas observadas em ensaios de padronização. VB, testado em diferentes concentrações (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ), induziu contração da preparação MLL, que foi completamente antagonizada pela atropina, metoctramina e de 4-DAMP, testados separadamente na concentração de  $10^{-9}$  M. Entre as 18 frações semi-purificadas testadas, nas concentrações (0,1; 0,3; 1 e 3  $\mu\text{g/mL}$ ), apenas quatro induziram contração da preparação de MLL. Dentre estas, duas frações semi-purificadas apresentaram uma toxina com mesma massa molecular (7,232 kDa). Esta toxina isolada, MT-MI1, foi purificada e testada em MLL. Curvas contrações-resposta cumulativas foram construídas com as seguintes

concentrações: 0,01; 0,03; 0,1 e 0,3 µg/mL. A maior concentração testada desta toxina (0,3 µg/mL) induziu contração de 27,25%, comparada à contração máxima obtida pelo CCh, e foi parcialmente antagonizada quando pré-incubada com atropina ( $10^{-9}$  M). O veneno de *M. lemniscatus* apresentou atividade agonista muscarínica, sugerindo a presença de toxinas muscarínicas. Esta atividade foi antagonizada pelos antagonistas muscarínicos clássicos utilizados. Estudos estão em andamento para melhor caracterizar a atividade da toxina MT-M11 e determinar seus mecanismos de ação no MLL do íleo de cobaia. Esta peçonha parece ter várias moléculas ativas e representa um material valioso a ser estudado, podendo fornecer boas ferramentas para o estudo da atividade muscarínica do sistema nervoso.

**Palavras-chave:** *Micrurus*, veneno, receptor muscarínico, músculo longitudinal do íleo de cobaia.

## ABSTRACT

Despite of the great diversity of species in the genus *Micrurus* (Elapidae) in Americas, including Brazil, few studies have been done using the venom of these species or their purified toxins. Some neurotoxins present in these venoms act on muscarinic receptors involved in cholinergic neurotransmission. These toxins, called muscarinic toxins (6-8 kDa), are the most frequent molecules in venoms of *M. lemniscatus*. In the present work, we propose to make a screening of the muscarinic activity of the crude venom (CV) and of their semi-purified fractions on longitudinal smooth muscle (LSM) preparation of guinea pig ileum. The CV, assigned by Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, Brazil), was fractionated by HPLC, using reverse phase or ionic exchange-CIEX, followed by reverse phase. The masses were evaluated by MALDI-TOF mass spectrometry and total protein was estimated according to the method of Lowry et al (1951). Segments of LSM of guinea-pig ileum were removed, suspended in isolated organ bath in Krebs-Ringer-Henseleit buffer, under aeration with carbogenic mixture. Isometric contractions elicited by CV or semi-purified fractions, were monitored in the presence of muscarinic antagonists (atropine, 4-DAMP and metocramine). The muscarinic agonist carbachol (CCh) was used as a positive control. Thirty four semi-purified fractions were obtained from CV and 18 thereof, with molecular masses between 7-7,6 kDa were tested on LSM preparation. Concentrations of antagonists were defined according to the responses observed on standardization assays. CV, assayed in various concentrations (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 and 30  $\mu\text{g/mL}$ ), induced a contraction of the LSM preparation, which was inhibited by atropine, metocramine and 4-DAMP concentration of  $10^{-9}$  M. Among the 18 tested semi-purified fractions in the following concentrations: 0,1; 0,3; 1; and 3  $\mu\text{g/ml}$ , only four of these fractions induced contraction of the preparation of LSM. Among them, two showed a toxin with the same molecular masses (7.232 kDa). The purified toxin, MT-M11 was tested in LSM. Cumulative curve were constructed with the following concentrations: 0.01, 0.03, 0.1 and 0.3  $\mu\text{g/mL}$ . The highest tested concentration (0.3  $\text{mg/mL}$ ) induced contraction of 27.25% (comparing to maximum contraction obtained by the charbacol) and was partially blocked when pre-incubated with atropine ( $10^{-9}$  M). In conclusion, the venom from *M. lemniscatus* presented agonist muscarinic activity, suggest the presence of muscarinic toxins, among them the MT-M11. This activity was antagonized by classical muscarinic antagonists. Studies are in progress to better identify the toxin MT-M11 and to determine their action mechanisms in LSM from guinea pig

ileum. Indeed this venom seems to have several active molecules and represents a rich material to be studied and may provide good tools to study the muscarinic activity of nervous system.

**Keywords:** *Micrurus*, venom, muscarinic receptors, guinea pig ileum longitudinal muscle.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Fórmula estrutural da molécula de acetilcolina (ACh) .....	22
<b>Figura 2.</b> Junção neuroefetora colinérgica: síntese, armazenamento e liberação de acetilcolina (ACh). .....	24
<b>Figura 3.</b> Receptor colinérgico nicotínico (nRACH) .....	27
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática de um membro típico da classe de receptores acoplado à proteína G. ....	30
<b>Figura 5.</b> Parte da sequência de aminoácidos da alça IL3 dos receptores muscarínicos (mRACH). .....	31
<b>Figura 6.</b> Esquema da via da fosfolipase C (PLC) ativada pelas proteínas $G_{q/11}$ acopladas ao receptor muscarínico (mRACH).....	33
<b>Figura 7.</b> Diagrama esquemático da inervação do sistema nervoso entérico de cobaias .....	38
<b>Figura 8.</b> Os efeitos da acetilcolina (ACh), 5-hidroxitriptamina (5-HT), histamina (Hist), nicotina (Nic), metacolina (HCM) e carbacol (Carb) em um segmento de músculo circular e longitudinal.....	41
<b>Figura 9.</b> <i>Micrurus lemniscatus</i> .....	43
<b>Figura 10.</b> Caracterização de algumas das toxinas de mambas australianas já descritas .....	47
<b>Figura 11.</b> Distribuição da massa molecular em função da frequência de ocorrência nos venenos das serpentes .....	49
<b>Figura 12.</b> Segmento do íleo de cobaia dissecado. ....	59
<b>Figura 13.</b> Dissecção do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia.....	60
<b>Figura 14.</b> Técnica de banho de órgão.....	62
<b>Figura 15.</b> Segmentos suspensos presos ao suporte de fixação.....	63
<b>Figura 16.</b> Efeito dos antagonistas frente às contrações-resposta cumulativas induzidas por CCh em músculo liso longitudinal de íleo de cobaia. ....	65
<b>Figura 17.</b> Efeito dos antagonistas frente à atividade induzida pelo veneno bruto (VB) em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia. ....	66
<b>Figura 18.</b> Registro representativo da atividade contrátil do KCl 80 mM (A) e do carbacol (CCh) na ausência (B) e na presença de 4-DAMP $10^{-7}$ M (C), antagonista seletivo dos	

receptores muscarínicos M <sub>3</sub> em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, obtido pelo <i>software</i> LabChart 7 Pro.....	70
<b>Figura 19.</b> Efeitos dos antagonistas nas curvas contrações-resposta cumulativas ao carbacol (CCh).....	71
<b>Figura 20.</b> Registro representativo da atividade contrátil do KCl 80 mM (A) do carbacol 3x10 <sup>-7</sup> M (CCh) (B e D) e da alíquota 1 do veneno bruto 3 µg/mL (VB1) na ausência (C) e na presença de 4-DAMP 10 <sup>-7</sup> M (E), antagonista seletivo dos receptores muscarínicos M <sub>3</sub> em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, obtido pelo <i>software</i> LabChart 7 Pro.....	72
<b>Figura 21.</b> Efeito dos antagonistas na atividade da alíquota 1 do veneno bruto (VB1) da serpente <i>Micrurus lemniscatus</i> em íleo intacto e músculo longitudinal do íleo de cobaia. ....	74
<b>Figura 22.</b> Registro representativo da atividade contrátil do KCl 80 mM (A) do carbacol 3x10 <sup>-7</sup> M (CCh) (B e D) e do veneno bruto (VB2) na ausência (C) e na presença de atropina 10 <sup>-7</sup> M (E), antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, obtido pelo <i>software</i> LabChart 7 Pro. ....	76
<b>Figura 23.</b> Comparativo entre curvas contrações-resposta cumulativas de três alíquotas do veneno bruto (VB1, VB2 e VB3) da serpente <i>Micrurus lemniscatus</i> . ....	77
<b>Figura 24.</b> Efeitos dos antagonistas sobre as curvas contrações-resposta cumulativas da alíquota 1 do veneno bruto (VB1) da serpente <i>Micrurus lemniscatus</i> em músculo longitudinal do íleo de cobaia. ....	78
<b>Figura 25.</b> Efeito das diferentes concentrações de atropina frente às curvas contrações-resposta cumulativas ao carbacol (CCh). ....	79
<b>Figura 26.</b> Efeito das diferentes concentrações de 4-DAMP frente às curvas contrações-resposta cumulativas ao carbacol (CCh) .....	80
<b>Figura 27.</b> Efeito das diferentes concentrações de metocramina frente às curvas contrações-resposta cumulativas ao carbacol (CCh) .....	81
<b>Figura 28.</b> Registro representativo da atividade contrátil do KCl 80 mM (A) do carbacol 3x10 <sup>-7</sup> M (CCh) (B e D) e do veneno bruto (VB3) na ausência (C) e na presença de atropina, metocramina e 4-DAMP 10 <sup>-9</sup> M (E) em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, obtido pelo <i>software</i> LabChart 7 Pro.....	83
<b>Figura 29.</b> Efeito dos antagonistas, em sua menor concentração testada, sobre as curvas contrações-resposta cumulativas da alíquota 3 do veneno bruto (VB3) de <i>Micrurus lemniscatus</i> . ....	84



<b>Figura 30.</b> Atividade das frações semi-purificadas B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N e R fracionadas a partir do veneno de <i>Micurus lemniscatus</i> e testadas sob segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia.....	85
<b>Figura 31.</b> Atividade das frações semi-purificadas do veneno da serpente <i>Micurus lemniscatus</i> em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia.....	86
<b>Figura 32.</b> Registro representativo da atividade contrátil do KCl 80 mM (A) do carbacol $3 \times 10^{-7}$ M (CCh) (B e D) e da fração semi-purificada Q (anteriormente denominada como T6) e Q na presença do antagonista atropina $10^{-9}$ M em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, obtido pelo <i>software</i> LabChart 7 Pro. ....	88
<b>Figura 33.</b> Atividade da toxina MT-M11 sobre receptores muscarínicos em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia .....	90
<b>Figura 34.</b> Comparação entre os efeito máximos promovidos pelo agonista CCh, o VB3 e a toxina MT-M11 .....	91

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Propriedades dos subtipos de mRCAh .....	35
<b>Tabela 2.</b> Diversidade da sinalização da proteína G acoplada a receptor em músculo liso do intestino .....	39
<b>Tabela 3.</b> Concentração dos reagentes na solução de Krebs-Ringer-Henseleit (KRH).....	57
<b>Tabela 4.</b> Drogas utilizadas – concentrações em M e $\mu\text{g/mL}$ .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3FTx: proteínas com estrutura *three fingers*
- 4-DAMP: 1,1-Dimetil-4-difenilacetoxipiperidínio iodado
- Acetil-CoA: acetilcoenzima A
- ACh: acetilcolina
- AChE: acetilcolinesterase
- AC: ciclase de adenilil
- AMPC: monofosfato cíclico de adenosina
- BuChE: butirilcolinesterase
- CaM: calmodulina
- CCh: carbacol
- ChAT: colina acetiltransferase
- ChT1: transportador de colina de alta afinidade
- Co-T: cotransmissores potenciais
- DAG: 1,2-diacilglicerol
- CE<sub>50</sub>: concentração de um agonista que produz 50% do seu efeito máximo
- EL1: alça extracelular 1 do receptor colinérgico muscarínico
- EL2: alça extracelular 2 do receptor colinérgico muscarínico
- EL3: alça extracelular 3 do receptor colinérgico muscarínico
- E<sub>máx</sub>: efeito máximo
- GPCR: receptores acoplados à proteína G
- GRKs: cinases dos receptores acoplados à proteína G
- IL1: alça intracelular 1 do receptor colinérgico muscarínico
- IL2: alça intracelular 1 do receptor colinérgico muscarínico
- IL3: alça intracelular 1 do receptor colinérgico muscarínico
- IP<sub>3</sub>: 1,4,5-trisfosfato de inositol
- IP<sub>3</sub>R: receptores de IP<sub>3</sub>
- KRH: Krebs-Ringer-Henseleit
- M<sub>1</sub>: receptor colinérgico muscarínico tipo 1

M<sub>2</sub>: receptor colinérgico muscarínico tipo 2  
M<sub>3</sub>: receptor colinérgico muscarínico tipo 3  
M<sub>4</sub>: receptor colinérgico muscarínico tipo 4  
M<sub>5</sub>: receptor colinérgico muscarínico tipo 5  
MLC: cadeia leve da miosina  
MLCK: cinase da cadeia leve da miosina  
mACh: receptor colinérgico muscarínico  
NPY: neuropeptídeo Y  
nACh: receptor colinérgico nicotínico  
PIP<sub>2</sub>: 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol  
PIV: peptídeo intestinal vasoativo  
PKC: proteína cinase C  
PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>  
PLC: fosfolipase C  
RE: retículo endoplasmático  
RyR: receptores de rianodina  
VAChT: transportador vesicular de acetilcolina

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	22
1.1 SISTEMA COLINÉRGICO.....	22
1.1.1 Receptores Colinérgicos e Transdução de Sinais.....	26
1.2 MÚSCULO LISO LONGITUDINAL DO ÍLEO DE COBAIA.....	37
1.3 <i>Micrurus lemniscatus</i> .....	42
1.4 VENENOS ELAPÍDEOS .....	44
1.5 TOXINAS MUSCARÍNICAS .....	46
2 JUSTIFICATIVA.....	51
3 OBJETIVOS .....	53
3.1 OBJETIVO GERAL .....	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	53
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	55
4.1 MATERIAL .....	55
4.1.1 Animais experimentais.....	55
4.1.2 Obtenção do veneno bruto, frações semi-purificadas e toxina isolada.....	55
4.1.3 Reagentes e drogas .....	56
4.1.4 Soluções .....	57
4.1.5 Equipamentos .....	57
4.2 MÉTODOS .....	58
4.2.1 Determinação de proteínas totais pelo método de Lowry .....	58
4.2.2 Eutanásia e dissecação .....	58
4.2.3 Padronização da técnica de banho de órgão.....	60
4.2.4 Protocolos.....	63

4.2.4.1 Padronização dos controles: Efeito dos antagonistas frente às curvas contrações-resposta cumulativas induzidas por carbacol (CCh) em músculo liso longitudinal do íleo de cobraia .....	64
4.2.4.2 Padronização do veneno bruto (VB) e frações semi-purificadas: Efeito dos antagonistas frente à atividade induzida por VB e frações semi-purificadas em músculo liso longitudinal do íleo de cobraia.....	65
4.2.4.3 Efeito de diferentes concentrações de antagonistas frente às curvas contrações-resposta cumulativas induzidas por CCh em músculo liso longitudinal do íleo de cobraia .....	66
4.2.4.4 Efeito dos antagonistas frente às curvas contrações-resposta cumulativas de VB e toxina isolada MT-MI1 em músculo liso longitudinal do íleo de cobraia .....	68
4.2.5 Análise estatística.....	68
5 RESULTADOS.....	70
5.1 Efeito dos antagonistas frente às curvas contrações-resposta cumulativas induzidas por CCh em músculo liso longitudinal do íleo de cobraia .....	70
5.2 Efeito dos antagonistas frente à atividade induzida por VB1 em íleo inteiro e em músculo liso longitudinal do íleo de cobraia .....	72
5.3 Efeito contrátil das diferentes alíquotas de VB e dos antagonistas frente às curvas contrações-resposta cumulativas de VB1 em músculo liso longitudinal do íleo de cobraia.....	74
5.4 Efeito das diferentes concentrações de antagonistas frente às curvas contrações-resposta cumulativas ao CCh em músculo liso longitudinal do íleo de cobraia.....	79
5.5 Efeito da menor concentração de antagonistas testada frente às curvas contrações-resposta cumulativas de VB3 em músculo liso longitudinal do íleo de cobraia.....	81
5.6 Frações semi-purificadas de VB da serpente <i>Micrurus lemniscatus</i> selecionadas para teste em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobraia.....	85
5.7 Efeito da toxina MT-MI1 isolada do VB da serpente <i>Micrurus lemniscatus</i> em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobraia .....	89
5.8 Comparação da atividade do agonista CCh, de VB3 e da toxina MT-MI1 .....	91
6 DISCUSSÃO.....	93
7 CONCLUSÕES.....	99
8 PERSPECTIVAS .....	101
REFERÊNCIAS.....	103
APÊNDICE.....	113

ANEXO.....	115
Anexo A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais .....	115
Anexo B .....	115
Fracionamento do veneno bruto.....	116
Determinação da massa molecular por espectrometria de massas .....	117
Distribuição de massas/cargas das toxinas que compõem o veneno da serpente <i>Micrurus lemniscatus</i> .....	118
Espectro de masas das frações semi-purificadas com atividade .....	119
Obtenção da toxina MT-M11 do VB da serpente <i>Micrurus lemniscatus</i> .....	120

# Introdução

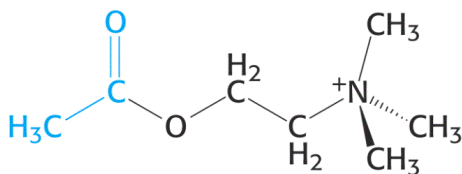


## 1 INTRODUÇÃO

As neurotoxinas de origem animal têm sido consideradas como ferramentas importantes para o estudo de diferentes processos biológicos. Em particular, as toxinas isoladas de venenos de serpentes da família Elapidae que têm sido utilizadas para estudos sobre funções do sistema nervoso periférico e central, sendo sua importância relacionada a dois aspectos principais. Um relacionado à participação de cada uma delas no quadro do envenenamento e outro na possível utilização dessas toxinas para o estudo de processos neurobiológicos, como na caracterização farmacológica e química dos receptores colinérgicos muscarínicos (TEIXEIRA, 2012).

### 1.1 SISTEMA COLINÉRGICO

Desde o início do século passado, já era conhecida a atividade vasodepressora da acetilcolina (ACh) e a capacidade desta molécula (Figura 1) em estimular nervos parassimpáticos (DALE et al., 1914). Entretanto, foi somente em 1921 que Löwi revelou o primeiro transmissor químico, "Vagusstoff" - liberado a partir de terminais nervosos vagais desacelerando os batimentos cardíacos (LÖWI, NAVARATIL, 1921), o que foi mais tarde, demonstrado ser devido à ação da ACh (CAULFIELD, 1993; BENNETT, 2000).

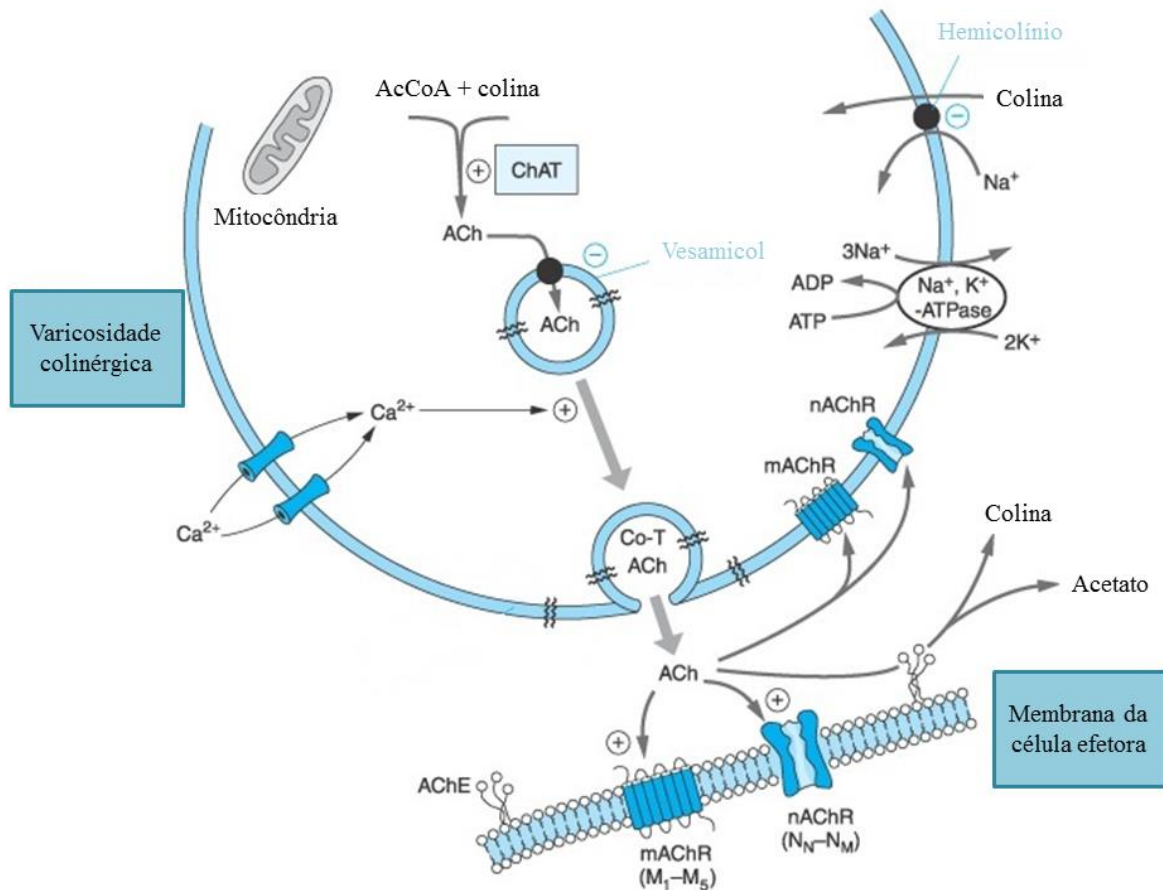


**Figura 1. Fórmula estrutural da molécula de acetilcolina (ACh).** Segunda a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) a nomenclatura para a ACh é [2-(acetiloxi)etil]trimetilamônio. (Fonte: <<http://www.javeriana.edu.co/>>, acesso em 22 de julho de 2013)

A ACh, seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica.

O sistema nervoso autônomo, na sua porção eferente, consiste em duas grandes divisões: o efluxo simpático ou toracolombar e o efluxo parassimpático ou craniossacral. A ACh é o neurotransmissor de todas as fibras autônomas pré-ganglionares, da maioria das fibras parassimpáticas pós-ganglionares e de umas poucas fibras simpáticas pré-ganglionares, controlando inúmeras funções mantenedoras da homeostase como a contração da musculatura gástrica, ritmo cardíaco e secreção glandulares (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012). No sistema nervoso central, a ACh esta envolvida em processos cognitivos como atenção, memória, aprendizado e vigília (PEPEU, GIOVANINNI, 2004).

A biossíntese da ACh (Figura 2) ocorre no citosol do terminal dos neurônios colinérgicos no qual a colina é acetilada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) utilizando acetilcoenzima A (acetil-CoA) como doador de grupo acetil. O substrato acetil-CoA é sintetizado na mitocôndria, derivado do piruvato, enquanto a colina é captada a partir do espaço extracelular por dois sistemas de transporte. Um sistema de transporte onipresente, de baixa afinidade, independente de  $\text{Na}^+$  e um sistema de alta afinidade (transportador de colina de alta afinidade - ChT1),  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  dependente, ambos sistemas sensíveis à inibição pelo hemicolínico-3. Este segundo sistema de transporte é encontrado de modo predominante nos neurônios colinérgicos. A disponibilidade de colina é crítica para a síntese de ACh sendo uma de suas fontes a dieta e a outra fonte a fosfatidilcolina presente na membrana celular. Porém a utilização deste fosfolípide pelas células neuronais é baixa. A receptação, após a liberação, e degradação de ACh também serve como fonte de colina (SCAGNELLI et al., 1991; BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012; BLUSZTAJN et al., 1987).



**Figura 2. Junção neuroefetora colinérgica: síntese, armazenamento e liberação de acetilcolina (ACh).** A síntese de ACh depende da captação de colina através de um transportador dependente de sódio. Essa captação pode ser bloqueada por um hemicolínio. A colina e a molécula acetila da acetilcoenzima A (AcCoA) oriunda da mitocôndria formam a ACh, em um processo catalisado pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) pela ação do transportador vesicular de ACh (Vesamicol), o qual é inibido pelo vesamicol. Mediante a despolarização da varicosidade e influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependente ocorre a exocitose das vesículas. A ACh liberada pode interagir com os receptores muscarínicos (mAChR), nicotínicos (nAChR) ou com os receptores pré-sinápticos para modificar sua própria liberação. Sua atividade é interrompida por sua degradação em colina e acetato pela ação da acetilcolinesterase (AChE) associada às membranas sinápticas. (Adaptado de BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2007)

Depois de sintetizada, a ACh é armazenada em vesículas sinápticas pela ação do transportador vesicular de ACh (VACHT) usando um gradiente eletroquímico de prótons. Este tem considerável poder de concentração, é saturável e dependente de ATPase vacuolar. O processo é inibido pelo vesamicol e apresenta caráter reversível, não competitivo e não afeta a ATPase vesicular (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012). Em certas junções neuroefetoras a ACh é armazenada em vesículas juntamente com outros cotransmissores potenciais (Co-T), como o ATP e o polipeptídeo intestinal vasoativo (PIV). O armazenamento de ACh é realizado através do empacotamento de “quanta” de moléculas de ACh (em geral 1.000 a 50.000 moléculas em cada vesícula) (KATZUNG, 2010). Já se calculou que uma única terminação motora contém 300.000 ou mais vesículas.

Após um estímulo despolarizante, influxo de  $Ca^{2+}$  e fusão das vesículas com a membrana, ocorre a exocitose da ACh na fenda sináptica e o neurotransmissor se liga aos receptores. Parece existir 2 “pools” de ACh, sendo um rápido, facilmente liberado e outro “pool” de reserva, importante para manter a liberação de ACh durante períodos de estimulação prolongada ou intensa. As moléculas de ACh permanecem ligadas a seus receptores durante um período médio de 2 milissegundos sendo, em seguida, degradadas na fenda sináptica. A inativação da ACh é realizada pela ação de colinesterases como a enzima acetilcolinesterase (AChE) (com alta afinidade à ACh, inserida na membrana neuronal e presente em todas as sinapses colinérgicas) e a butirilcolinesterase (BuChE) (com menor afinidade pela ACh, encontrada no plasma sanguíneo, fígado, glia e em outros tecidos) (KATZUNG, 2010; VENTURA et al., 2010). Estas enzimas catalisam a conversão da molécula de ACh em acetato e colina. A colina presente na fenda sináptica é então recaptada para o terminal pré-sináptico através de um transporte ativo (YAMAMURA, SNYDER, 1973; COLLIER, ILSO, 1977).

O ChT1 está presente em vesículas sinápticas, enquanto apenas uma pequena porção do transportador de colina está associada à membrana plasmática. Estes dados sugerem que o aumento da atividade neuronal leva a um aumento da fusão de vesículas sinápticas e um maior fluxo de ChT1 em direção à membrana plasmática. O aumento da concentração do ChT1 na membrana pré-sináptica proporciona então uma maior captação de colina o que favorece a síntese de ACh. Por conseguinte, a presença do ChT1 em vesículas sinápticas pode

servir como um “pool” de reserva intracelular (RIBEIRO et al., 2003, 2006; FERGUSON et al., 2003; NAKATA, 2004).

As varicosidades terminais nervosas colinérgicas contêm autorreceptores e heterorreceptores igualmente. A liberação de ACh está, portanto, sujeita a uma complexa regulação por mediadores, incluindo ela própria agindo sobre os autorreceptores e outros transmissores ou substâncias produzidas localmente nos tecidos (WESS, 2004).

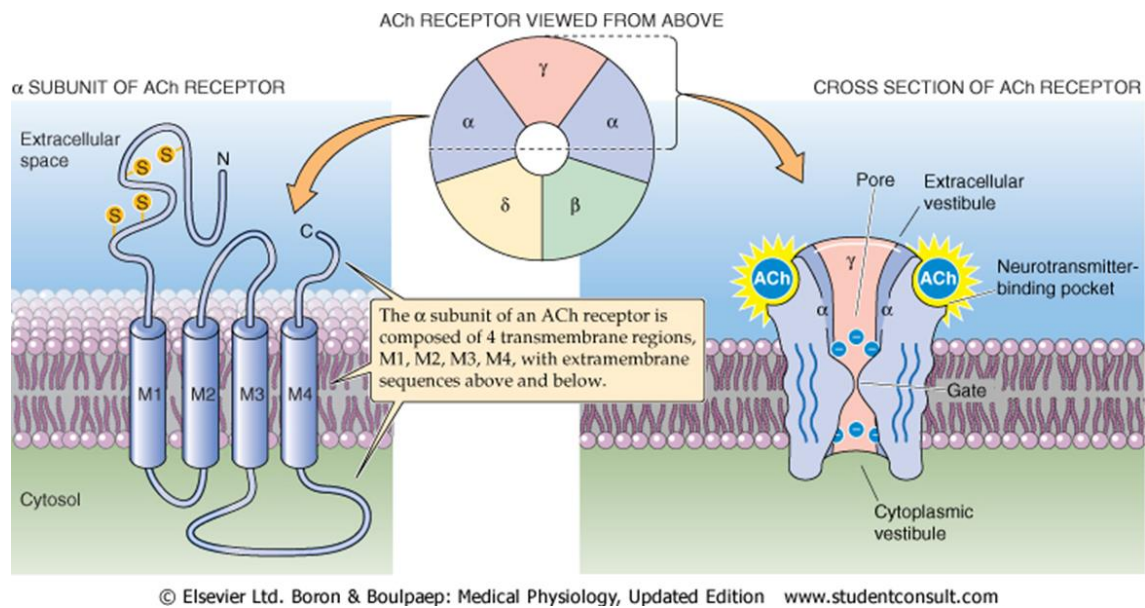
Um grande número de evidências indica que todos os elementos do sistema colinérgico, incluindo a enzima ChAT, a síntese de ACh, os mecanismos de liberação e os receptores, são expressos funcionalmente independente da inervação colinérgica em numerosas células não neuronais. Estes sistemas colinérgicos não neuronais podem modificar e controlar funções celulares fenotípicas, como proliferação, diferenciação, formação de barreiras físicas, migração e movimentos de íons e água. A difundida síntese de ACh em células não neuronais pode ser afetada por condições fisiopatológicas ou secundariamente a estados de doença. Além disso, disfunções de sistemas colinérgicos não neuronais podem estar envolvidas na gênese de doenças (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012).

### **1.1.1 Receptores Colinérgicos e Transdução de Sinais**

Baseados nos primeiros estudos de seletividade farmacológica dos receptores de ACh, duas frações de alcaloides foram usadas para subclassificar receptores do sistema nervoso colinérgico (DALE, 1914). Embora Dale tivesse acesso apenas aos alcaloides vegetais crus, muscarina e nicotina - de estruturas então desconhecidas e obtidos respectivamente da *Amanita muscaria* e *Nicotiana tabacum*, essa classificação primária permanece até hoje subdividindo os receptores colinérgicos em muscarínicos (mRACH) e nicotínicos (nRACH), os quais respondem à ativação colinérgica com alta afinidade (SIEGEL, 2006; BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012).

Os nRACH são receptores ionotrópicos pertencentes a uma família de canais iônicos regulados por ligando que quando ativados, adquirem a conformação de canal aberto permeável aos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Eles são constituídos por cinco subunidades proteicas e estão

distribuídos em vários tecidos, incluindo o cérebro e o tecido muscular. Os nRACH presentes nos músculos são heteropentâmeros constituídos por subunidades  $2\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (Figura 3), enquanto os receptores do cérebro são formados por varias subunidades  $\alpha 2-10$  e  $\beta 2-47$  (VENTURA et al., 2010).



**Figura 3. Receptor colinérgico nicotínico (nRACH).** Subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . Domínios presentes em cada subunidade: 1) N-terminal hidrofílico, 2) quatro segmentos hidrofóbicos transmembranares (M1, M2, M3 e M4), 3) domínio hidrofílico variável, 4) C-terminal hidrofóbico e 5) alças intracelulares formando sítios de fosforilação. (Fonte: <<http://studentconsult.com>>, acesso em 22 de julho de 2013)

Os mRACH pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Esses receptores são compostos por múltiplos subtipos, com diferentes estruturas, distribuição e atividade farmacológica (HOSEY, 1992).

O conhecimento das funções dos mRACH e de seus subtipos avançou consideravelmente após a clonagem de seus cinco genes distintos ( $M_1$ - $M_5$ ) a partir de uma variedade de espécies, incluindo mamíferos (humano, vaca, porco, rato, camundongo) e não mamíferos (frango, drosophila, rã) e mostram um elevado grau de similaridade de sequências

entre espécies, bem como entre subtipo de receptor (FELDER et al., 2000). Enquanto a expressão heteróloga de mRACH em diferentes linhagens celulares favoreceu a descoberta das vias de sinalização intracelular envolvidas, os anticorpos específicos permitiram a localização tecidual e celular dos subtipos de mRACH em diferentes organismos. A identificação dos cinco genes que codificam os mRACH permitiu ainda a localização dos sítios de expressão de RNAm desses receptores em diferentes tecidos (VENTURA et al., 2010).

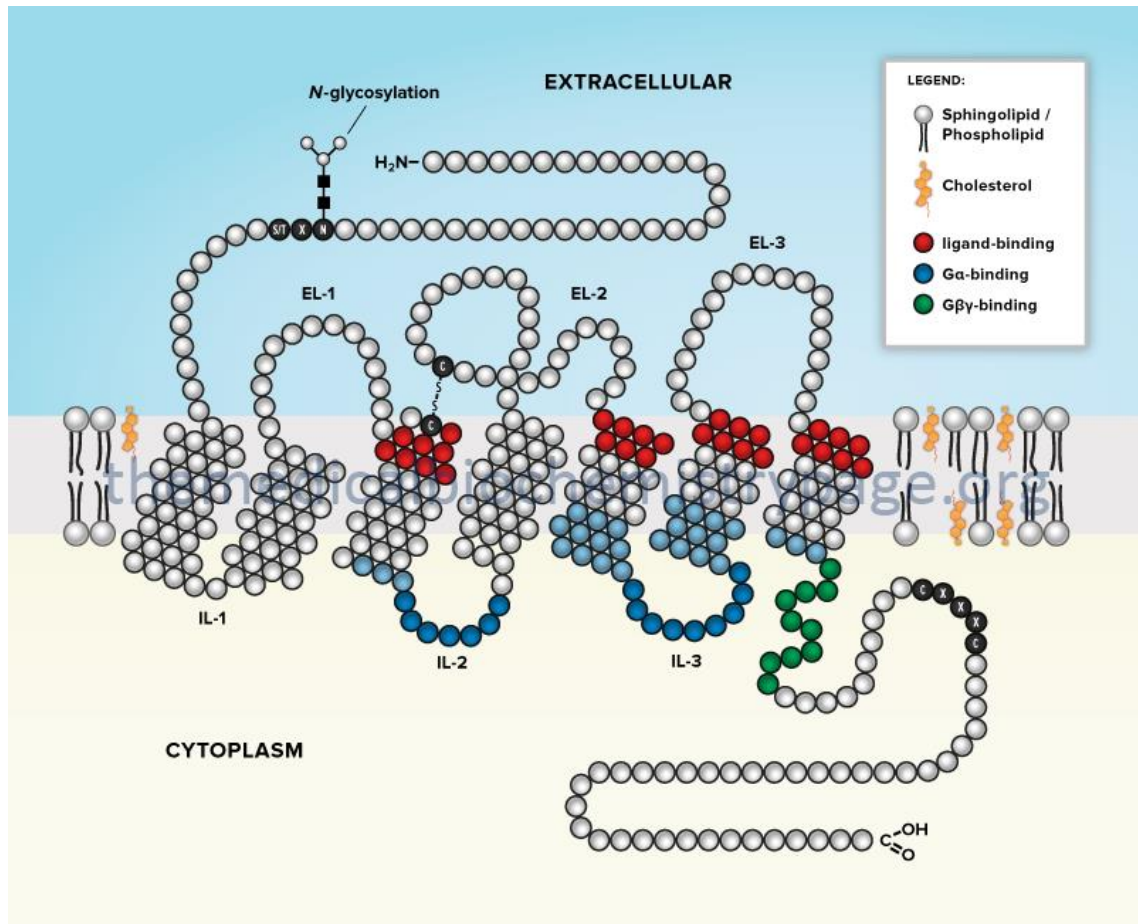
Os mRACH são expressos predominantemente no sistema nervoso parassimpático e exercem controle excitatório e inibitório sobre tecidos centrais e periféricos participando de uma série de funções fisiológicas incluindo a redução da frequência e força da contração cardíaca, o relaxamento de vasos sanguíneos periféricos e a constrição das vias respiratórias além de estarem envolvidos no controle da função extrapiramidal, vestibular, em funções cognitivas como memória, aprendizado e atenção, em respostas emocionais, na modulação do estresse, no sono e na vigília (FELDER et al., 2000; VENTURA et al., 2010). A maioria das células expressa no mínimo 2 subtipos de mRACH e identificar o papel de um subtipo específico na mediação de uma resposta muscarínica, em particular a ACh, é difícil devido a falta de agonistas e antagonistas subtipo-específicos (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012).

Mais recentemente, tem-se usado camundongos *Knockout* para tentar esclarecer a função de cada subtipo de receptor. Alterações fenotípicas mínimas com a anulação de um simples receptor sugerem redundância funcional entre os subtipos, assim necessitando da anulação de mais de um subtipo para se obter grandes alterações fenotípicas. Embora tenham sido identificados antagonistas que consigam discriminar entre vários subtipos de receptores muscarínicos, o desenvolvimento de agonistas e antagonistas seletivos, em geral, é difícil, devido à alta conservação do local ortostérico entre os subtipos (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012).

Estruturalmente mRACH são proteínas de membrana contendo sete domínios transmembranares (Figura 4) e sítios de ligação específicos para ACh, agonistas e antagonistas muscarínicos, presentes na região N-terminal e nas alças extracelulares (EL1, EL2 e EL3). A presença de um ou mais sítios de glicosilação no N-terminal, reforça a evidência da localização extracelular dessa porção da molécula. Já na região intracelular, os mRACH conservam a porção C-terminal, além de três alças intracelulares (IL1, IL2 e IL3). A

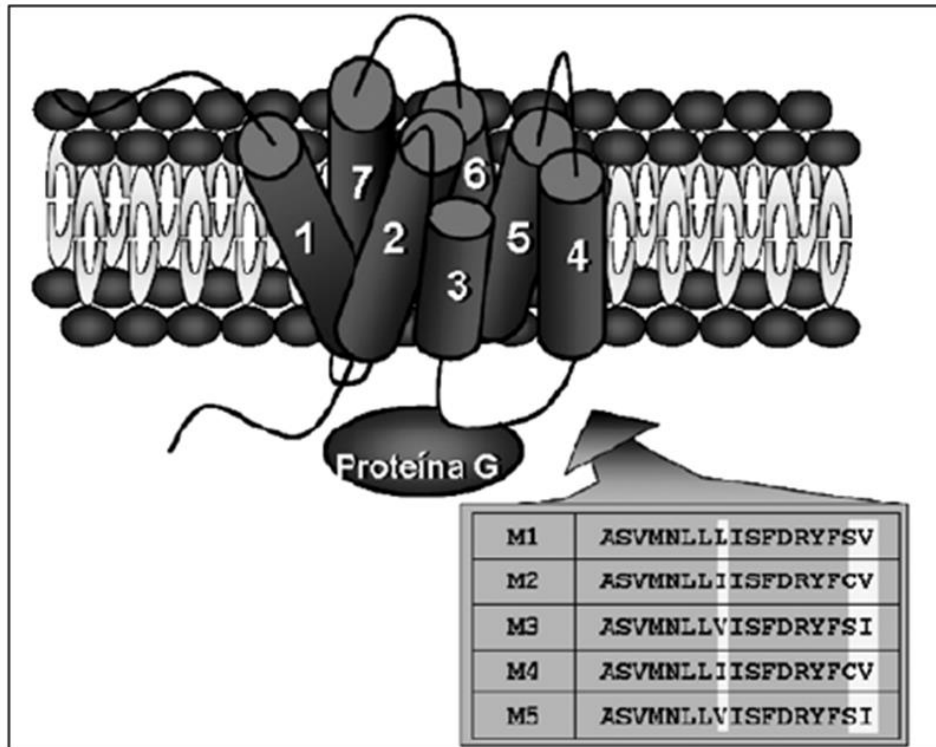
diferença funcional na ativação dos diferentes subtipos de mACh reside principalmente na constituição da alça IL3 desses receptores (Figura 4). A IL3 é a região dos receptores muscarínicos que interage com a proteína G e apresenta variação na sequência de aminoácidos entre os mACh. Já as alças IL1 e IL2 são bastante conservadas em todos os subtipos. Os receptores muscarínicos parecem possuir locais de ligação alostéricos topograficamente distintos com pelo menos um localizado na alça extracelular e no segmento mais externo de diferentes hélices transmembranas. Estes locais são menos conservados entre os subtipos de receptores e assim oferecem potencial para maior seletividade. Os 18 primeiros aminoácidos presentes na região IL3 dos receptores M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> e M<sub>5</sub> possuem um alto grau de homologia enquanto, nos receptores M<sub>2</sub> e M<sub>4</sub>, essa região é idêntica (Figura 5) (ISHII, KURACHI, 2006).





**Figura 4. Representação esquemática de um membro típico da classe de receptores acoplado à proteína G.** Os receptores muscarínicos possuem sete segmentos hidrofóbicos transmembranas. Esferas vermelhas, azuis e verdes representam os resíduos de aminoácidos importantes para ligação da acetilcolina (ACh) e da proteína G, assim como descrito na legenda da figura. Características estruturais incluem três alças extracelulares (EL-1, EL-2 e EL-3) e três alças intracelulares (IL-1, IL-2 e IL-3). (Fonte: <<http://themedicalbiochemistrypage.org/signal-transduction.php>>, acesso em 22 de julho de 2013)

Os mACh humanos têm entre 460 e 590 aminoácidos e receptores de outras espécies podem diferir em comprimento por poucos aminoácidos (HARVEY et al., 2001).

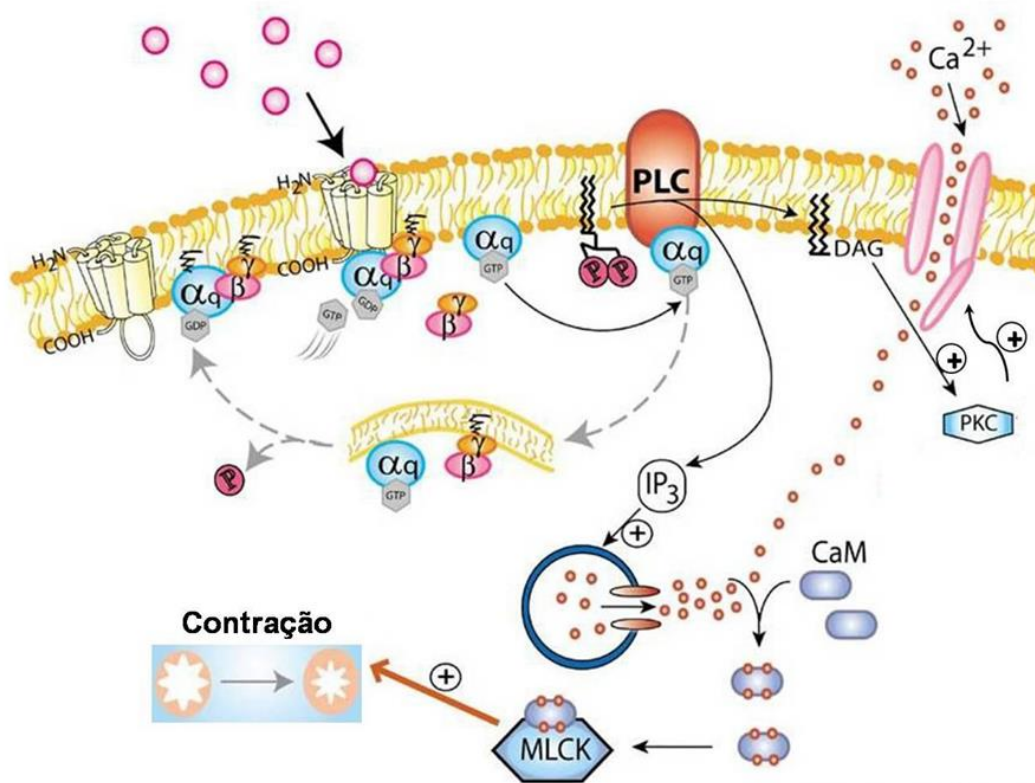


**Figura 5. Parte da sequência de aminoácidos da alça IL3 dos receptores muscarínicos (mRACH).** A alça intracelular IL3, importante para a ligação do mRACH à proteína G, tem parte da sequência de resíduos de aminoácidos mostrada acima. Os resíduos destacados em cinza claro dos receptores M1, M3 e M5 possuem um alto grau de homologia enquanto, nos receptores M2 e M4, essa região é idêntica. (Fonte: Ventura et al., 2010)

Com base nesse padrão de homologia, os mRACH foram divididos em dois grupos: i) receptores M<sub>1</sub> / M<sub>3</sub> / M<sub>5</sub> e ii) receptores M<sub>2</sub> / M<sub>4</sub>. Essas diferenças estruturais tem por consequência diferentes mecanismos de ação e transdução de sinal dos grupos de receptor mRACH .

Os subtipos de mRACH ímpares (M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> e M<sub>5</sub>) acoplam-se através de G<sub>q/11</sub> responsáveis pela estimulação da atividade da fosfolipase C (PLC). O resultado imediato é a hidrólise do 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol da membrana para formar polifosfatos de inositol. O trisfosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) promove a liberação de Ca<sup>2+</sup> intracelular a partir do retículo endoplasmático e a ativação de fenômenos dependentes de Ca<sup>2+</sup>, como a contração do músculo liso e a secreção. O segundo produto da reação da PLC, o 1,2-diacilglicerol (DAG),

ativa a proteína cinase C (PKC) (em conjunto com  $\text{Ca}^{2+}$ ) e a fosfatidilserina. Esse braço da via atua na fosforilação de inúmeras proteínas, produzindo várias respostas fisiológicas (Figura 6). A ativação dos receptores  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  também pode ativar a fosfolipase  $A_2$  ( $\text{PLA}_2$ ), levando a liberação de ácido araquidônico e a consequente síntese de eicosanoides que resulta na estimulação autócrina/parácrina da ciclase de adenilil com consequente aumento do AMP cíclico (AMPc). Estes efeitos são secundários a elevação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (EGLÉN, 2005; BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012).



**Figura 6. Esquema da via da fosfolipase C (PLC) ativada pelas proteínas  $G_{q/11}$  acopladas ao receptor muscarínico (mRACH).** Após ligação do agonista ao mRACH acoplado a proteína  $G_{q/11}$  a PLC é ativada. Ela degrada o 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol ( $PIP_2$ ) presente na membrana em 1,4,5-trisfosfato de inositol ( $IP_3$ ) e 1,2-diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$ , dada sua estrutura hidrossolúvel, migra pelo citosol e ativa receptores específicos de  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) depletando os estoques de  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático (RE). Aumentada a concentração de  $Ca^{2+}$  no citosol, os receptores de rianodina (RyR) são ativados pelo  $Ca^{2+}$  (liberação de  $Ca^{2+}$  induzida pelo  $Ca^{2+}$ ), auxiliando na depleção dos estoques de  $Ca^{2+}$  do RE. O DAG fica associado à membrana plasmática devido à sua estrutura hidrofóbica, tendo a função de ativar a proteína cinase C (PKC), a qual promove a fosforilação de canais de  $Ca^{2+}$  e influxo desse íon. O  $Ca^{2+}$  quando em quantidades elevadas no meio intracelular liga-se a calmodulina (CaM) formando um complexo  $[(Ca^{2+})_4-CaM]$  que ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). O complexo  $[(Ca^{2+})_4-CaM-MLCK]$  constitui a forma ativa da MLCK, que tem como função fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC) e esta fosforilação permite o desencadeamento do mecanismo de ciclicização das pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina favorecendo um deslizamento entre estes filamentos, com o consequente desenvolvimento da contração (Fonte: MARTINS, 2012)

A estimulação dos mRACH  $M_2$  e  $M_4$  leva a interação com outras proteínas G ( $G_i$  e  $G_o$ ) com a resultante inibição da adenililciclase (AC), ocasionando redução do AMPc, ativação dos canais para  $K^+$  retificadores de entrada e inibição dos canais para  $Ca^{2+}$  regulados por voltagem ( $Ca_v$ ) (van KOPPEN, KAISER, 2003). As consequências funcionais desses efeitos são hiperpolarização e a inibição das membranas excitáveis.

Entretanto a especificidade não é absoluta e depende do tráfico apropriado das subunidades de proteína G nas células; em consequência, sistemas heterólogos podem exibir interações alternativas entre as vias mRACH e proteínas G acopladas (NATHANSON, 2008). Além disso, há inúmeros registros sugerindo diferentes localizações subcelulares de subtipos de mRACH específicos em vários tipos de células do sistema nervoso e em várias células não neuronais polarizadas (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012) (Tabela 1).

**Tabela 1. Propriedades dos subtipos de mRCAh.** (Adaptado de BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012; ISHII, KURACHI, 2006)

Características	Subtipo de mRACH				
	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
<b>Localização celular e tecidual</b>	SNC; mais abundante no córtex cerebral, hipocampo e estriado. Gânglios autônomos. Glândulas gástricas e salivares. Nervos entéricos	Amplamente expresso no SNC, cérebro posterior, tálamo, córtex cerebral, hipocampo, estriado, coração, músculo liso, terminações nervosas autônomas.	Amplamente expresso no SNC (< que outros mRACH), córtex cerebral, hipocampo. Abundante nos músculos lisos e glândulas. Coração.	Expresso preferencialmente no SNC, em particular no cérebro anterior, também no estriado, córtex cerebral, hipocampo.	Expresso em baixos níveis no SNC e SNP. O RNAm é predominante nos neurônios no VTA e substância nigra.
<b>Subunidade <math>\alpha</math> da proteína G</b>	G <sub>q/11</sub>	G <sub>i/o</sub>	G <sub>q/11</sub>	G <sub>i/o</sub>	G <sub>q/11</sub>
<b>Resposta celular</b>	Ativação da PLC; aumenta IP <sub>3</sub> e DAG / aumenta Ca <sup>2+</sup> e PKC. Despolarização e excitação. Ativação da PLD <sub>2</sub> e PLA <sub>2</sub> . Aumenta AA.	Inibição da AC; redução do AMPc. Ativação dos canais de K <sup>+</sup> retificadores de entrada. Inibição dos Ca <sub>v</sub> . Hiperpolarização e inibição.	Ativação da PLC; aumenta IP <sub>3</sub> e DAG / aumenta Ca <sup>2+</sup> e PKC. Despolarização e excitação. Ativação da PLD <sub>2</sub> e PLA <sub>2</sub> . Aumenta AA.	Inibição da AC; redução do AMPc. Ativação dos canais de K <sup>+</sup> retificadores de entrada. Inibição dos Ca <sub>v</sub> . Hiperpolarização e inibição.	Ativação da PLC; aumenta IP <sub>3</sub> e DAG / aumenta Ca <sup>2+</sup> e PKC. Despolarização e excitação. Ativação da PLD <sub>2</sub> e PLA <sub>2</sub> . Aumenta AA.
<b>Resposta funcional</b>	Aumento da função cognitiva (aprendizado e memória), da despolarização dos gânglios autônomos, das secreções. Redução da liberação de dopamina e locomoção.	Coração: redução da FC. Músculo liso: aumento da contração. SNP: redução da transmissão ganglionar. SNC: aumento de tremores, hipotermia e analgesia.	Músculo liso: aumento da contração. Glândulas: aumento da secreção. Aumento da ingestão de alimentos, massa corporal e depósitos de gordura. Inibição da liberação de dopamina. Síntese de NO.	Inibição da liberação do transmissor mediada por autorreceptor e heterorreceptor no SNC e SNP. Analgesia. Atividade cataléptica. Facilitação da liberação de dopamina.	Facilita liberação de dopamina. Intensificação do comportamento de procura e recompensa (dependência) relacionado com as drogas.

<b>Agonista não seletivo</b>	Acetilcolina (mRACH e nRACH) / Carbacol (mRACH e nRACH) / Muscarina (específica mRACH) / Pilocarpina (específica mRACH) / Oxotremorina-M (específica mRACH) Metoclopramida (receptor mRACH) / Betanecol (específica mRACH)				
<b>Antagonista não seletivo</b>	Atropina / Escopolamina / QNB (Quinuclidinil-a-hidroxicidifenilacetato)				
<b>Agonista seletivo</b>	McN-A-343 / L-689,660 / Xanomelina CDD-0097	não conhecido	L-689,660	não conhecido	não conhecido
<b>Antagonista seletivo</b>	Pirenzepina / Telenzepina Toxina muscarínica 7 (MT7)	AF-DX 116 / AF-DX 384 Metocramina / Himbacina / Tripitramina	4-DAMP p-Fluorohexahidrosila-difenidol Darifenacina	Tropicamida / Himbacina AF-DX 384	não conhecido
<b>Patologias relacionadas</b>	Doença de Alzheimer. Disfunções cognitivas. Esquizofrenia.	Doença de Alzheimer. Disfunções cognitivas. Dor.	Doença pulmonar obstrutiva crônica. Incontinência urinária. Síndrome do cólon irritável.	Doença de Parkinson. Esquizofrenia. Dor neuropática.	Dependência de drogas. Doença de Parkinson. Esquizofrenia.

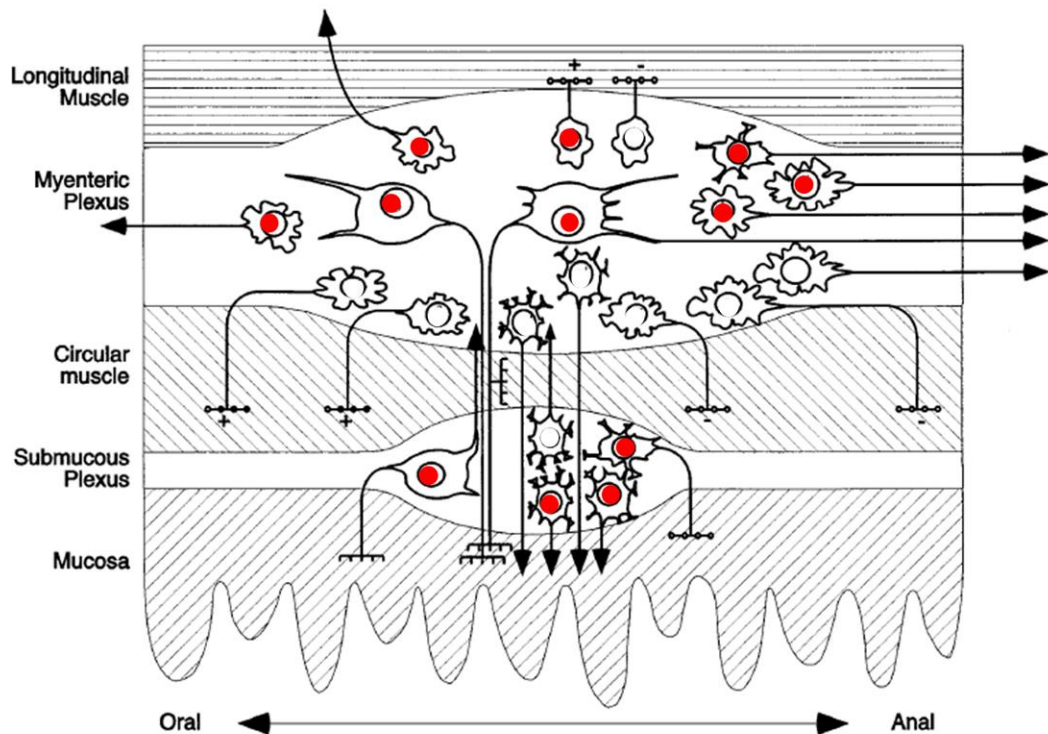
## 1.2 MÚSCULO LISO LONGITUDINAL DO ÍLEO DE COBAIA

O intestino delgado é o componente mais longo das vias digestivas e é dividido em três porções anatômicas: o duodeno, porção inicial mais curta e de maior diâmetro começando no piloro e terminando na junção duodeno-jejunal; o jejuno constitui dois quintos do comprimento total e modifica-se gradualmente para formar a porção seguinte; o íleo, continuação do jejuno que se estende até a junção ileocecal (ROSS, PAWLINA, 2008).

Histologicamente o íleo, assim como todo restante do trato digestivo, é composto por 4 túnicas: sendo a mais interna a mucosa, submucosa, muscular e mais externamente a serosa. A túnica muscular externa consiste em duas camadas concêntricas e relativamente espessas de músculo liso. As células da camada interna formam uma espiral compacta, descrita como camada circular e as células da camada externa formam uma espiral frouxa descrita como camada longitudinal (RO PAWLINA, 2008; GARTNER, HIATT, 2007).

O sistema nervoso entérico (Figura 7), localizado na parede do trato gastrointestinal é dividido no plexo submucoso, situado na submucosa do trato gastrointestinal e plexo mioentérico, situado entre as camadas musculares longitudinal e circular do intestino. Os neurônios do plexo submucoso tem como função principal a regulação da homeostasia dos líquidos corporais enquanto o plexo mioentérico controla, principalmente, a motilidade gastrointestinal. Este último, também denominado como plexo de Auerbach, contém os neurônios motores excitatório e inibidores (podem ser considerados neurônios parassimpáticos pós-ganglionares), interneurônios e neurônios aferentes primários.





**Figura 7. Diagrama esquemático da inervação do sistema nervoso entérico de cobaias.** Tipos morfológicos e projeções dos neurônios entéricos. Os neurônios destacados em vermelho foram imunorreativos à colina acetiltransferase (ChAT), enzima exclusivamente localizada nos terminais de neurônios colinérgicos, por técnicas de imunohistoquímica e "Codificação química" (Adaptado de BROOKES, 2001)

Uma grande variedade de receptores e subtipos de receptores foram identificados como capaz de mediar a contração do músculo liso intestinal. Entre estes estão os receptores para os peptídeos (por exemplo, taquiquininas, endotelina, motilina), aminas (histamina, 5-hidroxitriptamina), pirimidinas / purinas (UTP e ATP) e lipídios (S1P, LPA). Receptores muscarínicos  $M_2$  e  $M_3$  são os tipos de receptores predominantes, embora receptores  $M_3$  mediem majoritariamente a contração (MURTHY et al., 1997, 2003) (Tabela 2). Todos estes receptores encontram-se uniformemente distribuídas em células musculares lisas das camadas circular interna e longitudinal externa, com a exceção de somatostatina, opióides e neuropeptídeo Y (NPY),  $Y_2$  e  $Y_4$  receptores que estão ausentes nas células musculares lisas da camada de músculo longitudinal (MURTHY et al., 2005, MURTHY, MAKHLOUF, 1996).

**Tabela 2. Diversidade da sinalização da proteína G acoplada a receptor em músculo liso do intestino.** (Adaptado de MISRA et al., 2004)

Ligand	Receptor	G protein	Effector	Messenger
ACh	m3	G $\alpha_q$	PLC- $\beta$ 1 $\uparrow$	IP <sub>3</sub> /DAG $\uparrow$
		G $\alpha_{13}$	RhoA $\uparrow$	ROK/DAG $\uparrow$
Endothelin	ET <sub>A</sub>	G $\alpha_q$	PLC- $\beta$ 1 $\uparrow$	IP <sub>3</sub> /DAG $\uparrow$
		G $\alpha_{13}$	RhoA $\uparrow$	ROK/DAG $\uparrow$
SIP	SIP <sub>2</sub>	G $\alpha_q$	PLC- $\beta$ 1 $\uparrow$	IP <sub>3</sub> /DAG $\uparrow$
		G $\beta\gamma_1$	PLC- $\beta$ 3 $\uparrow$	IP <sub>3</sub> /DAG $\uparrow$
ATP/UTP	P <sub>2Y2</sub>	G $\alpha_{13}$	RhoA $\uparrow$	ROK/DAG $\uparrow$
		G $\alpha_{11/2/3}$	AC $\downarrow$	cAMP $\downarrow$
NPY/PP	Y <sub>2</sub> /Y <sub>4</sub>	G $\alpha_q$	PLC- $\beta$ 1 $\uparrow$	IP <sub>3</sub> /DAG $\uparrow$
		G $\beta\gamma_{13}$	PLC- $\beta$ 3 $\uparrow$	IP <sub>3</sub> /DAG $\uparrow$
		G $\alpha_{13}$	AC $\downarrow$	cAMP $\downarrow$
Opioid	$\delta, \mu, \kappa$	G $\alpha_{12}$	AC $\downarrow$	cAMP $\downarrow$
		G $\beta\gamma_{12}$	PLC- $\beta$ 3 $\uparrow$	IP <sub>3</sub> /DAG $\uparrow$
		G $\beta\gamma_{12}$	PI 3-K	
ACh	m2	G $\alpha_{12}$	AC $\downarrow$	cAMP $\downarrow$
		G $\beta\gamma_{13}$	PLC- $\beta$ 3 $\uparrow$	IP <sub>3</sub> /DAG $\uparrow$
		G $\beta\gamma_{13}$	PI 3-K	
Anandamide	CB <sub>1</sub>	$\alpha_{13}$	AC $\downarrow$	cAMP $\downarrow$
		G $\alpha_{12}$	AC $\downarrow$	cAMP $\downarrow$

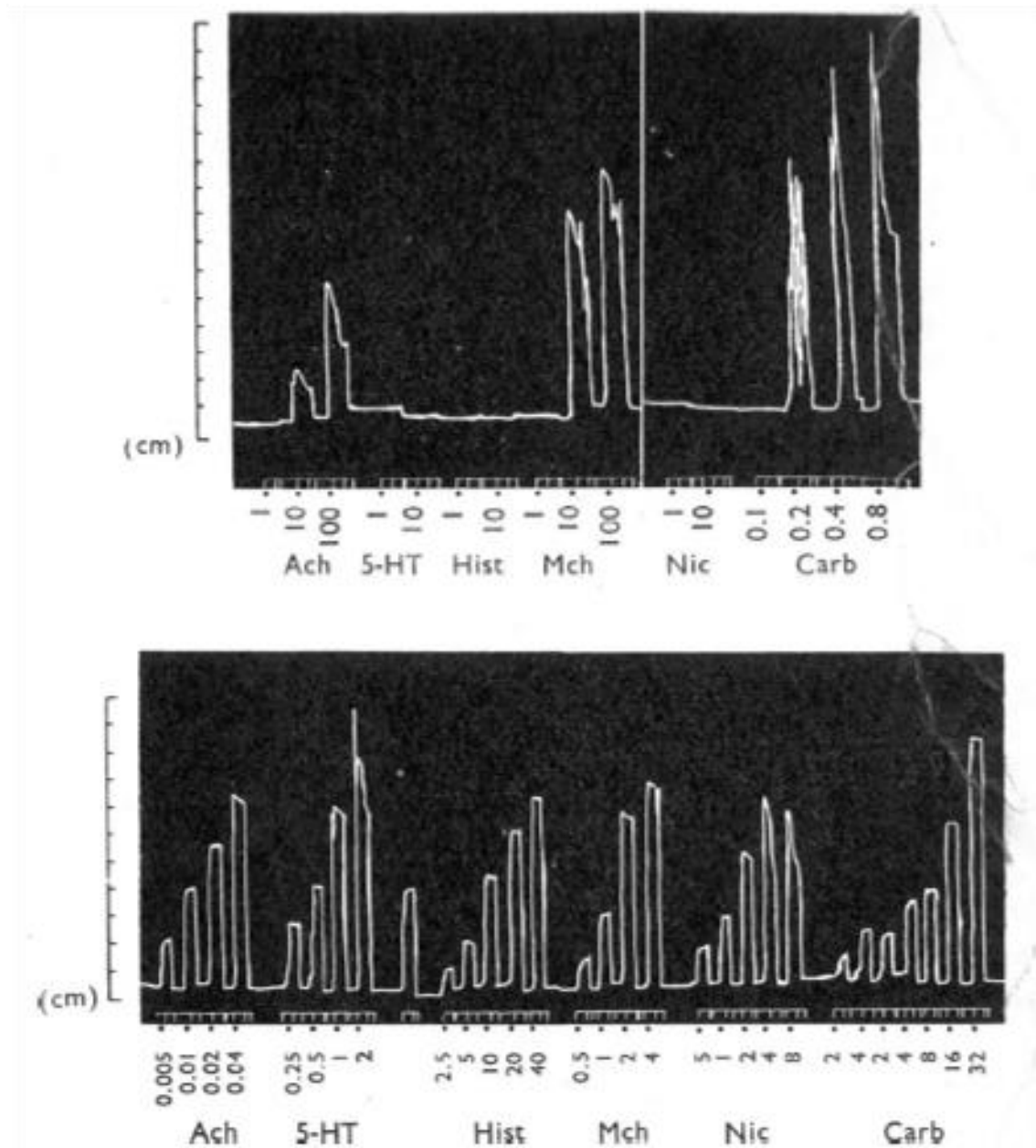
A contração dos músculos lisos em resposta a vários agentes é frequentemente composta por uma componente rápida, chamado fásica, seguida de uma componente mais lenta e sustentada, denominada tônica. Este resposta bifásica tem sido atribuída a uma dupla fonte de Ca<sup>2+</sup> em músculos lisos, intra e extracelular. Porém, existe uma grande variação no comportamento e propriedades de diferentes tipos dos músculos lisos (NOUAILHETAS et al., 1985).

As propriedades das camadas de músculos circulares e longitudinais do intestino foram descritas por vários trabalhos, em coelhos por Feldberg e Solandt (1942) e por Vogt

(1943), cães por Bozler (1949), gatos por Admiraal, Myers e Houten (1955), e também em cobaias, por Kosterlitz e Robinson (1957). Harry (1963) descreveu uma preparação de músculo liso isolado de íleo de cobaia e mostrou que o músculo circular diferia do músculo longitudinal nas suas respostas a fármacos (Figura 8). A preparação longitudinal foi sensível à ACh, metacolina, carbacol (CCh), 5-hidroxitriptamina, histamina e nicotina, enquanto a preparação circular foi insensível a 5-hidroxitriptamina, a histamina e a nicotina, e aos ésteres de colina ela foi sensível apenas em concentrações elevadas. Isso permite inferir que as células do músculo liso das duas camadas são intrinsecamente diferentes (BROWNLEE, HARRY, 1963).

A contração da camada longitudinal do íleo de cobaia depende obrigatoriamente do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais para cálcio dependente de voltagem ( $\text{Ca}_V$ ), uma vez que essa contração é inibida por bloqueadores de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  ou retirada de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular. No entanto, o bloqueio do influxo  $\text{Ca}^{2+}$  ou ausência deste íon no meio extracelular não afeta a contração da camada circular, o que indica que esta depende da mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares para iniciar a contração (GRIDER; MAKHLOUF, 1988; MURTHY; GRIDER; MAKHLOUF, 1991). No músculo longitudinal do íleo de cobaia o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  externo está envolvido em ambas as componentes fásicas e tônicas da resposta. O retículo endoplasmático é pouco desenvolvido de forma que a preparação não contrai em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$  (NOUAILHETAS et al., 1985).

A preparação de músculo longitudinal do íleo de cobaia é uma das mais amplamente estudadas preparações em farmacologia (BARLOW et al., 1972, 1976; FORD et al., 1991; EGLIN et al., 1992a, b, c; HONDA et al., 1993; SILVA et al., 1999). O cobaia foi inicialmente escolhido por um número de razões diversas: baixo custo, facilidade em mantê-los e reproduzi-los, além de raramente morder seus manipuladores. Seu intestino é rapidamente dissecado, razoavelmente longo, e geralmente mecanicamente quiescente quando estudado *in vitro*. Estas funcionalidades tornou-o ideal para o estudo da atividade mecânica muscular, eletrofisiológica, e morfológica, sendo extensivamente estudado e tornando-se um ponto de referência para as comparações com outras preparações (BROOKES, 2001).



**Figura 8. Os efeitos da acetilcolina (ACh), 5-hidroxitriptamina (5-HT), histamina (Hist), nicotina (Nic), metacolina (HCM) e carbacol (Carb) em um segmento de músculo circular e longitudinal.** O registro superior mostra as respostas do segmento de músculo circular e o inferior mostra respostas do segmento de músculo longitudinal. Os números referem-se a concentrações de droga ( $\mu\text{g/ml}$ ) utilizadas no banho de órgãos, com exceção da histamina, metacolina e carbacol, que foram utilizadas  $\text{ng/ml}$  nos segmento de músculo longitudinal. Tempo de sinal = 30 seg. (Fonte: BROWNLEE, HARRY, 1963)

### 1.3 *Micrurus lemniscatus*

As serpentes da família Elapidae são mais encontradas na Ásia, África e Austrália, onde se destacam os gêneros *Naja*, *Bungarus* e *Oxyuranus*. No Brasil, são popularmente conhecidas como “cobras corais” e agrupadas em três gêneros: *Micrurus*, *Leptomicrurus* e *Micruroides* (MELGAREJO, 2003).

O gênero *Micrurus* reúne 57 espécies e mais de 120 subespécies (ALAPE-GIRON et al., 1994; BARROS et al., 1994; AIRD, DA SILVA JR, 1991), e apresenta ampla dispersão geográfica, ocorrendo nos Estados Unidos, México, na Mata Atlântica, do Nordeste ao Sudeste do Brasil, e no Cerrado, além de outros países da América do Sul (GIRAUDO, SCROCCHI, 2002; CAMPBELL, LAMAR, 2004).

*Micrurus lemniscatus* (Figura 9) apresenta um porte maior quando comparado às outras cobras corais, podendo chegar a 1,5 metros de comprimento. O focinho é rombudo e preto, com uma faixa internasal branca.

No Brasil são registradas quatro subespécies: *M. l. lemniscatus*, *M. l. carvalhoi*, *M. l. diutius*, *M. l. helleri* (MELGAREJO, 2003). Habitam em áreas florestadas e abertas, geralmente em locais com bastante umidade, e também ambientes antropizados (CAMPBELL, LAMAR, 2004). Alimentam-se de presas com corpo alongado, como serpentes, anfisbenídeos e peixes (SAZIMA, ABE, 1991) e observa-se tanto atividade diurna quanto noturna, principalmente durante a estação chuvosa, novembro-fevereiro (MARTINS, OLIVEIRA, 1998).



**Figura 9.** *Micrurus lemniscatus*. Apresenta pescoço curto, pouco pronunciado, adaptado a escavação, cabeça oval, recoberta por grandes placas simétricas, dentição proteróglifa, sem fosseta loreal, olhos pequenos e pretos com pupilas elípticas verticais e geralmente localizadas em uma faixa preta na cabeça. (Fonte: <<http://www.flickr.com/photos/nclarkii/3903579203/sizes/z/in/photostream/>>, acesso em 11 de agosto de 2011)

## 1.4 VENENOS ELAPÍDEOS

Até o ano de 2012, foram reconhecidas 386 espécies de serpentes no país (BÉRNILS, COSTA, 2012) de forma que o Brasil continua a ocupar a segunda colocação na relação de países com maior riqueza de espécies de répteis; ficando atrás apenas da Austrália.

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas representam significativo problema de saúde pública, especialmente em países tropicais, pela frequência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam (PINHO et al., 2004). No Brasil foram registrados, em 2010, 29.635 acidentes por serpentes, dentre os quais 85% foram ocasionados por serpentes peçonhentas. A incidência registrada foi de 15,5 acidentes / 100.000 habitantes e a taxa de letalidade foi de 0,5% (PORTAL DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A porcentagem de acidentes atribuída ao gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* é 90,5%, 7,7% e 1,4%, respectivamente, enquanto acidentes causados por *Micrurus* representam 0,4% dos acidentes ofídicos (OLIVEIRA et al., 2009). Entretanto, apesar do baixo índice de acidentes causados por esse gênero, o envenenamento pode ser considerado extremamente grave (AIRD; SILVA JR, 1991).

O efeito provocado pelo envenenamento produzido pelas serpentes da família Elapidae, a qual engloba o gênero *Micrurus*, são muito variados e complexos. As manifestações clínicas predominantes estão relacionadas às ações neurotóxicas e miotóxicas do veneno sobre a junção neuromuscular, causando bloqueio da transmissão nervosa periférica (WEIS, 1971). Os sintomas observados no paciente acometido por esse tipo de envenenamento aparecem em torno de 30 a 60 minutos após o acidente e estão relacionados à paralisia dos nervos cranianos, ptose palpebral, distúrbios visuais, paralisia facial, dificuldade na fala e na deglutição, salivação, hemorragia interna, incontinência urinária e coagulopatia. A morte geralmente é devida a uma paralisia respiratória de origem periférica (VITAL BRAZIL, 1990; KARALLIEDDE, 1995; PHUI YEE et al., 2004).

Estudos realizados com gênero *Micrurus*, permitiram identificar que os venenos possuem dois mecanismos de ação neurotóxicos, elucidados do ponto de vista bioquímico e farmacológico apenas para poucas espécies (CECCHINI et al., 2005). São reconhecidas neurotoxinas com ações pré-sinápticas e pós-sinápticas. As neurotoxinas pré-sinápticas

compreendem principalmente as  $\alpha$ -neurotoxinas que são caracterizadas por sua atividade de PLA<sub>2</sub> interferindo na liberação de ACh na fenda sináptica. As neurotoxinas pós-sinápticas compreendem as  $\alpha$ -neurotoxinas, que podem ser caracterizadas como proteínas com estrutura *three fingers* (3FTx) desprovidas de ação enzimática e que atuam interagindo com receptores colinérgicos. Neurotoxinas pós-sinápticas foram isoladas do veneno de *Micrurus surinamensis* e *Micrurus frontalis* e atuam competindo com a ACh nos nRACH das membranas pós-sináptica da junção neuromuscular dos nervos motores (ação semelhante ao curare) (SILVA JR.; BUCARETCHI, 2003). A peçonha de *M. corallinus* apresenta atividades pré e pós-sináptica, enquanto a peçonha de *M. lemniscatus* possuem apenas neurotoxinas pós-sinápticas (VITAL BRAZIL, 1987; CECCHINI et al., 2005).

Porém, há descrição sobre mecanismos de ação do veneno para apenas algumas espécies de *Micrurus*, uma vez que os estudos são limitados devido às dificuldades na correta identificação das espécies, na extração do veneno e na manutenção dos animais em cativeiro (TANAKA et al., 2010; CISCOTTO et al., 2011). Assim, estratégias proteômicas e transcriptômicas têm sido utilizadas na tentativa de elucidar sua composição. A análise do transcriptoma da glândula e do veneno da *Micrurus altirostris* e da *Micrurus Corallinus* indicou a presença de 3FTx e de PLA<sub>2</sub> como proteínas predominantes na composição do veneno em relação a ambas as espécies (LEAO et al., 2009; CORRÊA-NETTO, 2011).

Venenos de serpentes são compostos por uma grande variedade de proteínas, peptídeos e outras moléculas orgânicas e inorgânicas, com diversas atividades biológicas as quais compreendem uma estratégia evolutiva que promove a imobilização, morte, e digestão de presas, servindo como um mecanismo de defesa contra predadores (KOCHVA; OVADIA, 1983; MEBS, 1999).



## 1.5 TOXINAS MUSCARÍNICAS

As toxinas dos venenos podem ser agrupadas em superfamílias com atividade enzimática e não enzimática. Algumas das bem caracterizadas superfamílias de proteínas do veneno de serpentes elapídicas incluem toxinas 3FTxs, PLA<sub>2</sub>, L-amino oxidases, lectinas, serinoproteases, metaloproteases e nucleotidases (FERNANDÉZ et al., 2011). Dentro de uma mesma família pode-se observar uma grande similaridade em termos estruturais (estrutura primária e terciária), podendo haver, entretanto, divergências nos aspectos farmacológicos (KINI; DOLEY, 2010).

Dentre as 3FTxs, estão as neurotoxinas que irão interferir na neurotransmissão colinérgica, conhecidas como toxinas muscarínicas (CLARKE et al., 1985; HARVEY, 2001; HARVEY et al., 2002). Estes polipeptídios não enzimáticos de 60 a 74 resíduos de aminoácidos, 4-5 pontes dissulfeto, com estrutura muito conservada e massa molecular de 6 a 8 kDa (CHANGEUX, 1990; KARLSSON, et al., 2000; KINI, 2002) são o alvo deste trabalho.

Oito toxinas muscarínicas foram isoladas do veneno, *D. angusticeps* e três a partir do veneno da mamba preta, *D. polylepis*, por diferentes técnicas (ADEM et al., 1988; JOLKKONEN et al., 1994; VANDERMEERS et al., 1995; JOLKKONEN et al., 1995; MAX et al., 1993). As toxinas da mamba verde são chamados de MT-1, 2, ... MT-7 de acordo a ordem em que foram descobertos ou m1-toxina, que se refere à seletividade da toxina pelo subtipo de mACh. As toxinas das mambas pretas foram denominadas MT $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (JOLKKONEN et al., 1995), as quais indicam também a ordem da descoberta. Nove toxinas foram sequenciadas por métodos químicos, e a sequência de duas toxinas da serpente *D. polylepis* também foram deduzidas a partir da sequência de nucleotídeos da biblioteca de cDNA (DUCANCCEL et al., 1991; ADEM; KARLSSON, 1997; KARLSSON, 2000). Todas as sequências apresentaram grande homologia (Figura 10). A mamba verde ocidental, *Dendroaspis viridis*, também possui toxinas semelhantes, mas nenhuma foi caracterizada em detalhe até o momento (BRADLEY, 2000).

**A**

Toxin	Receptor subtype: affinity (K <sub>i</sub> ) in nM				
	m1	m2	m3	m4	m5
<i>D. angusticeps</i>					
MT-1 (n= 7)	49	>1000	>1000	58	>1000
MT-2 (n= 3)	1500	>2000	>2000	760	>2000
MT-3 (n= 4)	78	>1000	>1000	2	>1000
MT-4 (n= 3)	62	>1000	>1000	87	>1000
MT-5 (n= 3)	180	>1000	>1000	540	>1000
MT-6 (n= 1)	190	>425	>425	3.6	>425
m1-toxin <sup>3</sup>	0.1	NB	NB	8	NB
MT-7 (n= 3)	0.2	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>D. polylepis</i>					
MT-α (n= 3)	23	44	3	5	8
MT-β (n= 3)	>1000	>2000	140	120	350
Pirenzepine (n=4)	11	470	220	50	130
Himbacine (n=4)	210	12	140	13	4500

**B**

	1	10	20	30	40	50	60	66
MT1	LTCVTSKSI	FGITTE	NC PDGQNL	CFKKWY	YIVPRYS	DITWGCAAT	CPKPTNV	RETIRCCETDKCNE
MT2	LTCVTTKSI	IGGVTT	EDCPAGQNV	CFKRWHY	VTFPKNY	DIKGC	AATCPKVDNN	-DP
MT3	LTCVTKNTI	FGITTE	NC PDGQNL	CFKRWHY	VIPRYTE	ITRGCAAT	CP	IPENY-DSIHCKTDKCNE
MT4	LTCVTSKSI	FGITTE	NC PDGQNL	CFKKWY	YIVPRYS	DITWGCAAT	CPKPTNV	RETIRCCETDKCNE
MT5	LTCVTSKSI	FGITTE	NC PDGQNL	CFKRRHY	VVPKIY	DITRGC	VATCPK	PENY-DSIHCKTDKCNE
MT7	LTCVKNSNI	WFPTSE	DCPDGQNL	CFKRWQY	ISPRMY	DFTRGC	AATCPKAEYR	-DVINCCGTIDNK
m1	LTCVKNSNI	WFPTSE	DCPDGQNL	CFKRWHY	ISPRMY	DFTRGC	AATCPKAEYR	-DVINCCGTIDNK
MTα	LTCVTSKSI	FGITTE	NC PDGQNL	CFKKWY	YLNHRY	SDITWGCAAT	CPKPTNV	RETIRCCETDKCNE
MTβ	LTCVTSKSI	FGITTE	DCPDGQNL	CFKRRHY	VVPKIY	DITRGC	VATCP	IPENY-DSIHCKTDKCNE

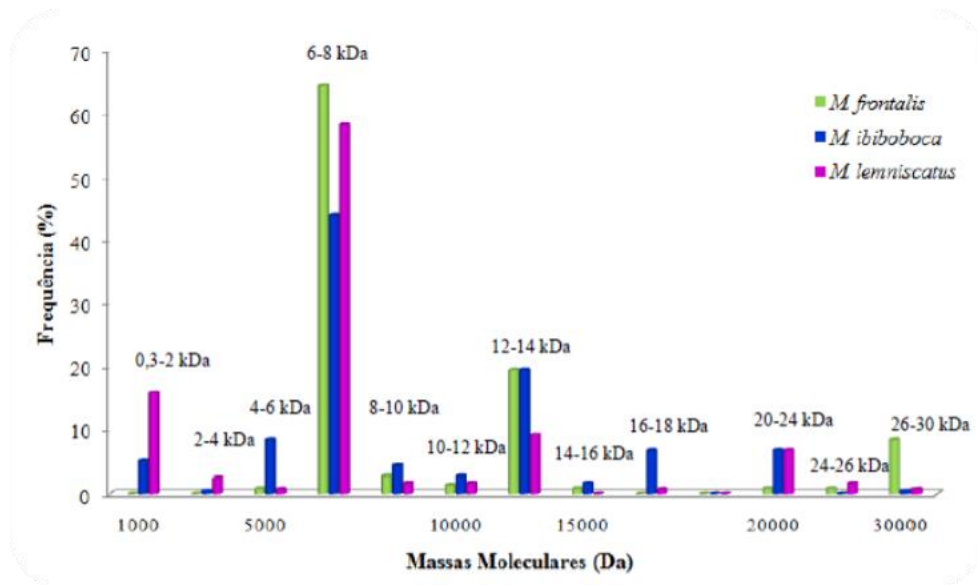
**Figura 10. Caracterização de algumas das toxinas de mambas australianas já descritas.** (A)- Afinidade das toxinas de *D. angusticeps*, *D. polylepis* e antagonistas muscarínicos pirenzepina e himbacina (M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>, respectivamente) a receptores muscarínicos de acetilcolina (mRACH) humanos clonados e expressos em células de ovário de hamster chinês. Quanto menor o valor de K<sub>i</sub>, maior a afinidade da toxina pelo subtipo de receptor. OS valores muito altos de K<sub>i</sub> para MT-2 indicam que a toxina provavelmente foi inativada por hidrólise. MT-β também foi parcialmente inativada. (B)- Homologia na sequência das toxinas. Os aminoácidos invariantes são marcados com dois pontos. (Fonte: ADEM, KARLSSON, 1997)

As primeiras duas toxinas muscarínicas (MT-1 e MT-2) foram isoladas do veneno da serpente australiana mamba verde, *Dendroaspis angusticeps*, da família Elapidae. Adem e colaboradores (1988) e Jerusalinsky e colaboradores (1992) mostraram que as toxinas tem alta afinidade por mRACH M<sub>1</sub> de membranas de sinaptossomas do córtex de ratos. Em 1994 a MT-1 foi caracterizada por Jolkkonen o qual verificou sua atividade contrátil, quando testada em íleo de cobaia. MT-1 e MT-2 comportam-se como agonistas muscarínicos na tarefa de esquivia inibitória em ratos, e como agonistas relativamente seletivos dos mRACH M<sub>1</sub> em canais deferentes de coelho (HARVEY, 2002).

Devido à grande seletividade das neurotoxinas presente nos venenos de algumas serpentes australianas, diversos estudos têm avaliado o perfil farmacológico de outros venenos frente aos subtipos de receptores muscarínicos. Técnicas de eletroforese, imunquímica e cromatografia, utilizando venenos de *Micrurus*, tem mostrado a presença de componentes com perfil semelhante ao de outras toxinas elapídicas (CECCHINI et al., 2005) que já tiveram sua atividade muscarínica comprovada.

Estudos proteômicos do veneno de *Micrurus nigrocinctus*, através de sequenciamento e alinhamento dos peptídeos a bancos de dados identificaram homologia de 4 amostras a três toxinas muscarínicas de *Dendroaspis angusticeps*, mt-7 e uma toxina de *Naja kaouthia* proteína-2 (FERNANDÉZ et al., 2011).

Ciscotto e colaboradores demonstraram, em 2011, a distribuição de massas moleculares em função da frequência de ocorrência, nos venenos de *Micrurus lemniscatus*, sendo 6-8 kDa a massa mais recorrente (Figura 11).



**Figura 11. Distribuição da massa molecular em função da frequência de ocorrência nos venenos das serpentes.** A faixa de massas mais abundantes correspondente às *three fingers* (3FTxs). (Fonte: CISCOTTO et al, 2011)

Em 2011, a primeira toxina muscarínica do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus*, MT-M1 $\alpha$  (7,048 kDa), foi isolada e apresentou atividade antagonista nos receptores muscarínicos no hipocampo de ratos com uma  $CI_{50}$  33,1 nM. A nova toxina muscarínica também teve os primeiros 12 resíduos de aminoácidos da sequência N-terminal determinados. Essa caracterização mostrou alta homologia com as proteínas 3FTxs que atuam nos receptores colinérgicos (SILVA et al., 2011).

# Justificativa

## 2 JUSTIFICATIVA

Desde 1971, quando foi isolado do veneno de *Bothrops jararaca* o peptídeo que culminou no desenvolvimento do anti-hipertensivo captopril, os venenos de serpentes têm sido considerados fontes ricas em compostos bioativos potencialmente úteis (JIMÉNEZ, MUNÓZ, 2009). Atualmente, seu uso como agente terapêutico é baseado na medicina popular, contudo, estudos recentes têm fornecido a fundamentação científica para tal uso.

As toxinas muscarínicas apresentam-se como ferramentas úteis para o estudo das funções fisiológicas e proporcionam um ponto de partida para a análise da relação estrutural-atividade de diferentes subtipos de receptores muscarínicos. A identificação e caracterização de agonistas e/ou antagonistas muscarínicos isolados do veneno de serpentes (ADEM et al., 1988; JERUSALINSKY et al., 1992; JOLKKONEN et al., 1994; HARVEY, 2002) também pode ter grande potencial no esclarecimento e na farmacoterapia de patologias relacionadas à disfunção desses receptores, como doença de Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, dependência de drogas e outras (LANGMEAD, WATSON, REAVILL, 2008; VENTURA et al., 2010; SCARR, 2012)

Com base na constatação de que venenos de serpentes do gênero *Micrurus* são ricos em toxinas muscarínicas (CISCOTTO et al., 2011) e estas apresentam seletividade à subtipos de mACh (SILVA et al., 2011), expõe-se a valiosa oportunidade na pesquisa de moléculas farmacologicamente ativas e na compreensão dos mecanismos de ação das toxinas. Para investigar a hipótese de uma atividade muscarínica no veneno de *Micrurus lemniscatus* avaliamos seus efeitos *in vitro* em modelos de banho de órgão isolado utilizando músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, técnica bem estabelecida e largamente utilizada.

# Objetivos

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade muscarínica do veneno bruto, bem como de suas respectivas frações semi-purificadas e de uma toxina isolada, da serpente *Micrurus lemniscatus*, utilizando segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de banho de órgão, com segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Investigar uma provável atividade do veneno bruto de *Micrurus lemniscatus* sob a resposta muscarínica em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia;
- Selecionar algumas frações semi-purificadas do veneno de *Micrurus lemniscatus* e investigar sua possível atividade muscarínica em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia;
- Avaliar o potencial de uma ou mais toxinas isoladas para investigar sua possível atividade muscarínica em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia.



# Material e Métodos

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAL**

#### **4.1.1 Animais experimentais**

Os cobaias (*Cavia porcellus*), machos, com peso entre 300 e 500g, foram fornecidos pela Agronema Agricultura Sustentável (Belo Horizonte, Brasil) e acondicionados em uma sala do Departamento de Bioquímica e Imunologia no bloco F2 do Instituto de Ciências Biológicas (UFMG - Belo Horizonte). Os cobaias foram mantidos em caixas de plástico 120 x 60 x 60 cm em grupos de 4 animais, com forragem de maravalha, controle adequado de luz (6:00 às 18:00 horas), temperatura (22 a 24 °C) e higiene por um período de 7 dias, para ambientação; com total acesso à água, à ração e capim (com finalidade de suprir a vitamina C aos animais).

Doze horas antes da realização dos experimentos (adaptado de DANIEL et al., 2001), os cobaias foram submetidas à restrição alimentar com livre acesso à água. O jejum é necessário para que o intestino mantenha-se o mais vazio possível, de forma a minimizar as manipulações durante a lavagem intraluminal e consequentes lesões ao tecido de interesse, assim como diminuir a motilidade espontânea ocasionada pela presença do bolo fecal, o que dificultaria a estabilidade da preparação.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Processo nº CETEA 367/2012) (Anexo A).

#### **4.1.2 Obtenção do veneno bruto, frações semi-purificadas e toxina isolada**

O *pool* de veneno, liofilizado, das serpentes da espécie *Micrurus lemniscatus* foi gentilmente cedido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, Brasil), fracionado por técnicas de HPLC e as massas moleculares determinadas por espectrometria de massas, sendo ambas as técnicas realizadas pela doutoranda Micheline Donato (Anexo B).

### 4.1.3 Reagentes e drogas

A maioria dos reagentes utilizados foi de grau analítico.

#### Lista de reagentes:

Ácido clorídrico (HCl) : Quimex  
Albumina de soro bovino: Sigma-Aldrich  
Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>): Vetec  
Carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>): Quimex  
Cloreto de cálcio bi-hidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O): Isofar  
Cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>): Merck  
Cloreto de potássio (KCl): Reagen Quimibrás  
Cloreto de sódio (NaCl): Isofar  
D-glicose: Sigma-Aldrich  
Dimetilsufóxido (DMSO): Sigma-Aldrich  
Fosfato diácido de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): Reagen  
Hidróxido de sódio (NaOH): Vetec  
Reagente de Folin: Laborclin  
Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>): Merck  
Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O): Vetec  
Tartarato de sódio e potássio anidro: J.T.Baker

#### Lista de drogas:

1,1-Dimetil-4-difenilacetoxipiperidínio iodado (4-DAMP): Sigma-Aldrich  
Atropina: Sigma-Aldrich  
Cloridrato de carbamilcolina (Carbacol - CCh): Sigma-Aldrich  
Metocramina hidratada: Sigma-Aldrich

#### 4.1.4 Soluções

Foi utilizada como solução nutritiva o Krebs-Ringer-Henseleit (KRH) (Tabela 3) aerado com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), pH 7,4 ajustado com HCl 6 N. Além da solução de uso, preparada apenas no dia do experimento, foram produzidas soluções estoques 20x mais concentradas que as de uso. Todas as soluções foram armazenadas à 4° C.

**Tabela 3. Concentração dos reagentes na solução de Krebs-Ringer-Henseleit (KRH)**

Reagente	Solução de uso Concentração (mM)	Soluções 20x
NaCl	118,4	A
KCl	4,7	B
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	C
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,2	D
NaHCO <sub>3</sub>	25	E
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5	*
D-glicose	11,1	*

\*Não foram preparadas soluções de D-glicose. O reagente era adicionado somente na solução de uso, assim evitando o desenvolvimento de fungos.

#### 4.1.5 Equipamentos

AD Instruments - Power lab 8/30, modelo ML 870

Balança Analítica SHIMADZU, modelo AY220

Balança Semi-Analítica SHIMADZU, série BL-320H

Banho Maria Dubnoff Microprocessado, modelo Q226M2

Micro Aspirador Nevoni, modelo 5005

Muscle Strip Myograph System, modelo 820Ms

Thermo Scientific Varioskan Flash Multimode Reader

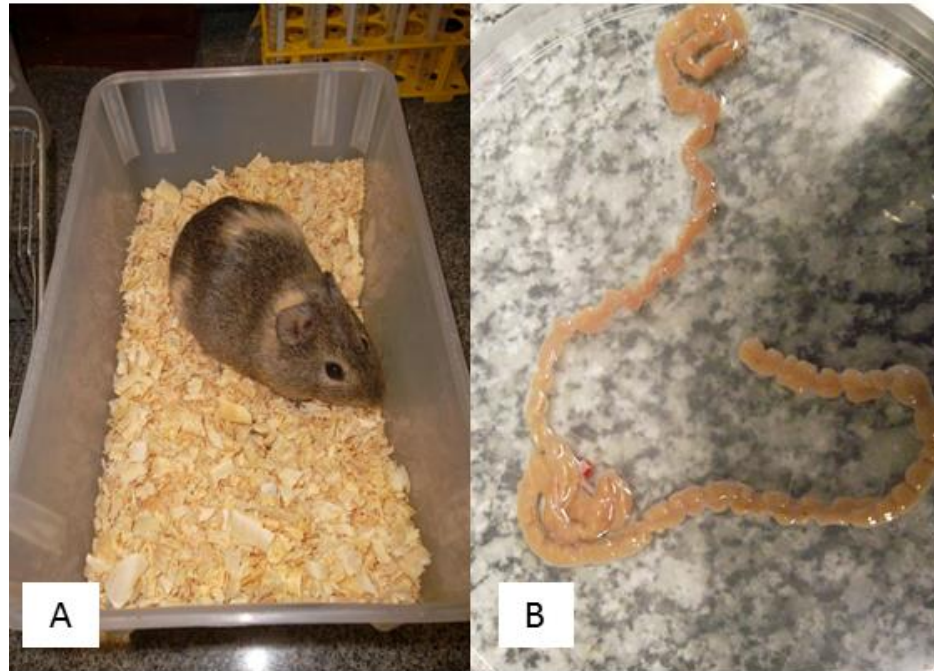
## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Determinação de proteínas totais pelo método de Lowry**

As proteínas totais do veneno bruto, das frações semi-purificadas e da toxina isolada foram estimadas através de microdosagem em placas de ELISA, de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951), com modificações, utilizando-se albumina sérica bovina (1 mg/mL) como padrão.

### **4.2.2 Eutanásia e dissecação**

Os cobaias (Figura 12A), sob restrição alimentar, eram eutanasiados por decapitação, utilizando a guilhotina, exsanguinados pela secção dos vasos cervicais e em seguida sofriam uma incisão abdominal na qual o intestino era exposto e em seguida um segmento do íleo, de aproximadamente 20 cm, era removido e colocado em uma placa de Petri contendo solução de KRH a 37°C sob aeração com mistura carbogênica (Figura 12B).

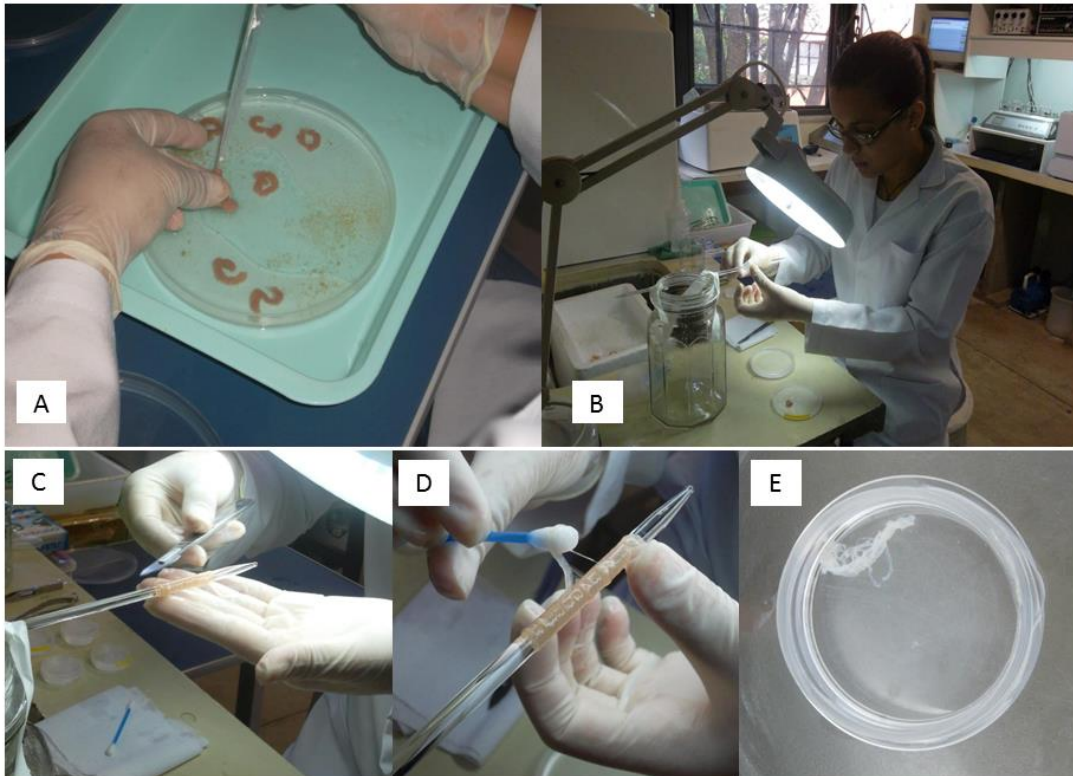


**Figura 12. Segmento do íleo de cobaia dissecado.** (A)- Cobaia em jejum. (B)- Segmento do íleo de aproximadamente 20 cm de comprimento mantido em solução de KRH.

Após secção da parte distal do intestino delgado e remoção do tecido conectivo e aderências de gordura, o íleo era segmentado em porções de 3-4 cm e seu lume lavado (com solução de KRH aerada) introduzindo-se uma pipeta em uma de suas extremidades, com uma inclinação máxima de 30°, de forma a minimizar a pressão do líquido e consequente dilaceração do tecido (Figura 13A).

A camada muscular longitudinal externa do íleo de cobaia era obtida segundo o método de Range (1964), com modificações. O segmento era inserido, através de seu lume, em um bastão de vidro previamente fixado, em posição perpendicular, a um suporte (Figura 13B). Com um bisturi, removeu-se o mesentério e fez-se um corte perpendicular ao longo de sua inserção, de modo a atingir somente a camada muscular mais externa, a qual corresponde ao músculo longitudinal (Figura 13C).

Utilizando-se uma haste flexível com extremidade revestida por algodão umedecido em solução de KRH aerada, removeu-se o músculo longitudinal juntamente com a serosa através de movimentos tangenciais à parede do músculo circular a partir do corte feito na inserção do mesentério (Figura 13D). Os segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia (Figura 13E) eram mantidos sob aeração constante durante e após dissecação.



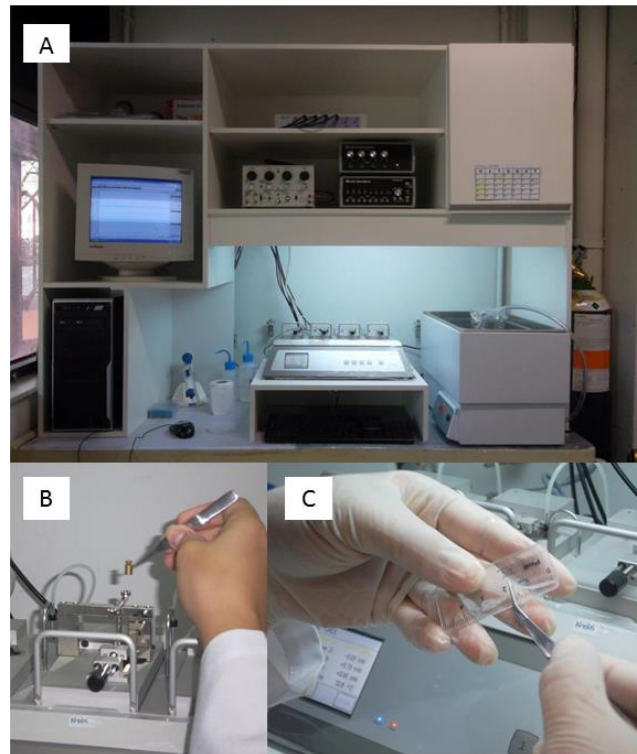
**Figura 13. Dissecação do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia.** (A)- Lavagem intraluminal para eliminação do muco e resíduos alimentares. (B)- Inserção do íleo no bastão de vidro. (C)- Corte longitudinal superficial. (D)- Remoção da camada muscular longitudinal e serosa. (E)- Segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia.

### 4.2.3 Padronização da técnica de banho de órgão

De acordo com a literatura os valores de tensão, concentrações de KCl, temperatura de incubação e tempo de estabilização variam bastante (TAKAYANAGI et al., 1998; REDDY et al., 1995; NASU, OU, 2000; DONNERER, LIEBMANN, 2009; NASU, YANAGIMOTO, SHIBATA, 1997; AKBULUT et al., 1999; SANTOS et al., 2012). Dessa forma foram realizados experimentos pilotos com 2 tensões diferente (0,5 g e 0,25 g), com 3 concentrações para KCl (40, 60 e 80 mM), 2 temperaturas (37 °C e 30 °C, sendo esta última utilizada para minimizar contrações espontâneas) e 2 tempos de estabilização (30 e 60 minutos), fazendo combinações entre os diferente parâmetros. Os valores citados posteriormente foram os que apresentaram melhor resposta no sistema utilizado (Figura 14A), sendo aplicados nos experimentos subsequentes.

Após calibração do transdutor de força (sensibilidade 10 mg) do banho de órgão (Muscle Strip Myograph System, modelo 820 Ms) e do sistema de aquisição de dados (LabChart 7 Pro) (Figura 14B), os segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia com aproximadamente 1,5 cm de comprimento (Figura 14C) eram presos ao suporte de fixação e suspensos individualmente em cubas contendo 7 mL de KRH, sob aeração contínua com mistura carbogênica (5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>) e temperatura de 37 °C.





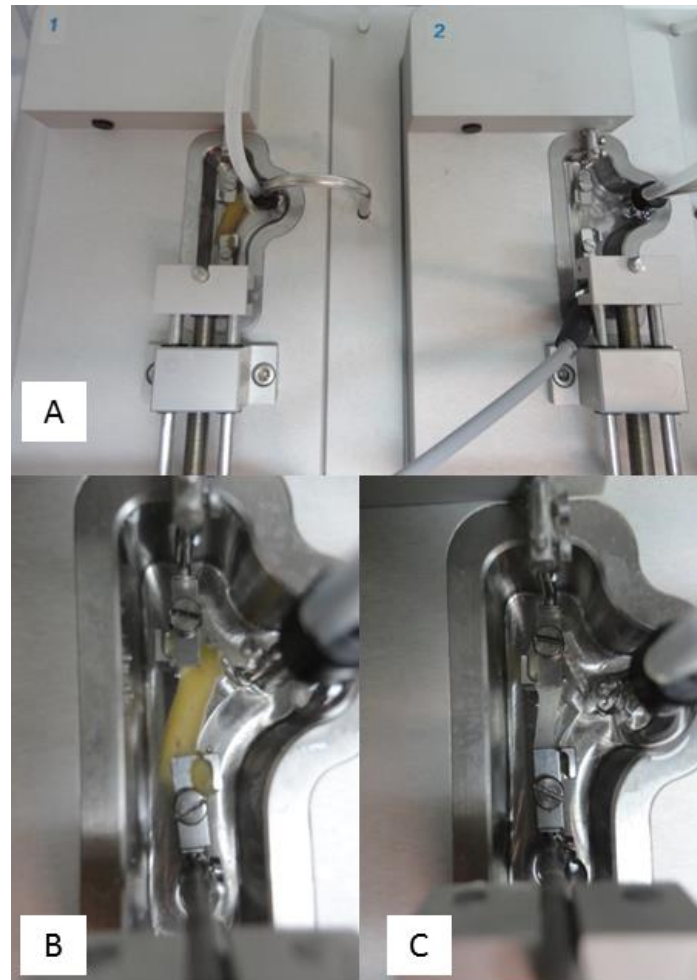
**Figura 14. Técnica de banho de órgão.** (A)- Sistema utilizado para montagem da preparação e aquisição dos registros. (B)- Calibração. (C)- Segmentos de 1,5 cm de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia.

Durante o período de 60 minutos os segmentos foram mantidos sob tensão de repouso de 0,25 g (equivalente à 2,5 mN), tempo mínimo necessário para a estabilização da preparação. Ao longo do período de estabilização, a cada 10 minutos, a solução era trocada para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA, ALTURA, 1970) e a tensão era ajustada de forma que ao final dos 60 minutos os segmentos mantivessem essa tensão basal.

Após esse período era realizado um teste de viabilidade tecidual com KCl 80 mM, o qual promove contração imediata por depolarização. A contração mínima para considerar o segmento viável era de 1,5 g. Os segmentos que apresentassem contração inferior eram descartados. Foi padronizado um tempo de 30 minutos de repouso da preparação após lavagem da solução de KRH contendo KCl. Logo após esse intervalo iniciaram-se os testes e as contrações isométricas eram registradas.

Foram realizados experimentos pilotos tanto com segmento de íleo intacto (Figura 15A e 15B) quanto com o músculo liso longitudinal isolado (Figura 15A e 15C), sendo ambos com o mesmo comprimento. Devido ao tamanho do suporte de fixação ligado ao transdutor de

força, quantidade de muco secretada pela preparação e reprodutibilidade dos experimentos optou-se por dar continuidade apenas com o músculo longitudinal isolado.



**Figura 15. Segmentos suspensos presos ao suporte de fixação.** (A)- Visão geral das montagens das preparações. (B)- Segmento de íleo intacto. (C)- Segmento de músculo longitudinal isolado.

#### 4.2.4 Protocolos

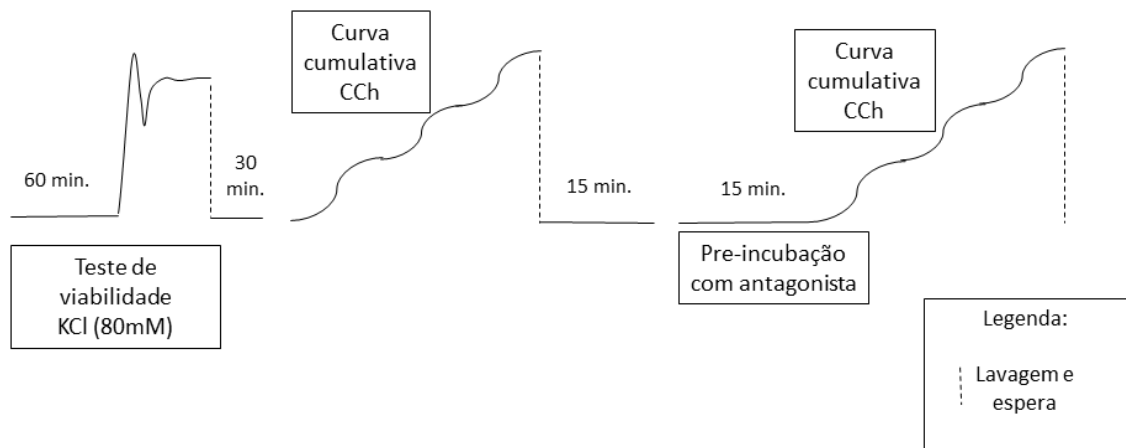
As concentrações das drogas utilizadas foram calculadas em molaridade (M) enquanto as concentrações do veneno bruto foram representadas em microgramas por mililitro ( $\mu\text{g/mL}$ ).

#### **4.2.4.1 Padronização dos controles: Efeito dos antagonistas frente às curvas contrações-resposta cumulativas induzidas por carbacol (CCh) em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia**

Após o período de estabilização e verificação de viabilidade da preparação, uma curva concentração-resposta cumulativa com o agonista muscarínico não seletivo, CCh, era obtida estabelecendo-se o mínimo (0%) e o máximo (100%) de contração dos segmentos de músculo liso longitudinal (Figura 16). As concentrações de CCh utilizadas eram:  $10^{-9}$  M,  $3 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $3 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $3 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M e  $3 \times 10^{-6}$  M.

Em seguida, a preparação era lavada com KRH e após intervalo de 15 minutos os antagonistas eram pré-incubados individualmente. Atropina, antagonista muscarínico não seletivo; 4-DAMP, antagonista seletivo para os mRACH  $M_3$ ; e metoctramina, antagonista seletivo para os mRACH  $M_2$  foram utilizados na concentração de  $10^{-7}$  M.

Passados os 15 minutos de pré-incubação a curva concentração-resposta cumulativa ao CCh era repetida na presença do antagonista até atingir o máximo de contração (Figura 18). A inibição da resposta submáxima do CCh foi avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição dos antagonistas à cuba. A contração máxima promovida pelo CCh (máximo de contração subtraído da linha de base) foi considerada 100% e o resultado era normalizado em porcentagem de contração em relação a contração máxima de CCh. A concentração de CCh necessária para promover 50% de contração máxima ( $CE_{50}$ ) era obtida por regressão não-linear.



**Figura 16. Efeito dos antagonistas frente às contrações-resposta cumulativas induzidas por CCh em músculo liso longitudinal de íleo de cobaia. Protocolo experimental.**

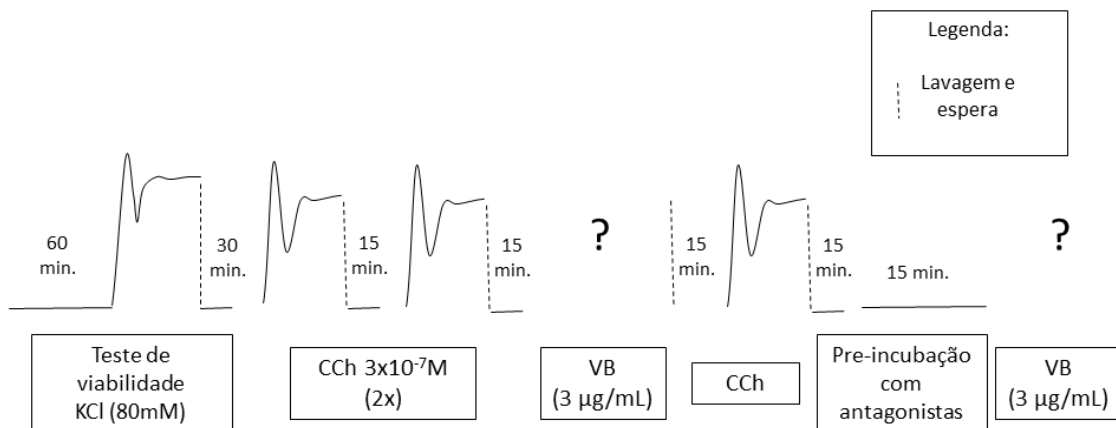
#### **4.2.4.2 Padronização do veneno bruto (VB) e frações semi-purificadas: Efeito dos antagonistas frente à atividade induzida por VB e frações semi-purificadas em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia**

Após período de estabilização e verificação da viabilidade da preparação, duas contrações fásicas de amplitudes similares, com intervalos de 15 minutos, eram obtidas com  $3 \times 10^{-7}$  M de CCh (Figura 17), concentração sub-máxima, e registradas pelo sistema de aquisição de dados.

Baseando-se em experimentos pilotos prévios realizados no Laboratório de Farmacologia Funcional “Prof. George Thomas” (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB - Brasil) nos quais verificou-se atividade contrátil dos segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia apenas na concentração de  $3 \mu\text{g/mL}$  do VB, foi estabelecida tal concentração para os experimentos posteriores. Para verificar a viabilidade dos segmentos, após a adição de VB e anteriormente a pré-incubação, repetiu-se uma contração fásica de CCh  $3 \times 10^{-7}$  M.

A preparação foi lavada com KRH e após intervalo de 15 minutos os antagonistas foram pré-incubados individualmente, como já descrito no item 4.2.4.1.

Passados os 15 minutos de pré-incubação adicionou-se VB 3  $\mu\text{g/mL}$  na presença do antagonista (Figura 17). A inibição da resposta à VB pelos antagonistas foi avaliada por comparação da resposta antes e após a adição dos mesmos a cuba. A média das amplitudes das duas contrações fásicas de CCh foi calculada e considerada como 100% de contração. As respostas contráteis promovidas por VB foram normalizada em porcentagem de contração em relação à máxima de CCh. O efeito máximo ( $E_{\text{máx}}$ ) foi calculado.



**Figura 17. Efeito dos antagonistas frente à atividade induzida pelo veneno bruto (VB) em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia. Protocolo experimental.**

Após os testes com concentrações únicas de VB verificou-se a viabilidade da construção de curvas contrações-resposta cumulativas para VB, na presença e ausência dos antagonistas nas mesmas concentrações utilizadas no item 4.2.1.

#### **4.2.4.3 Efeito de diferentes concentrações de antagonistas frente às curvas contrações-resposta cumulativas induzidas por CCh em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia**

O mesmo protocolo utilizado para concentrações únicas dos antagonistas (item 4.2.4.1) foi realizado novamente, diferindo no número de concentrações diferentes de cada antagonista. As 7 concentrações utilizadas foram expressas em M, porém para facilitar a comparação da atividade do antagonista com a atividade de VB, os valores foram também

convertidos em  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 4). O  $E_{\text{máx}}$  e a  $CE_{50}$  foram calculados para as 7 curvas de cada um dos 3 antagonistas.

**Tabela 4. Drogas utilizadas** – concentrações em M e  $\mu\text{g/mL}$ .

CONCENTRAÇÃO (M)	CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	CCh	Atropina	4-DAMP	Metocramina
$10^{-9}$	0,183	0,289	0,451	0,728
$3 \times 10^{-9}$	0,549	-	-	-
$10^{-8}$	1,83	2,89	4,51	7,28
$3 \times 10^{-8}$	5,49	8,67	13,53	21,86
$10^{-7}$	18,3	28,9	45,1	72,87
$3 \times 10^{-7}$	54,9	86,7	135,3	218,6
$10^{-6}$	183	289	451	728,7
$3 \times 10^{-6}$	549	867	1353	2186
$10^{-5}$	1830	-	-	-
$3 \times 10^{-5}$	5490	-	-	-
$10^{-4}$	18300	-	-	-
$3 \times 10^{-4}$	54900	-	-	-
$10^{-3}$	183000	-	-	-

#### **4.2.4.4 Efeito dos antagonistas frente às curvas contrações-resposta cumulativas de VB e toxina isolada MT-MI1 em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia**

Verificada a atividade muscarínica de VB 3 µg/mL o próximo passo foi verificar a possibilidade de obtenção de curvas contração-resposta cumulativa.

O mesmo protocolo utilizado para concentrações únicas de VB e frações semi-purificadas (item 4.2.4.2) foi realizado novamente, diferindo no número de concentrações da amostra, que antes era única e agora se apresenta em forma de curva concentração-resposta cumulativa.

As concentrações utilizadas para VB foram: 0,01 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,3 µg/mL; 1 µg/mL; 3 µg/mL; 10 µg/mL e 30 µg/mL. E para a toxina isolada MT-MI1 foram: 0,01 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,3 µg/mL.

Foram testadas duas alíquotas de VB, sendo maior, a disponibilidade da alíquota 1 (VB1). Devido a limitação da alíquota 2 (VB2) só foi possível construir uma curva cumulativa de concentração (não foram realizadas pré-incubações com antagonistas, apresentando-se apenas a título de comparação com VB1).

Uma terceira alíquota (VB3) foi utilizada em todos os experimentos seguintes.

#### **4.2.5 Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos como a média e o erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste t não pareado ou a análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do teste de Bonferroni quando apropriados, onde os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA), no qual calculou-se o efeito máximo ( $E_{m\acute{a}x.}$ ) e a concentração do agonista que produz 50% do efeito máximo ( $CE_{50}$ ).

# Resultados



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito dos antagonistas frente às curvas contrações-resposta cumulativas induzidas por CCh em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia

O KCl 80 mM induziu uma contração bifásica típica demonstrando a viabilidade do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia (Figura 18A). O CCh (controle), administrado de maneira cumulativa à cuba, induziu contração do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia de maneira dependente de concentração, sendo o  $E_{máx}$  atingido com  $10^{-6}$  M (Figura 18B). O efeito contrátil do CCh foi inibido na presença de  $10^{-7}$  M de atropina, sendo o  $E_{máx}$  atingido com  $3 \times 10^{-4}$  M (Figura 18C).

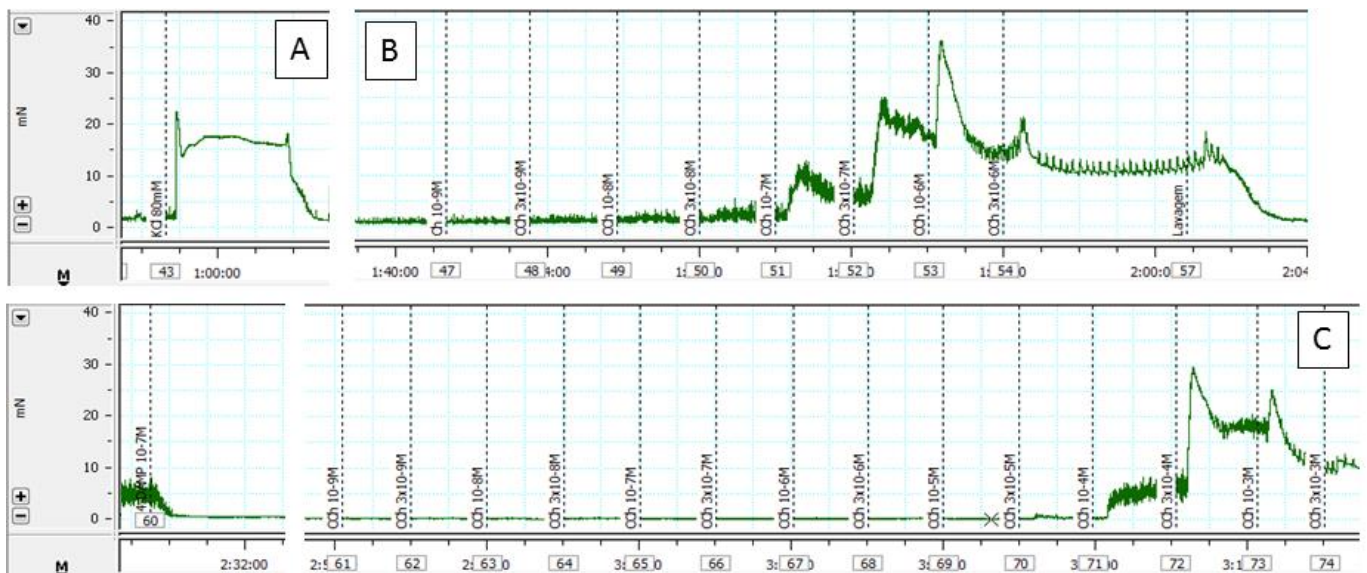
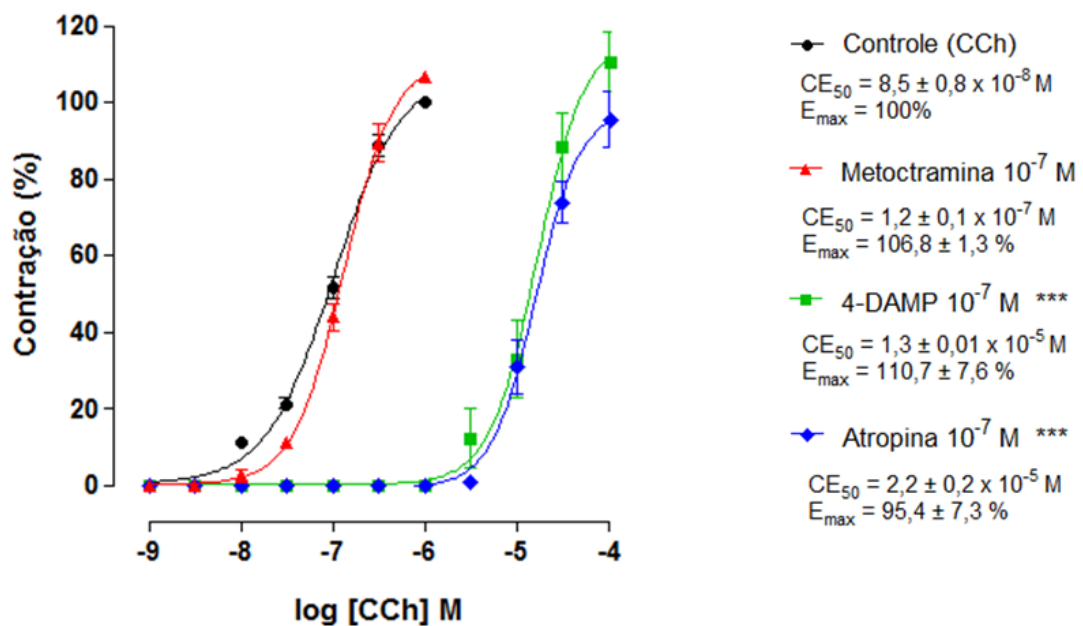


Figura 18. Registro representativo da atividade contrátil do KCl 80 mM (A) e do carbacol (CCh) na ausência (B) e na presença de 4-DAMP  $10^{-7}$  M (C), antagonista seletivo dos receptores muscarínicos  $M_3$  em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, obtido pelo *software* LabChart 7 Pro.

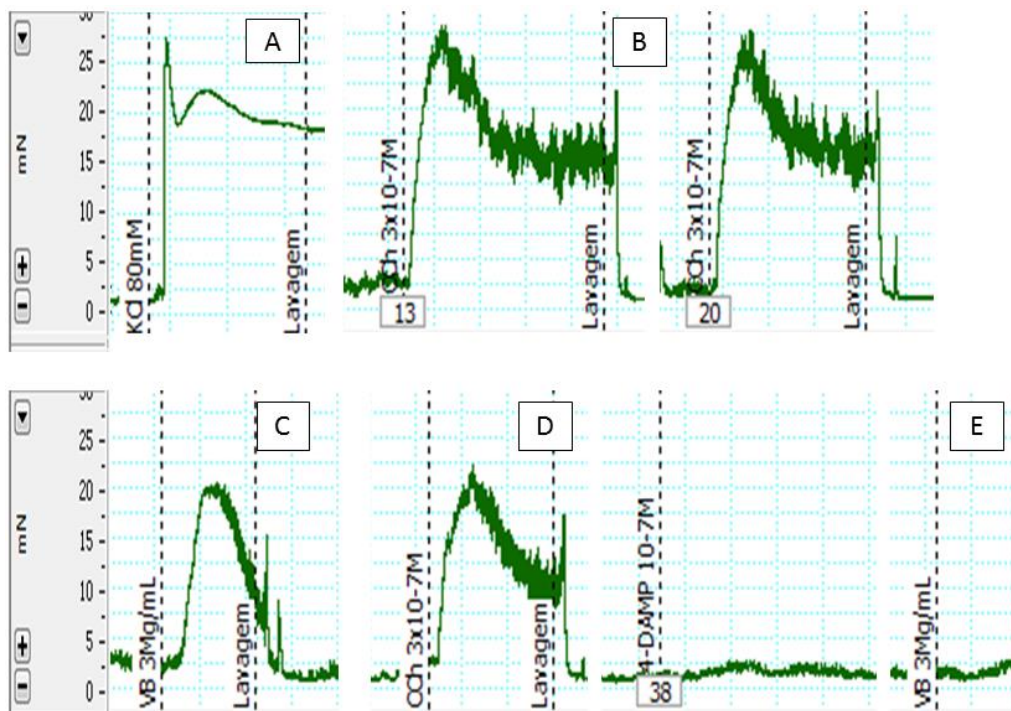
As curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh foram desviadas para direita de maneira paralela atingindo o  $E_{m\acute{a}x}$ , tanto na presença de  $10^{-7}$  M de atropina, antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos, como de  $10^{-7}$  M de 4-DAMP, antagonista seletivo dos receptores muscarínicos  $M_3$  ou de metoctramina  $10^{-6}$  M, antagonista seletivo dos receptores muscarínicos  $M_2$  (Figura 19). O valor de  $CE_{50}$  do CCh foi em média  $8,5 \pm 0,8 \times 10^{-8}$  M ( $n = 5$ ) na ausência dos antagonistas e  $2,2 \pm 0,2 \times 10^{-5}$  M;  $1,3 \pm 0,01 \times 10^{-5}$  M e  $1,2 \pm 0,1 \times 10^{-7}$  M ( $n = 4$ ) na presença de atropina, 4-DAMP e metoctramina, respectivamente. Comparando-se os valores de  $CE_{50}$  do CCh, observou-se que este foi cerca de 2588 vezes maior na presença de atropina e 1500 vezes maior na presença de 4-DAMP (Figuras 19). Já na presença da metoctramina  $10^{-7}$  M a  $CE_{50}$  do CCh aumentou aproximadamente 1,4 vezes.



**Figura 19. Efeitos dos antagonistas nas curvas contrações-resposta cumulativas ao carbacol (CCh).** Curvas cumulativas foram obtidas utilizando preparações de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia na presença de CCh (controle), CCh na presença de atropina  $10^{-7}$  M, CCh na presença de 4-DAMP  $10^{-7}$  M e CCh na presença de metoctramina  $10^{-7}$  M. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. \*\*\* $p < 0.001$  comparado ao controle. ( $n = 5$  para o CCh e  $n = 4$  para os tratamentos com os antagonistas)

## 5.2 Efeito dos antagonistas frente à atividade induzida por VB1 em íleo inteiro e em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia

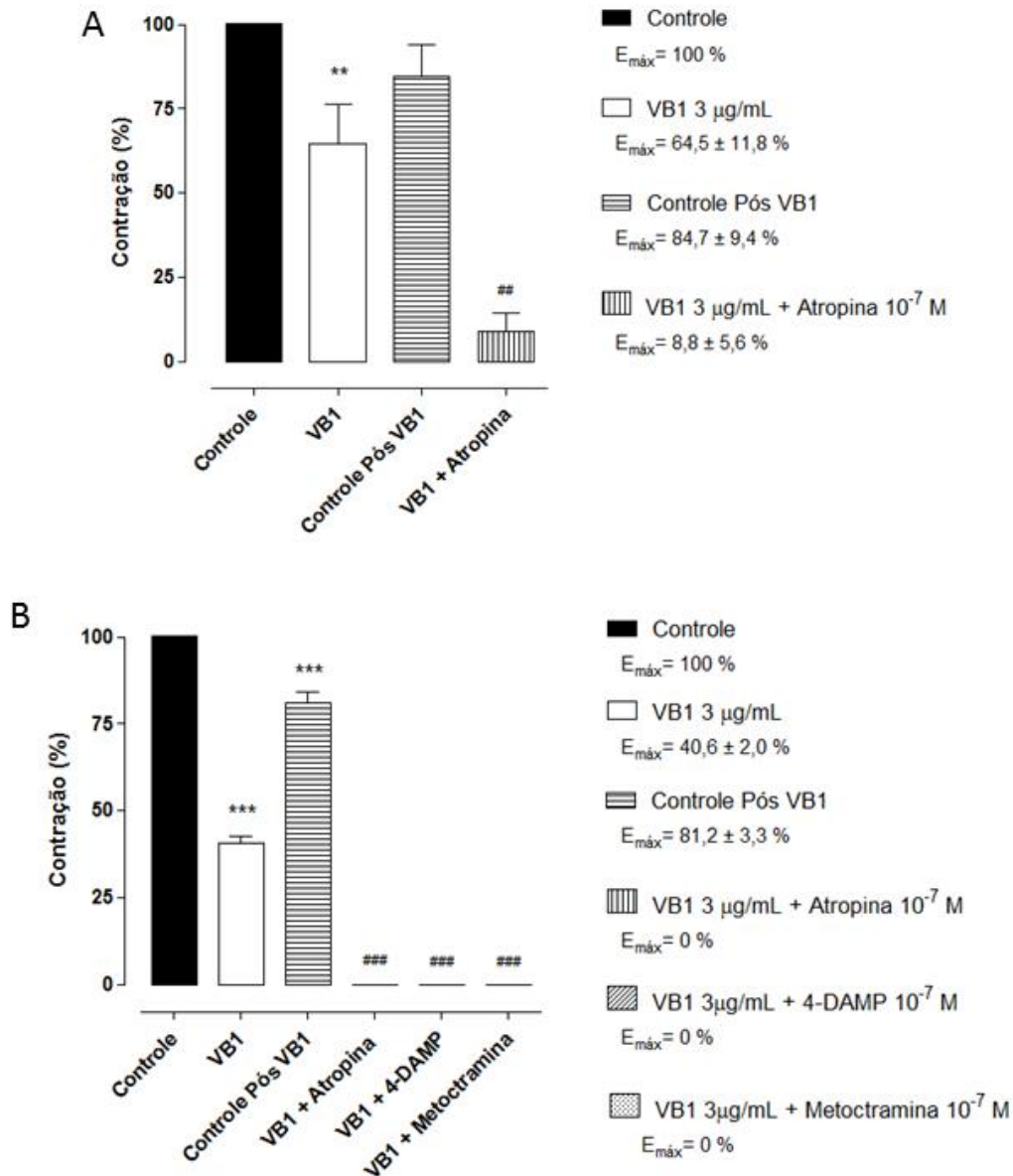
O KCl 80 mM induziu uma contração bifásica típica demonstrando a viabilidade do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia (Figura 20A). A concentração submáxima do CCh (controle),  $3 \times 10^{-7}$  M, induziu contrações fásicas de amplitudes similares do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia (Figura 20B). O VB1, administrado na concentração de 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  promoveu contração, sendo o  $E_{\text{máx}} = 72,56\%$  comparado a média do controle (Figura 20C). A responsividade do íleo ao agonista contrátil utilizado não foi completamente restaurada após retirada do VB1 (Figura 20D). Na presença do antagonista 4-DAMP  $10^{-7}$  M o efeito do VB1 foi bloqueado (Figura 20E).



**Figura 20.** Registro representativo da atividade contrátil do KCl 80 mM (A) do carbacol  $3 \times 10^{-7}$  M (CCh) (B e D) e da alíquota 1 do veneno bruto 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (VB1) na ausência (C) e na presença de 4-DAMP  $10^{-7}$  M (E), antagonista seletivo dos receptores muscarínicos  $M_3$  em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, obtido pelo *software* LabChart 7 Pro.

O VB1 3 $\mu$ g/mL promoveu atividade contrátil em segmentos de íleo intacto apresentando um  $E_{m\acute{a}x}$ : 64,5  $\pm$  11,8% (n = 4). A responsividade do íleo ao agonista contrátil utilizado como controle foi completamente restaurada após retirada do VB1. Na presença do antagonista não seletivo, atropina 10<sup>-7</sup> M a atividade contrátil do VB1 foi reduzida em aproximadamente 86% sendo  $E_{m\acute{a}x}$ : 8,8  $\pm$  5,6% (n = 4) (Figura 21A).

Segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia foram contraídos na presença VB1 3 $\mu$ g/mL apresentando um  $E_{m\acute{a}x}$ : 40,6  $\pm$  2,0% (n = 10). A responsividade do íleo ao agonista contrátil utilizado como controle não foi completamente restaurada após retirada do VB1. Na presença dos antagonistas; atropina, 4-DAMP e metocramina, na concentração de 10<sup>-7</sup> M; VB1 3 $\mu$ g/mL teve sua atividade completamente bloqueada (n = 3) (Figura 21B).



**Figura 21. Efeito dos antagonistas na atividade da alíquota 1 do veneno bruto (VB1) da serpente *Micrurus lemniscatus* em íleo intacto e músculo longitudinal do íleo de cobaia.** Contrações fásicas foram obtidas (A)- utilizando íleo intacto de cobaia na presença de VB1 (n=4) e VB1 + atropina  $10^{-7}$  M (n=4), e (B) utilizando preparações de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia na presença de VB1 (n=10) e VB1 + atropina  $10^{-7}$  M, VB1 + 4-DAMP  $10^{-7}$  M e VB1 + metocramina  $10^{-7}$  M (n=3). O  $E_{m\acute{a}x}$  foi calculado. \*\*p<0,0051; \*\*\*p<0,0001 comparado ao controle. ## p<0,001, ### p<0,0001 comparado ao VB1.

### 5.3 Efeito contrátil das diferentes alíquotas de VB e dos antagonistas frente às curvas contrações-resposta cumulativas de VB1 em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia

O KCl 80 mM induziu uma contração bifásica típica demonstrando a viabilidade do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia (Figura 22A). A concentração submáxima do CCh (controle),  $3 \times 10^{-7}$  M, induziu contrações fásicas de amplitudes similares do músculo liso longitudinal do íleo de (Figura 22B). O VB2 administrado de maneira cumulativa à cuba, induziu contração do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia de maneira dependente de concentração, sendo o  $E_{máx}$  atingido com 1  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 22C). A responsividade do íleo ao agonista contrátil utilizado não foi completamente restaurada após retirada do VB2 (Figura 22D). Na presença do antagonista atropina  $10^{-7}$  M o efeito do VB2 foi bloqueado (Figura 22E).

As curvas concentrações-resposta cumulativas para as 3 diferentes alíquotas de veneno bruto, VB1, VB2 e VB3, promoveram atividade contrátil em segmentos de músculo longitudinal do íleo de cobaia apresentando um  $CE_{50}$  de  $2,3 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ ,  $1,2 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ,  $1,9 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$  e  $E_{máx.}$  de  $18,1 \pm 5,3\%$ ,  $38,8 \pm 6,6\%$  e  $27,8 \pm 3,1\%$  (Figura 23) respectivamente, comparada à contração obtida pelo controle.

Na presença dos antagonistas atropina  $10^{-7}$  M (Figura 24A), 4-DAMP  $10^{-7}$  M (Figura 24B) e metoctramina  $10^{-7}$  M (Figura 24C); a atividade contrátil promovida por VB1 foi completamente bloqueada.

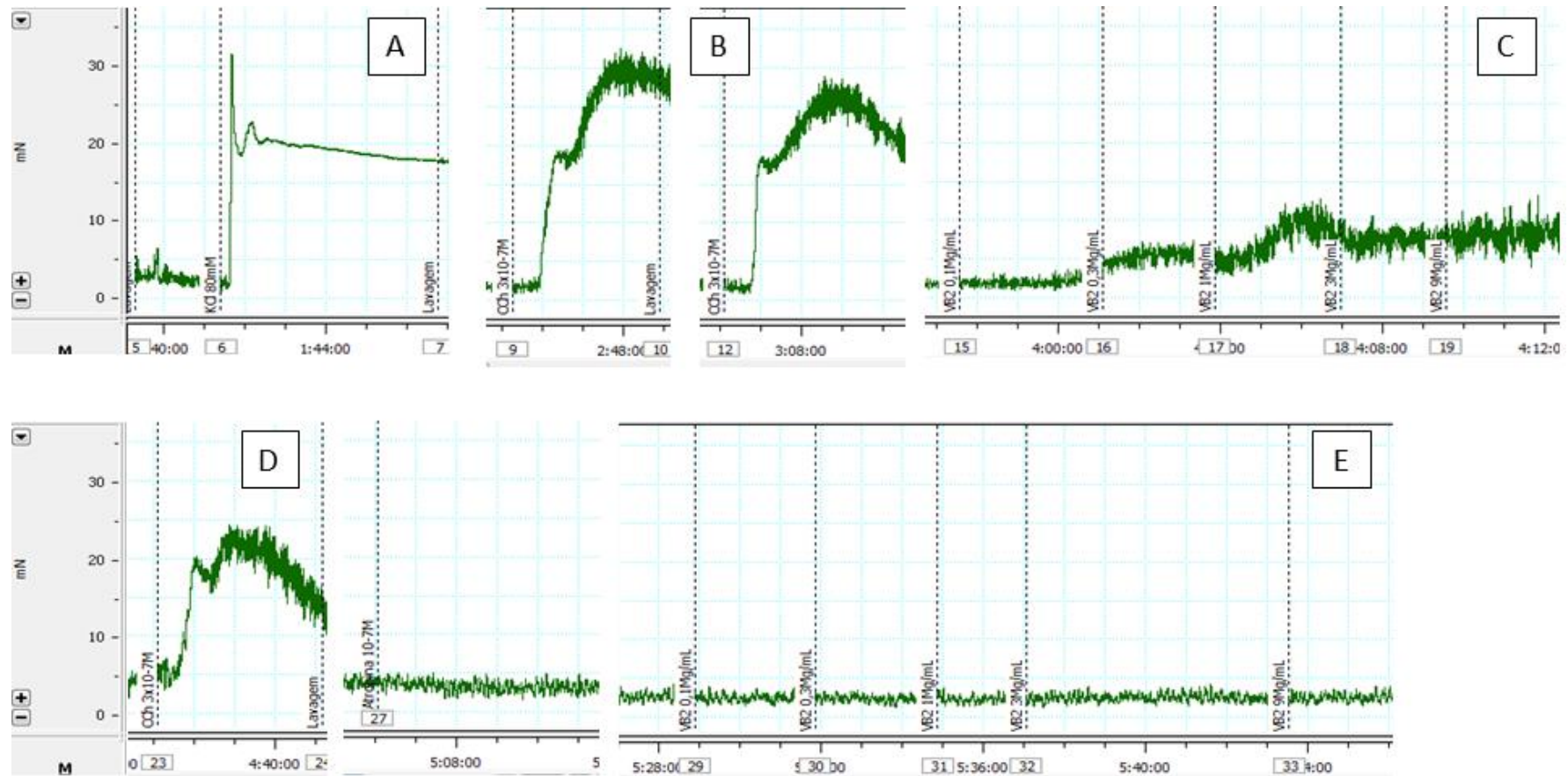
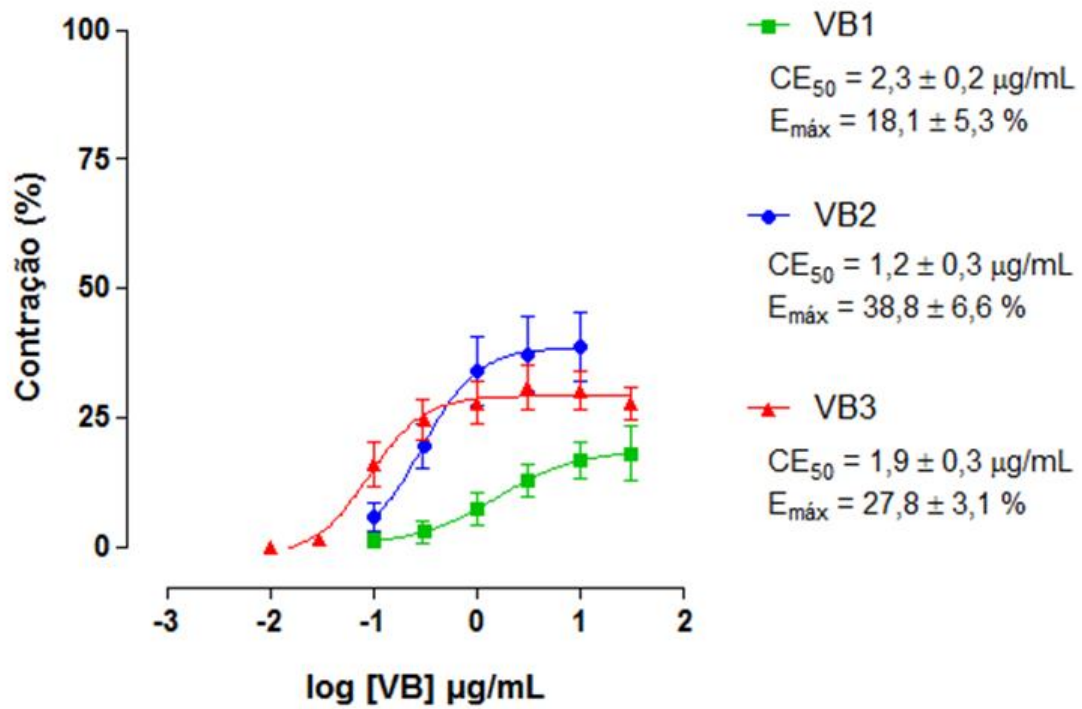


Figura 22. Registro representativo da atividade contrátil do KCl 80 mM (A) do carbacol  $3 \times 10^{-7}$  M (CCh) (B e D) e do veneno bruto (VB2) na ausência (C) e na presença de atropina  $10^{-7}$  M (E), antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, obtido pelo *software* LabChart 7 Pro.



**Figura 23. Comparativo entre curvas contrações-resposta cumulativas de três alíquotas do veneno bruto (VB1, VB2 e VB3) da serpente *Micrurus lemniscatus*. Curvas cumulativas foram obtidas na presença de VB1, VB2 e VB3. (n = 3)**



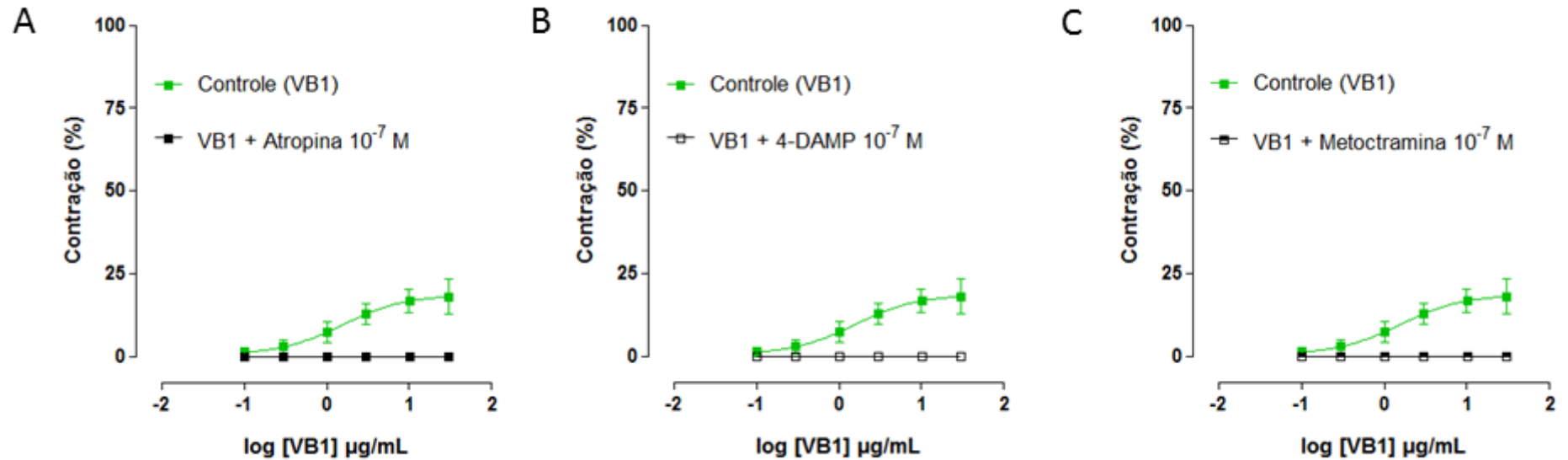
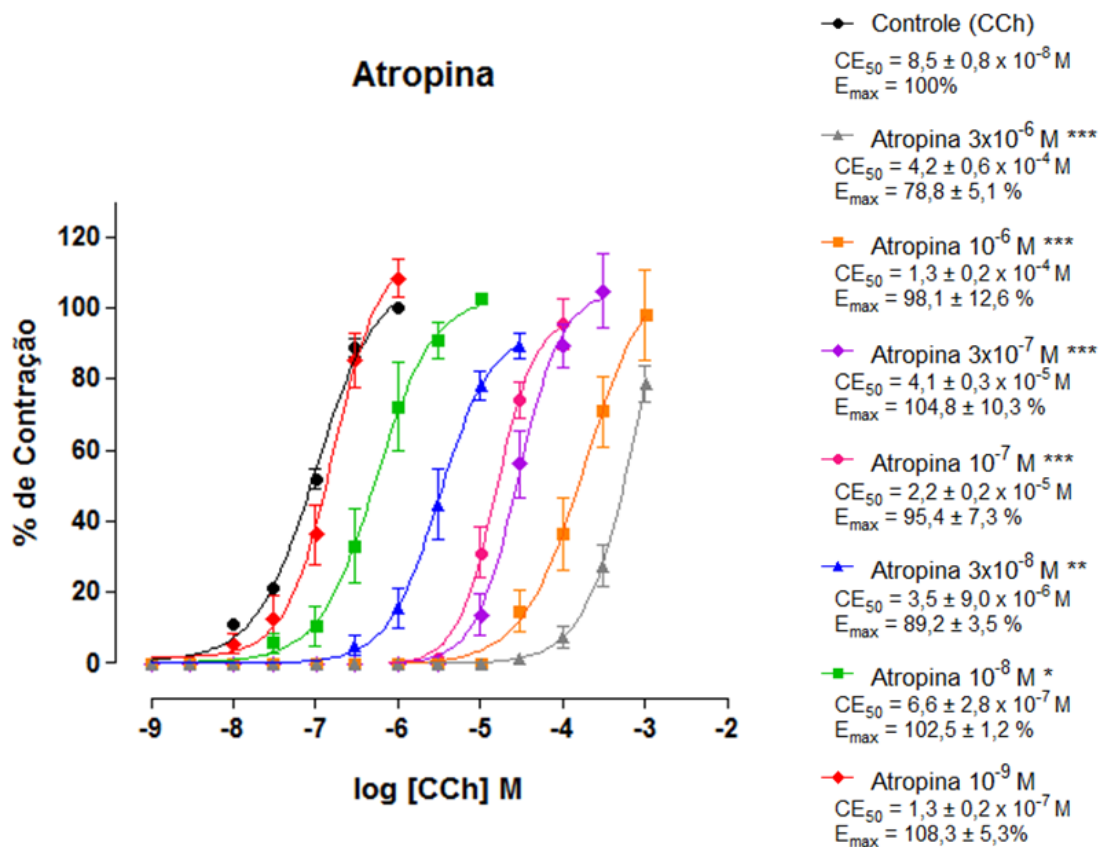


Figura 24. Efeitos dos antagonistas sobre as curvas contrações-resposta cumulativas da alíquota 1 do veneno bruto (VB1) da serpente *Micrurus lemniscatus* em músculo longitudinal do íleo de cobaia. Curvas cumulativas foram obtidas na presença de VB1, e na presença de (A)- VB1 + atropina 10<sup>-7</sup> M, (B)- VB1 + 4-DAMP 10<sup>-7</sup> M e (C)- VB1 + metoclopramina 10<sup>-7</sup> M. (n = 3)

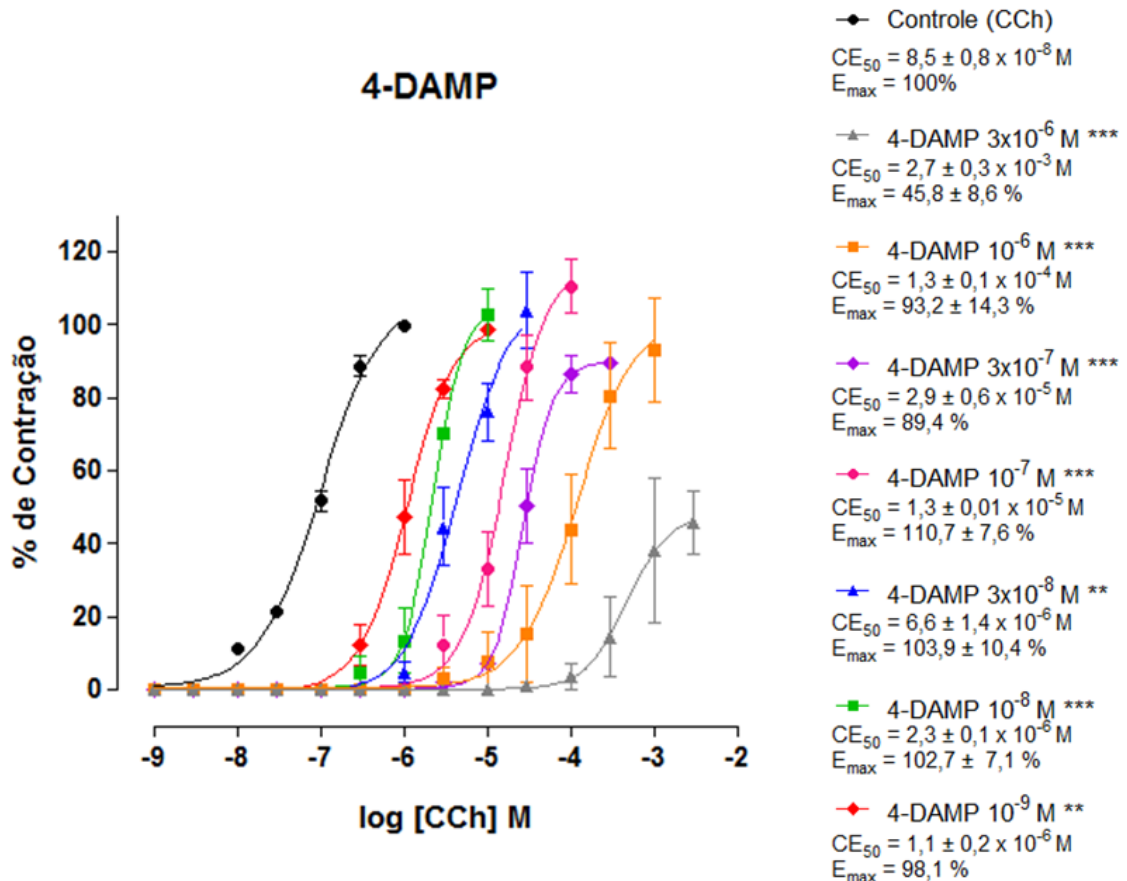
#### 5.4 Efeito das diferentes concentrações de antagonistas frente às curvas contrações-resposta cumulativas ao CCh em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia

A atropina nas concentrações  $3 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $3 \times 10^{-8}$  M e  $10^{-8}$  M inibiu significativamente e de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por CCh. As curvas cumulativas ao CCh foram desviadas para a direita de forma paralela, com moderada alteração do  $E_{\max}$  (Figura 25). Os valores de  $E_{\max}$  e  $CE_{50}$  são apresentados na figura.



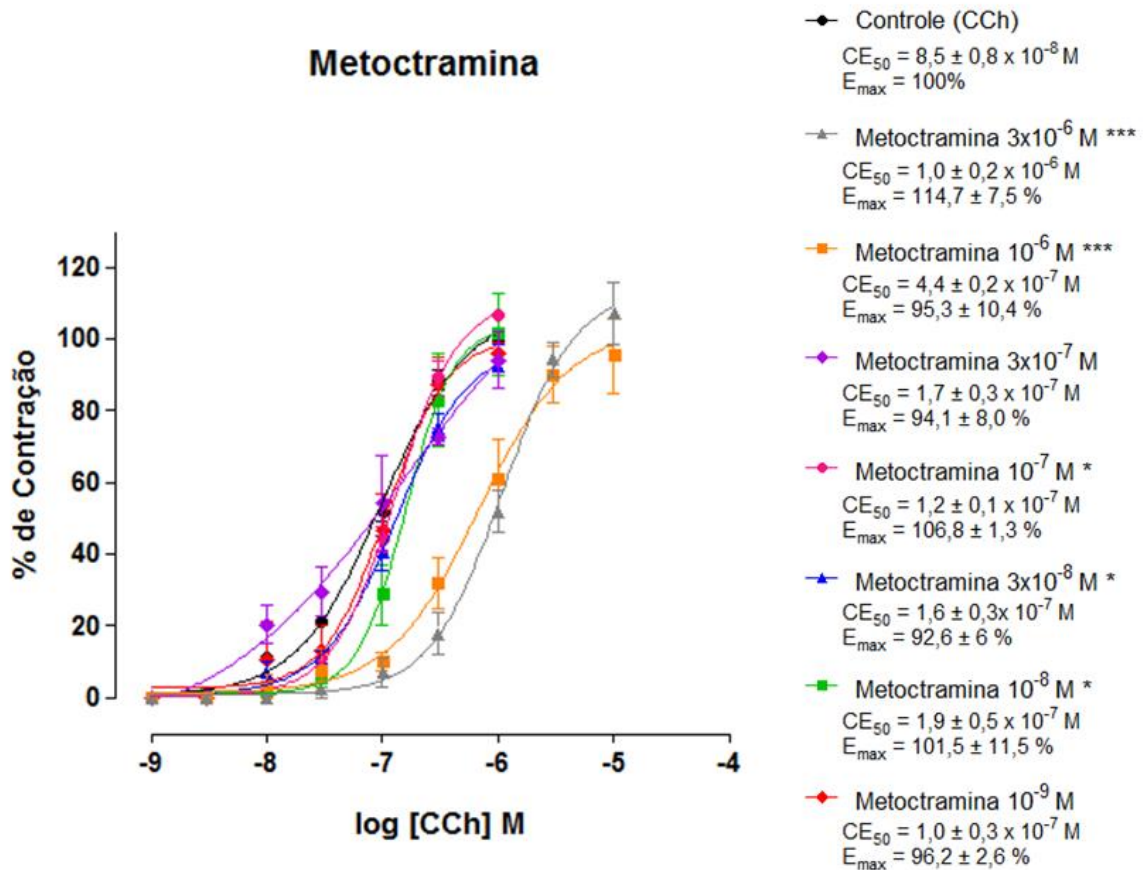
**Figura 25. Efeito das diferentes concentrações de atropina frente às curvas contrações-resposta cumulativas ao carbacol (CCh).** Curvas cumulativas foram obtidas utilizando-se preparações de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia na presença de CCh (controle), CCh + atropina  $10^{-9}$  M, CCh + atropina  $10^{-8}$  M, CCh + atropina  $3 \times 10^{-8}$  M, CCh + atropina  $10^{-7}$  M, CCh + atropina  $3 \times 10^{-7}$  M, CCh + atropina  $10^{-6}$  M e CCh + atropina  $3 \times 10^{-6}$ . Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. (n = 5)

O 4-DAMP nas concentrações de  $3 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $3 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M e  $10^{-9}$  M inibiu significativamente e de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por CCh. As curvas cumulativas ao CCh foram desviadas para a direita de forma paralela, com acentuada alteração do  $E_{\max}$  na maior concentração utilizada (Figura 26). Os valores de  $E_{\max}$  e  $CE_{50}$  são apresentados na figura.



**Figura 26.** Efeito das diferentes concentrações de 4-DAMP frente às curvas contrações-resposta cumulativas ao carbacol (CCh). Curvas cumulativas foram obtidas utilizando-se preparações de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia na presença de CCh (controle), CCh + 4-DAMP  $10^{-9}$  M, CCh + 4-DAMP  $10^{-8}$  M, CCh + 4-DAMP  $3 \times 10^{-8}$  M, CCh + 4-DAMP  $10^{-7}$  M, CCh + 4-DAMP  $3 \times 10^{-7}$  M, CCh + 4-DAMP  $10^{-6}$  M e CCh + 4-DAMP  $3 \times 10^{-6}$ . Os símbolos e as barras verticais representam à média e o e.p.m., respectivamente. (n = 5)

A metoctramina nas concentrações de  $3 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $3 \times 10^{-8}$  M e  $10^{-8}$  M inibiu significativamente e de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por CCh. As curvas cumulativas ao CCh foram desviadas para a direita de forma paralela, com pequena alteração do  $E_{\max}$  em algumas concentrações (Figura 27). Os valores de  $E_{\max}$  e  $CE_{50}$  são apresentados na figura.



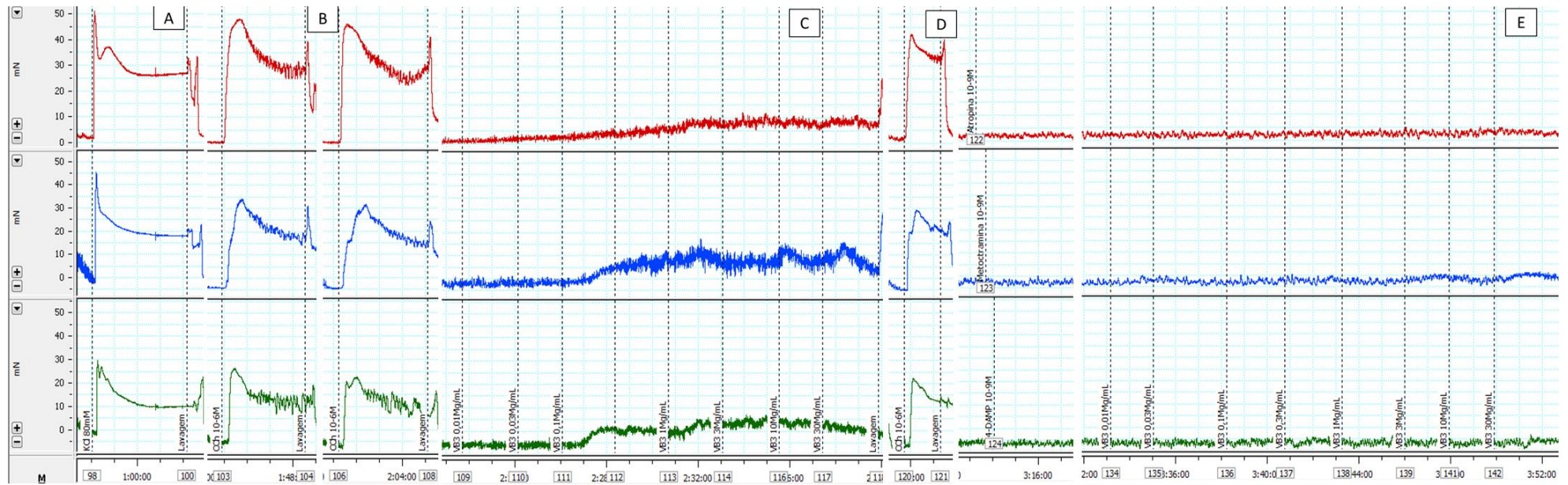
**Figura 27. Efeito das diferentes concentrações de metoctramina frente às curvas contrações-resposta cumulativas ao carbacol (CCh).** Curvas cumulativas foram obtidas utilizando-se preparações de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia na presença de CCh (controle), CCh + metoctramina  $10^{-9}$  M, CCh + metoctramina  $10^{-8}$  M, CCh + metoctramina  $3 \times 10^{-8}$  M, CCh + metoctramina  $10^{-7}$  M, CCh + metoctramina  $3 \times 10^{-7}$  M, CCh + metoctramina  $10^{-6}$  M e CCh + metoctramina  $3 \times 10^{-6}$ . Os símbolos e as barras verticais representam à média e o e.p.m., respectivamente. (n = 5)

### **5.5 Efeito da menor concentração de antagonistas testada frente às curvas contrações-resposta cumulativas de VB3 em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia**

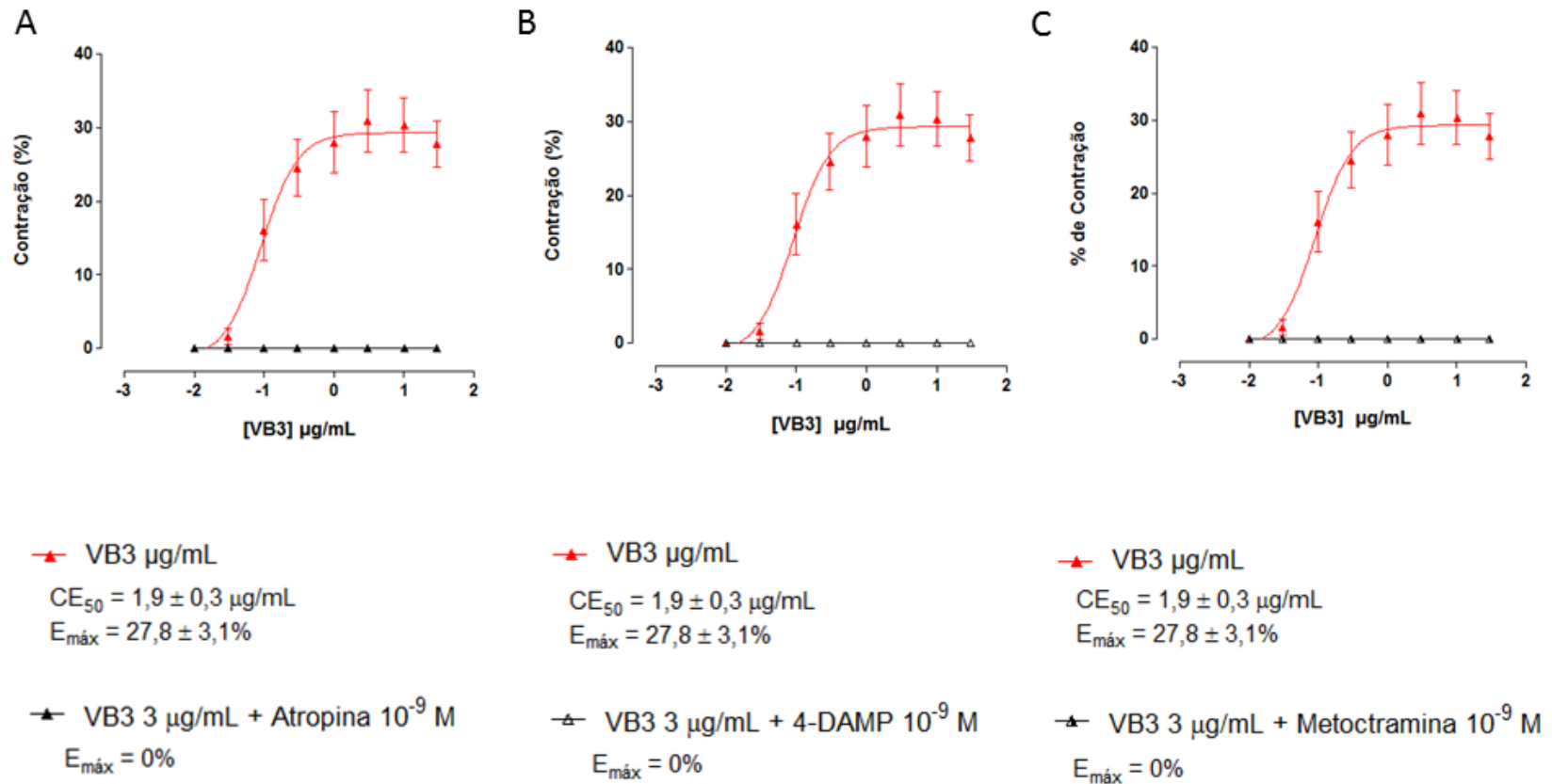
O KCl 80 mM induziu uma contração bifásica típica demonstrando a viabilidade do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia (Figura 28A). A concentração submáxima do CCh (controle),  $3 \times 10^{-7}$  M, induziu contrações fásicas de amplitudes similares do músculo liso longitudinal do íleo de (Figura 28B). O VB3 administrado de maneira cumulativa à cuba, induziu contração do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia de maneira dependente de concentração (Figura 28C). A responsividade do íleo ao agonista contrátil utilizado não foi completamente restaurada após retirada do VB3 (Figura 28D). Na presença dos antagonistas atropina, metocramina e 4-DAMP,  $10^{-9}$  M, o efeito do VB foi bloqueado (Figura 28E).

As curvas concentrações-resposta cumulativas ao VB3 promoveram atividade contrátil em segmentos de músculo longitudinal do íleo de cobaia apresentando  $CE_{50}$  de  $1,9 \pm 0,3$   $\mu\text{g/mL}$  e  $E_{\text{max}}$  de  $27,8 \pm 3,1\%$ , quando comparado a contração obtida pelo controle ( $3 \times 10^{-7}$  M equivalente a  $54,9$   $\mu\text{g/mL}$  de CCh).

A atropina  $10^{-9}$  M ( $0,289$   $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 29A), o 4-DAMP  $10^{-9}$  M ( $0,451$   $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 29B) e a metocramina  $10^{-9}$  M ( $0,728$   $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 29C) bloquearam completamente a atividade de VB3.



**Figura 28.** Registro representativo da atividade contrátil do KCl 80 mM (A) do carbacol  $3 \times 10^{-7}$  M (CCh) (B e D) e do veneno bruto (VB3) na ausência (C) e na presença de atropina, metocloprama e 4-DAMP  $10^{-9}$  M (E) em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, obtido pelo *software* LabChart 7 Pro.

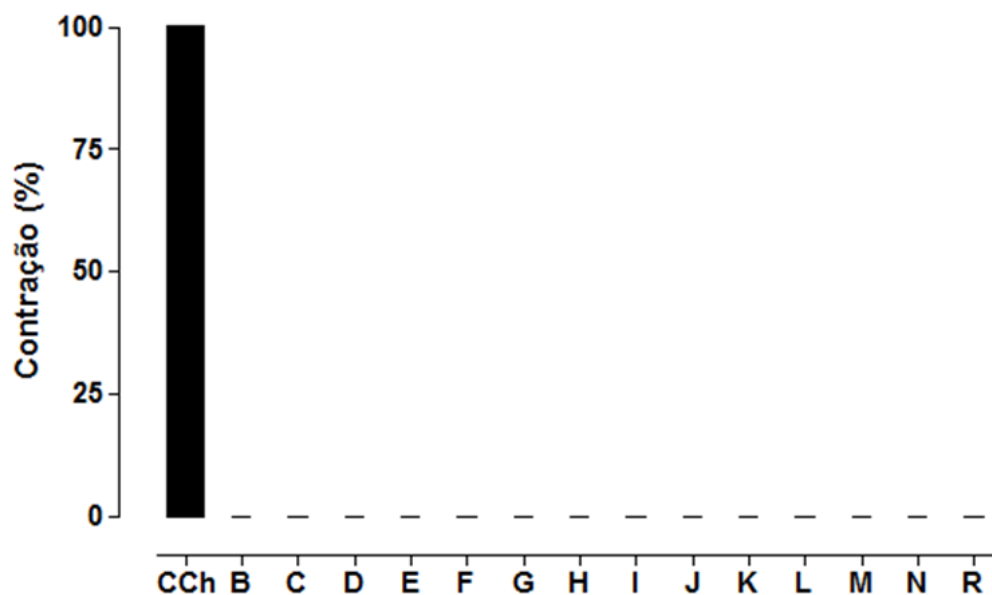


**Figura 29.** Efeito dos antagonistas, em sua menor concentração testada, sobre as curvas contrações-resposta cumulativas da alíquota 3 do veneno bruto (VB3) de *Micrurus lemniscatus*. Curvas cumulativas foram obtidas utilizando-se preparações de músculo liso longitudinal do íleo de cobraia na presença de VB3, (A)-VB3 + atropina  $10^{-9}$  M, (B)-VB3 + 4-DAMP  $10^{-9}$  M e (C)-VB3 + metoctramina  $10^{-9}$  M. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. (n = 5)

### 5.6 Frações semi-purificadas de VB da serpente *Micrurus lemniscatus* selecionadas para teste em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia

Foram selecionadas 18 frações semi-purificadas, com massa entre 7 e 7,6 kDa.

Das 18 frações semi-purificadas testadas, 14 não apresentaram atividade (Figura 30). As concentrações utilizadas foram 0,1; 0,3; 1; 3 e 10  $\mu\text{g/mL}$ , porém algumas não tiveram quantidade suficiente para realização da curva cumulativa completa.

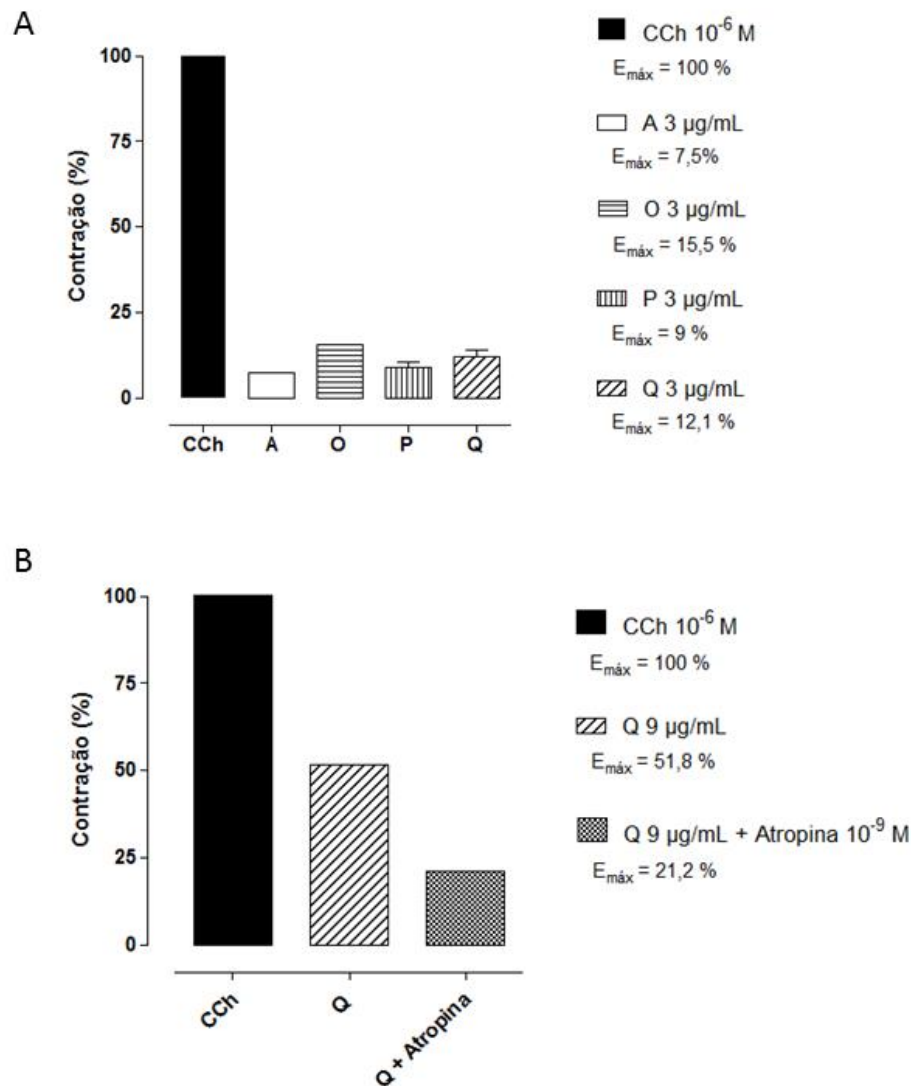


**Figura 30.** Atividade das frações semi-purificadas B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N e R fracionadas a partir do veneno de *Micurus lemniscatus* e testadas sob segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia. (n=1)

Quatro frações semi-purificadas, nas condições experimentais testadas, apresentaram atividade sob a preparação (Figura 31A), sendo a atividade mais expressiva observada na concentração de 3  $\mu\text{g/mL}$  das frações de O ( $E_{\text{máx}} = 15,5\%$ ) e Q ( $E_{\text{máx}} = 12,1\%$ ). Também nessas mesmas concentrações, as frações A e P foram capazes de contrair a preparação em 7,5 e 9% respectivamente.



Devido a pequena disponibilidade de amostra só foi possível avaliar o efeito da atropina  $10^{-9}$  M sob a atividade da fração semi-purificada Q  $9 \mu\text{g/mL}$ . A fração semi-purificada Q apresentou  $E_{\text{máx}}$  de 51,8% e na presença do antagonista atropina seu  $E_{\text{máx}}$  foi 21,2%, ou seja, uma inibição de 59,1% da contração (Figura 31B).



**Figura 31. Atividade das frações semi-purificadas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia. (A)- Comparação da atividade promovida pela maior concentração comum testada ( $3 \mu\text{g/mL}$ ) das frações semi-purificadas. (B)- Efeito da atropina  $10^{-9}$  M sobre a atividade da fração semi-purificada Q  $9 \mu\text{g/mL}$ . (n=1)**

Foram construídas curvas contração-resposta cumulativa para a fração Q (anteriormente denominada como T6). O KCl 80 mM induziu uma contração bifásica típica demonstrando a viabilidade do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia (Figura 32A). A concentração submáxima do CCh (controle),  $3 \times 10^{-7}$  M, induziu contrações fásicas de amplitudes similares do músculo liso longitudinal do íleo de (Figura 32B). A fração semi-purificada Q administrada de maneira cumulativa à cuba, induziu contração do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia de maneira dependente de concentração (Figura 32C). A responsividade do íleo ao agonista contrátil utilizado não foi completamente restaurada após retirada da fração semi-purificada Q (Figura 32D). Na presença do antagonista atropina  $10^{-9}$  M o efeito da fração semi-purificada Q foi parcialmente inibido (Figura 32E).

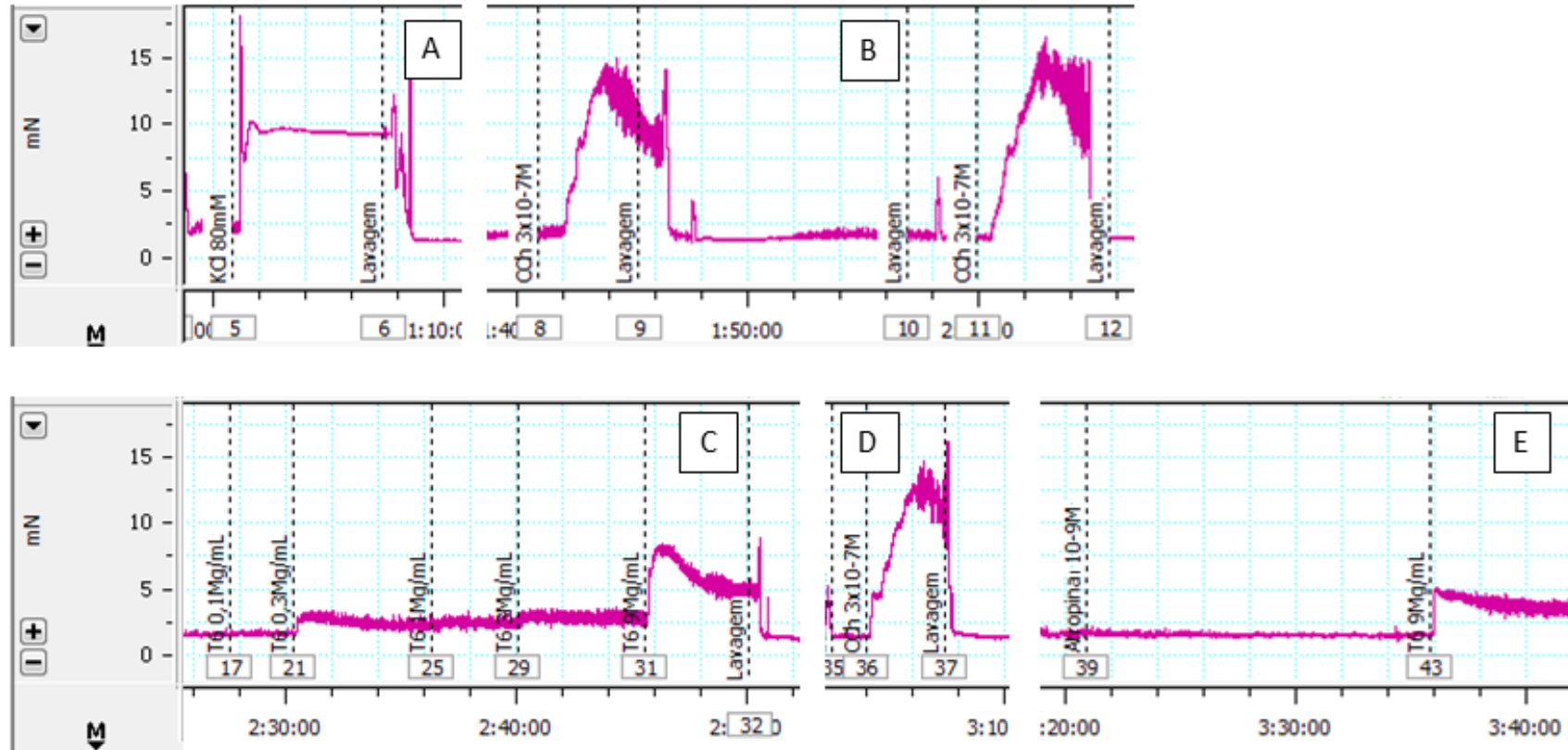


Figura 32. Registro representativo da atividade contrátil do KCl 80 mM (A) do carbacol 3x10<sup>-7</sup> M (CCh) (B e D) e da fração semi-purificada Q (anteriormente denominada como T6) e Q na presença do antagonista atropina 10<sup>-9</sup> M em músculo liso longitudinal do íleo de cobra, obtido pelo *software* LabChart 7 Pro.

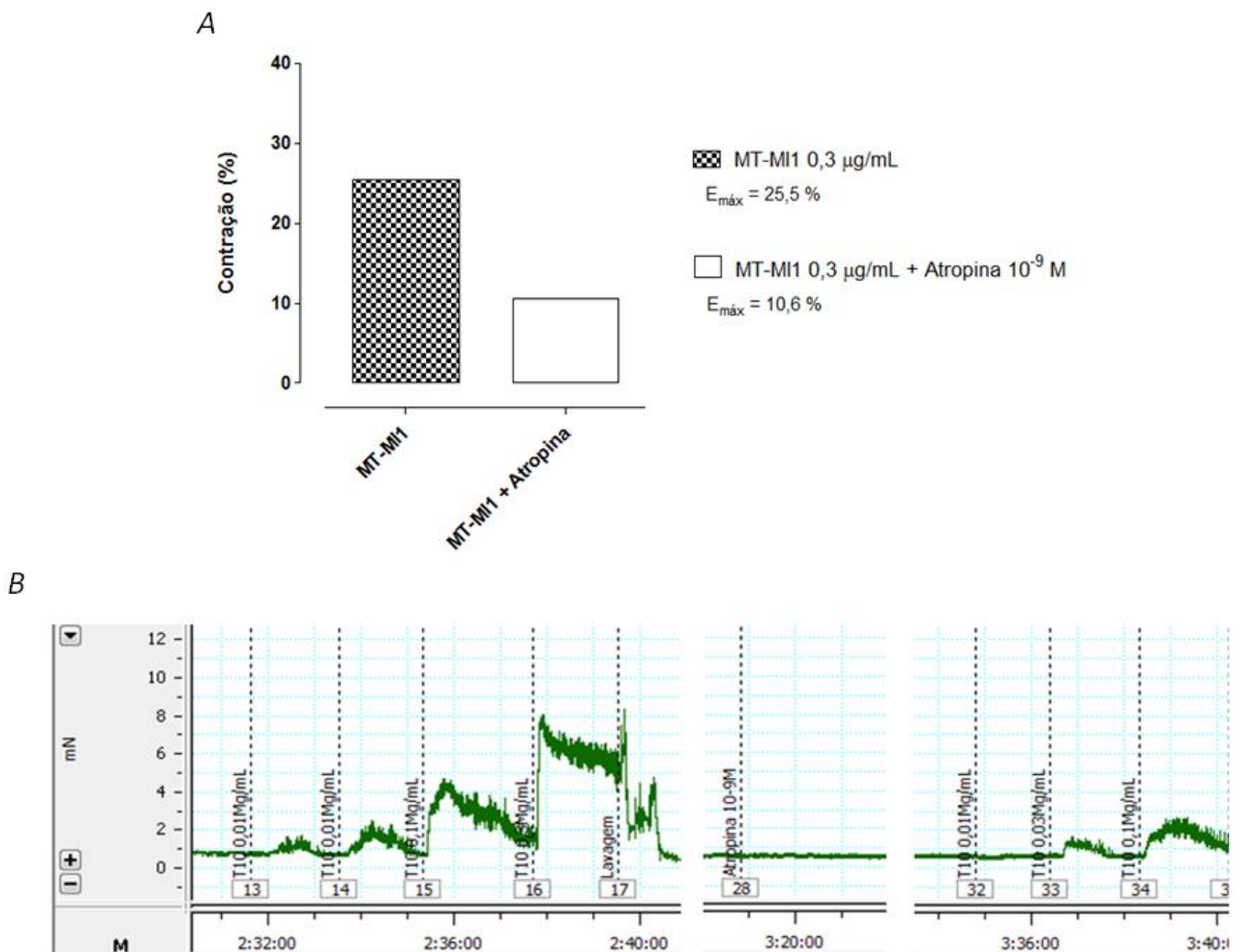
A quantidade de material foi um fator limitante para repetição dos experimentos, de forma que a estratégia experimental desenvolvida foi a identificação e a busca das toxinas que compõem as frações semi-purificadas que apresentaram atividade, com base em suas massas/cargas, em outras frações.

Realizada essa comparação, observaram-se massas/cargas muito próximas (variação de 1 Da) nas frações semi-purificadas O e Q (Anexo B). Essa quase identidade das massas/cargas permite-se concluir que são as mesmas moléculas.

### **5.7 Efeito da toxina MT-MI1 isolada do VB da serpente *Micrurus lemniscatus* em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia**

Baseando-se nas análises descritas no item 5.6 foi realizada a busca por toxinas com massa/carga próxima 7,232 kDa. Identificou-se um peptídeo resultante de um fracionamento bidimensional com massa/carga 7,2328 kDa, o qual foi nomeado como MT-MI1 (Anexo B).

MT-MI1 teve sua atividade avaliada em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia através da construção de curvas concentrações-resposta cumulativa com as seguintes concentrações: 0,01; 0,03; 0,1 e 0,3 µg/mL (dados não mostrados). A maior concentração testada (0,3 µg/mL) promoveu contração de 25,5% e foi parcialmente bloqueada na presença de atropina  $10^{-9}$  M (Figura 33).

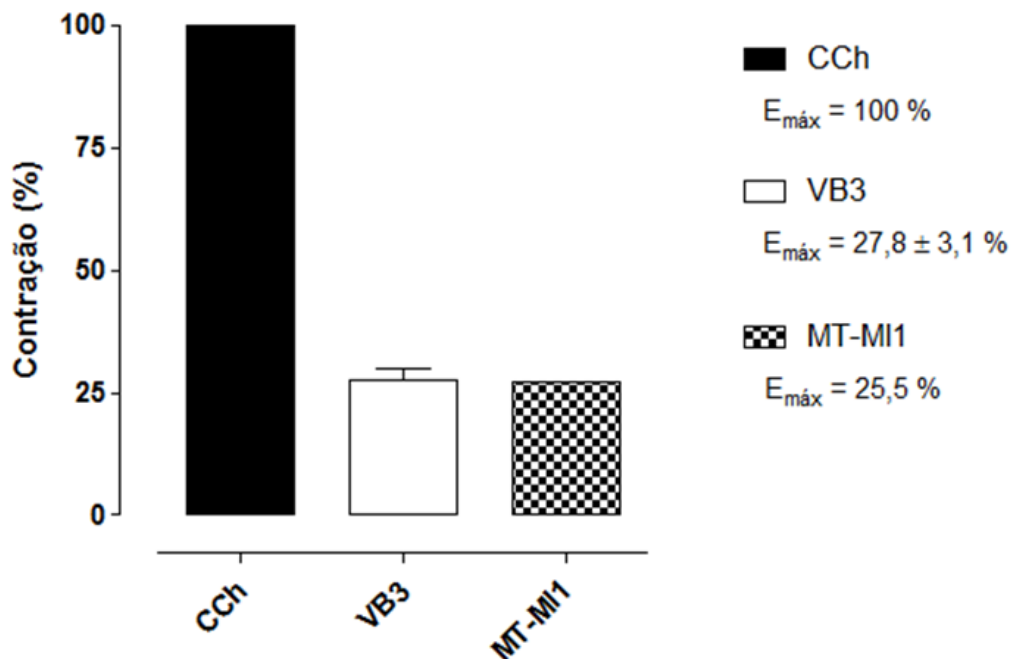


**Figura 33. Atividade da toxina MT-MI1 sobre receptores muscarínicos em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia. (A)- MT-MI1 (0,3 µg/mL) foi testada na ausência e na presença de atropina  $10^{-9}$  M. (B)- Registro miográfico da atividade da toxina e da toxina na presença do antagonista, correspondente ao gráfico de barras, da toxina. (n=1)**

### 5.8 Comparação da atividade do agonista CCh, de VB3 e da toxina MT-MI1

O efeito máximo do CCh (100%) foi obtido na concentração de  $10^{-6}$  M (183  $\mu\text{g/mL}$ ) enquanto que para VB3 o  $E_{\text{máx}}$  ( $27,8 \pm 3,1\%$ ) foi obtido na maior concentração testada, 30  $\mu\text{g/mL}$ . Para a toxina MT-MI1, também na maior concentração testada (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ), o  $E_{\text{máx}}$  foi de 25,5% (Figura 34).

O  $E_{\text{máx}}$  verificado para MT-MI1 foi muito próximo ao de VB3, porém, o veneno bruto estava em uma concentração 100 vezes maior. Fazendo a mesma comparação entre a toxina e o CCh, a concentração de CCh utilizada foi 610 vezes maior enquanto observa-se um  $E_{\text{máx}}$  aproximadamente 4 vezes superior àquele observado por MT-MI1.



**Figura 34.** Comparação entre os efeito máximos promovidos pelo agonista CCh, o VB3 e a toxina MT-MI1. Curvas cumulativas foram obtidas utilizando preparações de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia. O  $E_{\text{máx}}$  promovido por  $10^{-6}$  M (183  $\mu\text{g/mL}$ ) de CCh (n=5), 30  $\mu\text{g/mL}$  de VB3 (n=5) e 0,3  $\mu\text{g/mL}$  da toxina Mt-MI1 (n=1) foi exposto no gráfico de barras.

# Discussão

## 6 DISCUSSÃO

Devido a sua complexidade e riqueza em moléculas bioativas, os venenos têm um grande potencial como fonte de agentes terapêuticos, propriedade a ser explorada ao máximo (JIMÉNEZ & MUÑOZ, 2009). Usando, copiando ou modificando as moléculas sintetizadas pelos seres vivos, tem-se obtido inovações em benefício da saúde em diversas áreas, dentre elas, a produção de fármacos (COSTA-LOTUFO et al., 2009). A utilização de toxinas e venenos ofídicos como agonistas e/ou antagonistas muscarínicos vem sendo largamente investigada em função das limitações de seletividade das drogas existentes. No presente trabalho, demonstramos pela primeira vez, que o veneno bruto, algumas frações semi-purificadas e a toxina MT-M11 da serpente *Micrurus lemniscatus*, apresentam atividade muscarínica em segmentos do músculo liso longitudinal do íleo de cobaia.

O veneno bruto de *Micrurus lemniscatus* é majoritariamente composto por toxinas do tipo 3TFs e PLA<sub>2</sub>, respectivamente 79% e 10,6%, (dados não publicados) enquanto *Micrurus nigrocinctus*, outra espécie do gênero, apresenta 48% de PLA<sub>2</sub> e 38% de 3TFs (FERNÁNDEZ et al. 2011). As 3TFs são compostas por 7 classes de proteínas, dentre elas, as neurotoxinas que interferem na neurotransmissão colinérgica, conhecidas como toxinas muscarínicas (CLARKE et al., 1985; HARVEY, 2001; HARVEY et al. 2002). A pouca caracterização proteômica e da atividade do veneno bruto e suas toxinas, combinada a prevalência da superfamília proteica das 3TFs na espécie *Micrurus lemniscatus* torna esse grupo, um rico objeto de estudo.

Na busca por um modelo bem estabelecido para testes *in vitro* e com ampla distribuição de receptores muscarínicos (DANIEL et al, 2001) optou-se por preparações de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia avaliadas em banho de órgão.

A metodologia de avaliação de atividade contrátil do músculo liso longitudinal de íleo de cobaia foi padronizada no Muscle Strip Myograph System, modelo 820Ms, bem como o sistema de aquisição digital de dados Power lab 8/30 Modelo ML 870 (AD Instruments), no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Para tanto avaliou-se o efeito do CCh na ausência e na



presença de atropina, antagonista muscarínico não seletivo, 4-DAMP, antagonista muscarínico seletivo  $M_3$  e metocramina, antagonista seletivo  $M_2$ .

Definidas as concentrações-resposta cumulativa mínima e máxima para o CCh foram realizados testes com VB em concentração única, baseando-se em experimentos pilotos prévios realizados no Laboratório de Farmacologia Funcional “Prof. George Thomas” (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB-Brasil). O VB ( $3\mu\text{g/mL}$ ) promoveu 79% de contração no íleo intacto e 30-40% de contração nos segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, quando comparado à contração obtida pelo controle. A diferença entre as percentagens de contração do íleo intacto e o músculo longitudinal pode ser explicada pelas proporções de cada segmento e variações na distribuição de receptores. Mesmo com segmentos de comprimentos idênticos o íleo intacto apresenta diâmetro (e conseqüentemente espessura) maior que o músculo liso longitudinal, além de um maior número de fibras contráteis (músculo longitudinal + circular) resultando em um registro isométrico, de força, mais intenso. Além disso, é sabido que a preparação muscular longitudinal diferi da preparação de músculo circular em sua resposta qualitativa a drogas (BROWNLEE e HARRY, 1963).

A atividade promovida pelo VB foi completamente antagonizada, em todas as preparações, pelas drogas utilizadas (atropina, 4-DAMP e metocramina  $10^{-7}\text{M}$ ). O bloqueio completo pelos três antagonistas foi inesperado. Por apresentarem seletividades diferentes esperava-se que a atropina, antagonista não seletivo, bloqueasse toda a atividade de VB; 4-DAMP, antagonista seletivo para mRACH  $M_3$ , pudesse promover um bloqueio parcial, assim como metocramina bloqueador de mRACH  $M_2$ . Uma atividade residual na presença de qualquer um destes bloqueadores específicos poderia resultar do não bloqueio do outro mRACH. Porém isso não aconteceu. Dessa forma questionou-se o possível excesso das concentrações de antagonistas utilizadas.

Para verificar a possibilidade de obtenção de curvas contração-resposta cumulativa, 2 alíquotas de veneno bruto (VB1 e VB2) foram testadas. A atividade promovida por VB2 em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia foi mais que o dobro que a atividade de VB1. Não foi possível avaliar o porquê desta diferença, mas considerando que estas amostras tem origem do mesmo *pool*, é provável que uma delas tenha sofrido proteólise, a qual pode ter causado uma sensível diminuição de sua atividade biológica. Além do mais,

segundo MEIER, 1986; GUTIÉRREZ *et al.*, 1990; CHIPPAUX *et al.*, 1991; MONTEIRO *et al.*, 1998; ANDRADE & ABE, 1999; SARAVIA *et al.*, 2002; SALDARRIAGA *et al.*, 2003; PIMENTA *et al.*, 2007, a composição, propriedades bioquímica e farmacológica dos venenos podem variar entre as espécies ou entre indivíduos de uma mesma espécie, devido a fatores como, dieta, sazonalidade, habitat, idade e dimorfismo sexual. Também é importante ressaltar que *Micrurus lemniscatus* é um complexo de 4 subespécies: *M. l. lemniscatus*, *M. l. carvalhoi*, *M. l. diutius*, *M. l. helleri* (MELGAREJO, 2003).

Para evitar qualquer variação nos resultados decorrente da discrepância de atividade observada nos ensaios acima, em todos os experimentos subsequentes utilizou-se a mesma alíquota de veneno bruto (VB3).

Também foram avaliados os efeitos dos antagonistas frente às curvas concentrações-resposta cumulativa promovidas por VB1. Assim como nos testes realizados com concentrações únicas de veneno (3 µg/mL) as curvas contrações-resposta foram completamente antagonizadas pelas drogas utilizadas (atropina, 4-DAMP e metocramina 10<sup>-7</sup> M).

Para confirmar ou não a hipótese de que as concentrações de antagonistas utilizadas estavam superestimadas, não permitindo o desvio paralelo das curvas de VB para a direita – padrão clássico de antagonismo competitivo, como demonstrado utilizando o CCh – por inviabilidade do uso de concentrações muito altas de VB, a estratégia foi reduzir a concentração dos antagonistas utilizados. Para definir as concentrações de antagonistas a serem utilizados nos experimentos, construíram-se curvas controle para diferentes concentrações dos três antagonistas, atropina, 4-DAMP e metocramina. Os valores E<sub>máx</sub> e CE<sub>50</sub> foram calculados para cada uma das 7 concentrações dos 3 antagonistas.

Por último, avaliou-se o efeito da menor concentração de antagonistas já testadas em nossos experimentos (não levando em consideração a significância) em curvas concentração-resposta ao CCh. Os antagonistas atropina, 4-DAMP e metocramina (10<sup>-9</sup> M), também antagonizaram toda a atividade de VB3. O fato dos 3 antagonistas terem inibido 100% a contração promovida pelo VB3 em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, mesmo em baixas concentrações, ainda não é possível de ser explicado com os experimentos realizados. Cogitou-se a hipótese de que VB3 pudesse promover a liberação de ACh, e a contração

observada na presença do veneno fosse resultado da atividade desse neurotransmissor e não diretamente do veneno ativando o receptor. Porém Vital-Brazil, 1987, descreveu que o veneno de *Micrurus lemniscatus* demonstrava apenas atividade pós-sináptica.

Das 18 frações semi-purificadas, com massa entre 7 e 7,6 kDa e contendo de 1 a 10 toxinas, 4 apresentaram atividade em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobraia. Dentre as frações semi-purificadas com atividade, duas – com resultados mais expressivos – apresentaram uma toxina muito semelhante, diferindo em apenas 1 Da. Este resultado foi interpretado, como sendo a mesma molécula.

Realizando-se buscas baseando-se na massa/carga da toxina - 7,232 kDa - foi identificado um peptídeo resultante de um fracionamento bidimensional com massa 7,2328 kDa, o qual foi nomeado como MT-MI1 (muscarinic toxin 1 of *Micrurus lemniscatus* - baseado no nome da única toxina muscarínica, da espécie, já descrita; segundo SILVA, 2011). Como esperado, MT-MI1 teve efeito contrátil, assim como as frações semi-purificadas O e Q. Na maior concentração testada (0,3 µg/mL, o que corresponde a  $4,15 \times 10^{-8}$  M) a toxina promoveu contração de 25,5% e foi parcialmente bloqueada quando pré-incubada com atropina  $10^{-9}$  M. Devido à limitação de material não foi possível avaliar a seletividade desta toxina muscarínica sob os subtipos de mACh presente no músculo liso longitudinal M<sub>2</sub> e M<sub>3</sub>.

O E<sub>máx</sub> resultante da ação de MT-MI1 foi muito próximo àquele proporcionado pelo VB3, porém a concentração de veneno utilizado para atingir o E<sub>máx</sub> foi 100 vezes maior que a da MT-MI1, o que mostra uma maior atividade da toxina nesta preparação, quando comparada ao VB3. Fazendo a mesma comparação, entre a toxina e o CCh, a concentração de CCh necessária para atingir o E<sub>máx</sub> foi 610 vezes maior. Isso ressalta o potencial de atividade da MT-MI1 sobre esta preparação.

Esta foi a segunda toxina muscarínica da serpente *Micrurus lemniscatus* identificada e que teve atividade comprovada. Estudos realizados por SILVA e colaboradores (2011), mostraram pela primeira vez que uma toxina, MT-MI $\alpha$ , purificada do veneno desta mesma serpente, atua como antagonista seletivo M<sub>1</sub> para mACh, em hipocampo de rato (a CI<sub>50</sub> para MT-MI $\alpha$  foi  $3,31 \times 10^{-8}$  M).

Outras toxinas elapídicas, principalmente das serpentes australianas, são completamente caracterizadas como a MT-1 e MT-2, ambas isoladas da serpente *Dendroaspis angusticeps*. Adem e colaboradores (1988) e Jerusalinsky e colaboradores (1995) mostraram que essas toxinas tem alta afinidade por receptores muscarínicos.

Em 1995 a MT-1 foi caracterizada por Jolkkonen o qual verificou sua atividade contrátil, quando testada em íleo de cobaia. Em outros experimentos MT-1 e MT-2, em concentrações maiores que  $1 \times 10^{-6}$  M tiveram efeito sobre o íleo intacto de cobaia. MT-2 ( $1,0 \times 10^{-8}$  M a  $1,2 \times 10^{-6}$  M) foi um agonista parcial em músculo longitudinal do íleo de cobaia (BRADLEY, 2000). Harvey e colaboradores (2002) descreveram que MT-2 nas concentrações de  $2,5 \times 10^{-8}$  M a  $1,2 \times 10^{-6}$  M, promove contração de 25% em relação a máxima atingida pelo agonista metacolina. A  $CE_{50}$  foi  $3,0 \pm 6,0 \times 10^{-8}$  M. A exposição à toxina MT-2 não afeta a sensibilidade da preparação a metacolina, ou seja sua atividade é reversível. A contração promovida por MT-2 foi antagonizada por  $1,0 \times 10^{-8}$  M de 4-DAMP. Não foi possível confirmar se o antagonismo era competitivo ou não, devido a necessidade de altas quantidades, não disponíveis, de MT-2.

Com os dados aqui apresentados demonstra-se que os objetivos propostos foram alcançados, uma vez que foram evidenciadas significativas atividades muscarínicas do veneno bruto e especialmente de uma nova toxina purificada. Além do mais, foi padronizada uma importante metodologia em nosso Laboratório, a preparação de músculo longitudinal de íleo de cobaia. Esta preparação permite uma ampla gama de experimentos e é uma metodologia simples e econômica.

Em função da atividade muscarínica demonstrada por MT-M11, o veneno de *Micrurus lemniscatus* pode representar uma opção para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade sob o sistema colinérgico. Entretanto, estudos adicionais sobre suas propriedades farmacológicas, mecanismo de ação e toxicidade ainda precisam ser realizados.

# Conclusões

## 7 CONCLUSÕES

No estudo de investigação da atividade muscarínica do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* em íleo de cobaia pode-se concluir que:

- O veneno bruto (VB3) apresentou efeito contrátil em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia apresentando atividade muscarínica;
- Dentre as frações semi-purificadas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus*, as frações A, O, P e Q, nas concentrações testadas, contém as toxinas responsáveis pelo efeito contrátil em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia;
- A toxina isolada MT-M11 apresentou atividade muscarínica cem vezes mais potente que VB3 e foi parcialmente antagonizada pela atropina em segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, assim sugere-se que ela seja um dos principais princípios ativos, presentes no veneno, responsável pelo seu efeito contrátil muscarínico.

# Perspectivas

## 8 PERSPECTIVAS

Considerando-se o pioneirismo deste trabalho ao estudar a atividade muscarínica da toxina isolada do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus*, MT-M11, em músculo liso longitudinal do íleo de cobaia, admite-se que ainda há muito a ser investigado a respeito dessa molécula. A realização de outros estudos faz-se necessária para o esclarecimento do modo de ação da toxina nos diferentes subtipos de receptores muscarínicos. Portanto as principais perspectivas deste trabalho são:

- Concluir os estudos in vitro da atividade da toxina MT-M11 na presença dos antagonistas específicos para os diferentes subtipos de receptores muscarínicos e definir qual receptor está envolvido;
- Sequenciar a toxina MT-M11;
- Buscar por similaridade em bancos de dados proteômicos sequências de toxinas muscarínicas de outras serpentes.



# Referências Bibliográficas

## REFERÊNCIAS

- ADEM, A. et al. **Toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* that inhibit the binding of quinuclidinyl benzilate to muscarinic acetylcholine receptors.** Biochim Biophys Acta. Mar 11;968(3):340-5, 1988.
- ADEM, A; KARLSSON, E. **Muscarinic Receptor Subtype Selective Toxins.** Life Sciences, Vol. 60, Nos. 13/14, pp. 1069-1076, 1997.
- ADMIRAAL, J; MYERS, D. K; HOUTEN, J. C. VAN. **Effect of inhibition of cholinesterase on the motility of the small intestine.** Nature (Lond.), 176, 468-469, 1955.
- AIRD, S. D; DA SILVA JR, N. J. **Comparative enzymatic composition of brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms.** Comparative Biochemistry and Physiology. 99B:287-294, 1991.
- ALAPE-GIRON, A. et al. **Electrophoretic and immunochemical studies of *Micrurus* snake venoms.** Toxicon. 32:713-723, 1994.
- ANDRADE, D. V; ABE, A. S. **Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*.** Herpetologica. 55, n.2:200-204, 1999.
- BARROS, A. C. S. et al. **Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (coral snakes).** Toxicon. 32, n.4:445-52, 1994.
- BARLOW, R. B; FRANK, F. M. D; PEARSON, J. D. M. **A comparison of the affinities of antagonists for acetylcholine receptors in the ileum, bronchial muscle and iris of the guinea-pig.** Br. J. Pharmacol. 46: 300-312, 1972.
- BARLOW, R. B. et al. **A comparison of affinity constants for muscarine-sensitive acetylcholine receptors in guinea-pig atrial pace-maker cells at 29°C in ileum at 29°C and 37°C.** B.r. J. Pharmacol. 58: 613-620, 1976.
- BENNETT, M. R. **The concept of transmitter receptors: 100 years on.** Neuropharmacology, v.39, n.4, Feb 14, p.523-46, 2000.
- BÉRNILS, R. S; COSTA, H. C. **Reptiles: List of Species.** Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2012. Disponível em <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 4 de julho de 2012.
- BLUSZTAJN, J. K; LISCOVITCH, M; RICHARDSON, U. I. **Synthesis of acetylcholine from choline derived from phosphatidylcholine in a human neuronal cell line.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.84, n.15, Aug, p.5474-7, 1987.

- BOZLER, E. **Myenteric reflex**. Amer. J. Physiol., 157, 329-337, 1949.
- BRADLEY, K. N. **Muscarinic toxins from the green mamba**. Pharmacol. Ther. 85. 87-109, 2000.
- BROOKES, S. J. H. **Classes of Enteric Nerve Cells in the Guinea-Pig Small Intestine**. The Anatomical record. 262:58-70, 2001.
- BROWNLIE, G; HARRY, J. **Some Pharmacological Properties of the Circular and Longitudinal Muscle Strips from the Guinea-Pig Isolated Ileum**. Brit. J. Pharmacol. 21, 544-554, 1963.
- BRUNTON, L. L; CHABNER, B. A; KNOLLMANN, B. C. (Org.) **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- CAMPBELL, J. A; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. Comstock Pub. Associates, 1989.
- CAMPBELL, J. A; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Cornell University Press, Ithaca, 2004.
- CARDOSO, J. L, C; FRANÇA, F. O. S; FAN, H. W; MÁLAQUE, C. M. S; HADDAD JR, V. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier. 99-107, 2003.
- CAULFIELD, M. P. **Muscarinic receptors-characterization, coupling and function**. Pharmacol Ther; 58: 319-379, 1993.
- CAULFIELD, M. P; BIRDSALL, N. J. M. **International Union of Pharmacology. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors**. Pharmacological Reviews. 50, n.2:279-90, 1998.
- CAREY, H. V. et al. **Muscarinic receptor subtypes mediating the mucosal response to neural stimulation of guinea-pig ileum**. Am. J. Physiol. 253: G323-G329, 1987.
- CECCHINI, A. L. et al. **Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms**. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A.140:125-134, 2005.
- CHANGEUX, J. P. **The nicotinic acetylcholine receptor. An allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels**. Trends Pharmacology, v.11, p.485-92, 1990.
- CHIPPAUX, J. P; WILLIAMS, V; WHITE, J. **Snake venom variability: methods of study, results and interpretation**. Toxicon. 29, n.11:1279-1303, 1991.

- CISCOTTO, P. H. C. et al. **Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity 2 of South American *Micrurus* species.** J Prot, doi:10.1016/j.jprot.2011.07.011, 2011.
- CLARKE, P. et al. **Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [3H] acetylcholine, [3H] nicotine, and  $\alpha$ -bungarotoxin.** The Journal of Neuroscience. 5, n.5:1307, 1985.
- COLLIER, B; ILSON, D. **The effect of preganglionic nerve stimulation on the accumulation of certain analogues of choline by a sympathetic ganglion.** J Physiol, v.264, n.2, Jan, p.489-509, 1977.
- CORRÊA-NETTO, C. et al. **Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*.** J Proteomics. 24;74(9):1795-809, 2011.
- COSTA-LOTUFO, L. V; WILKE, D. V; JIMENEZ, P. C. **Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas.** Quím. Nova, v. 32, n. 3, p. 703 – 716, 2009.
- DALE, H. H. **The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine.** J. Pharmacol. 6: 147–190, 1914.
- DANIEL, C. Y; Janssen, K. L. **Pharmacological techniques for the in vitro study of intestinal smooth muscles.** Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 45. 141– 158, 2001.
- DA SILVA JR, N. J; SITES JR, J. W. **Phylogeny of South American triad coral snakes (*Elapidae: Micrurus*) based on molecular characters.** Herpetologica. 57:1-22, 2001(a).
- DUCANCCEL, F. et al. **Amino acid sequence of a muscarinic toxin deduced from the cDNA nucleotide sequence.** Toxicon 29 516-520, 1991.
- EGLLEN, R. M. et al. **Multidisciplinary analysis of muscarinic receptors in guinea-pig isolated ileum, atria and uterus in vitro.** In Trends in Receptor Research, ed. by P. Angeli, U. Gulini and W. Quaglia, pp. 273-293, Elsevier Science Publishers, 1992a.
- EGLLEN, R. M. et al. **Characterization of the interaction of the cervane alkaloid, imperialine, at muscarinic receptors in vitro.** Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 346: 144-151, 1992b.
- EGLLEN, R. M. **Muscarinic receptor subtype.** Pharmacol Physiol Prog Med Chem. 43:105-136, 2005.

- FELDER, C. C. et al. **Therapeutic Opportunities for Muscarinic Receptors in the Central Nervous System.** Journal of Medicinal Chemistry. Vol. 43, No. 23, 2000.
- FELDBERG, W; SOLANDT, O. M. **The effects of drugs, sugars and allied substances on the small intestine of the rabbit.** J. Physiol. (Lond.), 101, 137-171, 1942.
- FERGUSON, S. M. et al. **Vesicular localization and activitydependent trafficking of presynaptic choline transporters.** J Neurosci, v.23, n.30, Oct 29, p.9697-709, 2003.
- FERNÁNDEZ, J. et al. **Venomic and Antivenomic Analyses of the Central American Coral Snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae).** J. Proteome Res. 2011, 10, 1816–1827, 2011.
- FORD, A. P. D. W. et al. **Pharmacological, biochemical and molecular characterization of muscarinic receptors in the guinea-pig ileum: a multidisciplinary study.** Mol. Neuropharmacol. 1: 117-127, 1991.
- GARTNER, L. P; HIATT, J. L. **Atlas Colorido de Histologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4ª ed. 452p, 2007.
- GIRAUDO, A. R; SCROCCHI, G. J. **Argentinian Snakes: an annotated checklist.** Smithsonian Herpetology. Serv. Ser. 132:1-53, 2002.
- GRIDER, J. R; MAKHLOUF, G. M. **Contraction mediated by Ca<sup>++</sup> release in circular and Ca<sup>++</sup> influx in longitudinal intestinal muscle cells.** vol. 244 no. 2 432-437, 1988.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. **Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica.** Toxicon. 28, n.4: 419-426, 1990.
- HARRY, J. **The effect of drugs on the circular muscle strip from the guinea-pig isolated ileum.** Brit. J. Pharmacol., 20, 399-417, 1963.
- HARVEY, A. L. **Twenty years of dendrotoxins.** Toxicon. 39, n.1:15-26, 2001.
- HARVEY, A. L. et al. **Effects of muscarinic toxins MT1 and MT2 from green mamba on different muscarinic cholinceptors.** Neurochemical research. 27, n.11:1543-1554, 2002.
- HARVEY, M; APARICIO, E. A. G. **Revision of the venomous snakes of Bolivia: Part I. The coralsnakes (Elapidae: *Micrurus*).** Annals of Carnegie Museum. 72:1–52, 2003.
- HONDA, K; TAKANO, Y; KAMIYA, H. **Pharmacological profiles of muscarime receptors in the longitudinal smooth muscle of guinea-pig ileum.** Jpn. J. Pharmacol. 62: 43-47, 1993.

- HOSEY, M. M. **Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors.** FASEB J. 6: 845-852, 1992.
- ISHII, M; KURACHI, Y. **Muscarinic Acetylcholine Receptors.** Current Pharmaceutical Design, Volume 12, Number 28, pp. 3573-3581(9), 2006.
- JERUSALINSKY, D. et al. **Muscarinic toxins from the venom of Dendroaspis snakes with agonist-like actions.** Toxicon. Apr;33(4):389-97, 1995.
- JIMÉNEZ, J. A. P; MUÑOZ, L. J. V. **Toxinas de serpientes con alto potencial terapéutico y su uso en la biomedicina.** Iatreia, v. 22, n. 4, dez, 2009.
- JOLKKONEN, M. et al. **A toxin from the green mamba *Dendroaspis angusticeps*: amino acid sequence and selectivity for muscarinic m4 receptors.**FEBS Lett. 352 91-94, 1994.
- JOLKKONEN, M. et al. **Muscarinic toxins from the black mamba *Dendroaspis polylepis*.** Eur. J. Biochem. 234 579-585, 1995a.
- JOLKKONEN, M. et al. **A snake toxin against muscarinic acetylcholine receptors: amino acid sequence, subtype specificity and effect on guinea-pig ileum\*.** Toxicon. Vol. 33, No. 4. pp. 399-410, 1995b.
- KACHUR, J. F; et al. **Regulation of guinea-pig electrolyte transport by M3 muscarinic acetylcholine receptors *in vitro*.** Mol. Pharmacol. 38: 836-840, 1990.
- KARALLIEDDE, L. **Animal toxins.** British Journal of Anaesthesia. 74, n.3:319-327, 1995.
- KARLSSON, E. et al. **Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors.** Biochimie. 82:793-806, 2000.
- KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica.** 10. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.
- KINI, R. M. **Molecular moulds with multiple missions: functional sites in three-finger toxins.** Clinical Experimental Pharmacology and Physiology. Clinical Experimental Pharmacology and Physiology. 29:815-22, 2002.
- KINI, R. M; DOLEY, R. **Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets.** Toxicon 56: 855–867, 2010.
- KOCHVA, E; NAKAR, O; OVADIA, M. **Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes.** American Zoologist. 23:427, 1983.
- KUEMMERLE, J. F; MURTHY, K. S; MAKHLOUF, G. M. **Agonist-activated, ryanodine-sensitive, IP3-insensitive Ca<sup>2+</sup> release channels in longitudinal muscle of intestine.** Am J Physiol. 266:C1421-31, 1994.

- LANGMEAD, C. J; WATSON, J; REAVILL, C. **Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets**. *Pharmacology & Therapeutics*. 117:232–243, 2008.
- LEÃO, L. I; HO, P. L; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. **Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom**. *BMC Genomics*. 10, 112, 2009.
- LI, S. et al. **Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys***. *Journal of Biochemistry*. 384:119-27, 2004.
- LÖWI, O. **Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung**. *Pflügers Arch* 1921; 189: 239-242, 1921.
- LÖWI, O; NAVARATIL, E. **Übertragbarkeit der Herznevenwirkung, X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoffs**. *Pflügers Arch*; 214: 678-688, 1921.
- LOWRY, O. H. et al. **Protein measurement with the folin phenol reagent**. *J. Biol. Chem*, 193:265-275, 1951.
- MARTINS, M; OLIVEIRA, M. E. **Natural history of snakes in forests of the Manaus region Central Amazonia Brazil**. *Herpetological Natural History*. 6, n.2:78-150, 1998.
- MAX, S. I; LIANG, J. S; POTTER, L. T. **Purification and properties of m1-toxin, a specific antagonist of m1 muscarinic receptors**. *J. Neurosci*. 13 4293-4300, 1993.
- MEBS, D. **Snake venom composition and evolution of Viperidae**. *Kaupia*. 8:145–8, 1999.
- MEIER, J. **Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*)**. *Toxicon*. 24, n.1:41-46, 1986.
- MELGAREJO, A. R. **Serpentes peçonhentas do Brasil. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. SARVIER: São Paulo. 33-61, 2003.
- MISRA, S. et al. **Co-expression of Y1, Y2 and Y4 receptors in smooth muscle coupled to distinct signaling pathways**. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 311:1154–62, 2004.
- MONTEIRO, R. Q. et al. **Variability of bothrojaracin isoforms and other venom principles in individual jararaca (*Bothrops jararaca*) snakes maintained under seasonally invariant conditions**. *Toxicon*. 36, n.1:153-163, 1998.
- MURTHY, K. S; GRIDER, J. R; MAKHLOUF, G. M. **InsP3-dependent Ca<sup>2+</sup> mobilization in circular but not longitudinal muscle cells of intestine**. *Am J Physiol*. 261:G937-44, 1991.

- MURTHY, K. S; KUEMMERLE, J. F; MAKHLOUF, G. M. **Agonist-mediated activation of PLA2 initiates Ca<sup>2+</sup> mobilization in intestinal longitudinal smooth muscle.** Am J Physiol. 269:G93-102, 1995
- MURTHY, K. S; MAKHLOUF, G. M. **Opioid  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  receptor-induced activation of PLC- $\beta$ 3 and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by G<sub>i2</sub> and G<sub>o</sub> in smooth muscle.** Mol. Pharmacol. 50:870-77, 1996.
- MURTHY, K. S; COY, D. H; MAKHLOUF, G. M. **Somatostatin-receptor mediated signaling in smooth muscle: activation of PLC- $\beta$ 3 by G $\beta$  and inhibition of adenylyl cyclase by G<sub>ai1</sub> and G<sub>ao</sub>.** J. Biol. Chem. 271:23458-63, 1996.
- MURTHY, K. S; MAKHLOUF, G. M. **Differential coupling of muscarinic m2 and m3 receptors to adenylyl cyclases V/VI in smooth muscle. Concurrent m2-mediated inhibition via G<sub>ai3</sub> and m3-mediated stimulation via G $\beta$ <sub>q</sub>.** J. Biol. Chem. 272:21317-24, 1997.
- MURTHY, K. S. et al. **Differential signaling by m3 and m2 receptors in smooth muscle: m2-mediated inactivation of MLCK via G<sub>i3</sub>, Cdc42/ Rac1, and PAK1, and m3-mediated MLC20 phosphorylation via Rho kinase/ MYPT1 and PKC/CPI-17 pathways.** Biochem. J. 374:145-55, 2003.
- NAKATA, K; OKUDA, T; MISAWA, H. **Ultrastructural localization of highaffinity choline transporter in the rat neuromuscular junction: enrichment on synaptic vesicles.** Synapse, v.53, n.1, Jul, p.53-6, 2004.
- NATHANSSON, N. M. **Synthesis, trafficking and localization of muscarinic acetylcholine receptors.** Pharmacol. Ther, 119:33-43, 2008.
- NOUAILHETAS, V. L. A; SHIMUTA, S. I; PAIVA, A. C. M; PAIVA, T. B. **Calcium and Sodium Dependence of the Biphasic Response of the Guinea-Pig Ileum to Agonists.** Eur J Pharmacol. 116: 41-47. 1985.
- OLIVEIRA, R. C; WEN, F. H; SIFUENTES, D. N. **Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica.** São Paulo: Sarvier. 2009
- PHUI YEE, J. S. et al. **Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy.** Biochimie. 86, n.2:137-149, 2004.
- PEPEU, G; GIOVANNINI, M. G. **Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes.** Learn Mem, v.11, n.1, Jan-Feb, p.21-7, 2004.
- PIMENTA, D. C. et al. **Mass spectrometric analysis of the individual variability of *Bothrops jararaca* venom peptide fraction. Evidence for sex based variation among the bradykinin potentiating peptides.** Rapid communications in mass spectrometry. 21, n.6:1034-1042, 2007.



- PINHO, F. M. O; OLIVEIRA, E. S; FALEIROS, F. **Acidente ofídico no estado de Goiás.** Revista da Associação Médica Brasileira. 50:93-6, 2004.
- PORTAL DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31500](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31500)>. Acesso: novembro de 2012.
- RIBEIRO, F. M. et al. **The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1.** J Neurochem, v.97, n.1, Apr, p.1-12, 2006.
- ROSS, M. H; PAWLINA, W. **Histologia:** Texto e Atlas. Em Correlação Com a Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 5ª ed. 928p, 2008.
- SALDARRIAGA, M. M. et al. **Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia.** Toxicon. 42, n.4:405-411, 2003.
- SANTOS, R. F. et al. **Ent-7 $\alpha$ -acetoxytrachyloban-18-oic acid and ent-7 $\alpha$ -hydroxytrachyloban-18-oic acid from *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul. modulate K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels to reduce cytosolic calcium concentration on guinea pig ileum.** European Journal of Pharmacology, 678, 39–47, 2012.
- SARAVIA, P. et al. **Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications.** Revista de Biologia Tropical. 50, n.1:337-346, 2002.
- SAZIMA, I; ABE, A. S. **Habits of five Brazilian snakes with coral-snake pattern including a summary of defensive tactics.** Studies on Neotropical Fauna and Environment. 26, n.3:159-164, 1991.
- SCAGNELLI, G. P. et al. **Plasma 1-palmitoyl-2-linoleoyl phosphatidylcholine. Evidence for extensive phospholipase A1 hydrolysis and hepatic metabolism of the products.** J Biol Chem, v.266, n.27, Sep 25, p.18002-11, 1991.
- SCARR, E. **Muscarinic Receptors: Their Roles in Disorders of the Central Nervous System and Potential as Therapeutic Targets.** CNS Neuroscience & Therapeutics 18:369–379, 2012.
- SIEGEL, G. J. **Basic Neurochemistry:** Molecular, Cellular and Medical Aspects. Elsevier/Academic Press. 974p, 2006.
- SILVA, B. A; NOUAILHETAS, V. L; ABOULAFIA, J. **Desensitization to ANG II in guinea pig ileum depends on membrane repolarization: role of maxi-K<sub>1</sub> channel.** Am J Physiol. 277:C739-45, 1999.

- SILVA, D. C. et al. **Characterization of a new muscarinic toxin from the venom of the Brazilian coral snake *Micrurus lemniscatus* in rat hippocampus.** Life Sciences 89. 931–938, 2011.
- TANAKA, G. D. et al. **Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization.** Neglected tropical diseases, v. 4, n. 3, mar, 2010.
- TEIXEIRA, J. P. **Efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* sobre astrócitos em cultura.** 2012. 86 fls. Dissertação (Mestre em Toxinologia). Instituto Butantã, São Paulo, 2012.
- VANDERMEERS, A. et al. **Purification and sequence determination of a new muscarinic toxin (MT4) from the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*).** Toxicon 33 1171-1179, 1995.
- VAN KOPPEN, C. J; KAISER, B. **Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling.** Pharmacol Ther. May;98(2):197-220, 2003.
- VITAL BRAZIL, O. **Coral Snake Venoms: Mode of Action and Pathophysiology of Experimental Envenomation.** Revista do Instituto de Medicina Tropical. 29:119-26, 1987.
- VENTURA, A. L. M. et al. **Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking.** Rev Psiquiatria. 37(2):66-72, 2010.
- VOGT, M. **The site of action of some drugs causing stimulation of the circular coat of the rabbit's intestine.** J. Physiol. (Lond.), 102, 170-179, 1943.
- WEIS, R; McISAAC, R. J. **Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*.** Toxicon. 9, n. 3:219-228, 1971.
- WESS, J. **Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications.** Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 44:423-450, 2004.
- YAMAMURA, H. I; SNYDER, S. H. **High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain.** J Neurochem, v.21, n.6, Dec, p.1355-74, 1973.

# Apêndice

## APÊNDICE

Resultados deste trabalho foram apresentados nos seguintes eventos:

- XI Congress of the Pan American Section of the International Society on Toxinology and the XII Congress of the Brazilian Society of Toxinology, 2013
- XLII Annual Meeting of SBBq, 2013
- Encontro Nacional de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia - ENAPEBI, 2012

- *MICRURUS LEMNISCATUS* VENOM PRESENTS MUSCARINIC ACTIVITY ON GUINEA-PIG ILEUM. **MARCELA CRISTINE SILVA**; ITALO ROSSI ROSENO MARTINS; MICHELINE FREIRE DONATO; BAGNÓLIA ARAÚJO DA SILVA; MARIA ELENA DE LIMA. XI Congress of the Pan American Section of the International Society on Toxinology and the XII Congress of the Brazilian Society of Toxinology, 2013, Guarujá/SP.

- PURIFICATION, PROTEOMIC PROFILE AND SOME PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES FROM *MICRURUS LEMNISCATUS* SNAKE VENOM. **SILVA, M. C.**; DONATO, M. F.; Martins, I.R.R.; TORRES, F.S.; SANTOS, D.M.; SILVA, B.A.; PIMENTA, A.M.C.; KUSHMERICK, C.; De Lima, M.E. XLII Annual Meeting of SBBq, 2013, Foz do Iguacu/PR.


- *MICRURUS LEMNISCATUS* VENOM PRESENTS MUSCARINIC ACTIVITY ON GUINEA-PIG ILEUM. **SILVA, M. C.**; Martins, I.R.R.; Melo, I.F.; DONATO, M. F.; SILVA, B.A.; De Lima, M.E. Encontro Nacional de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia - ENAPEBI, 2012, Belo Horizonte/MG. (*apresentação oral e na forma de pôster*)

- MASSES PROFILE OF THE VENOM FROM THE SNAKE *MICRURUS LEMNISCATUS*. **SILVA, M. C.**; DONATO, M. F.; FREITAS, A.C.N.; Melo, I.F.; PIMENTA, A.M.C.; De Lima, M.E. Encontro Nacional de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia - ENAPEBI, 2012, Belo Horizonte/MG.

# Anexo

## ANEXO

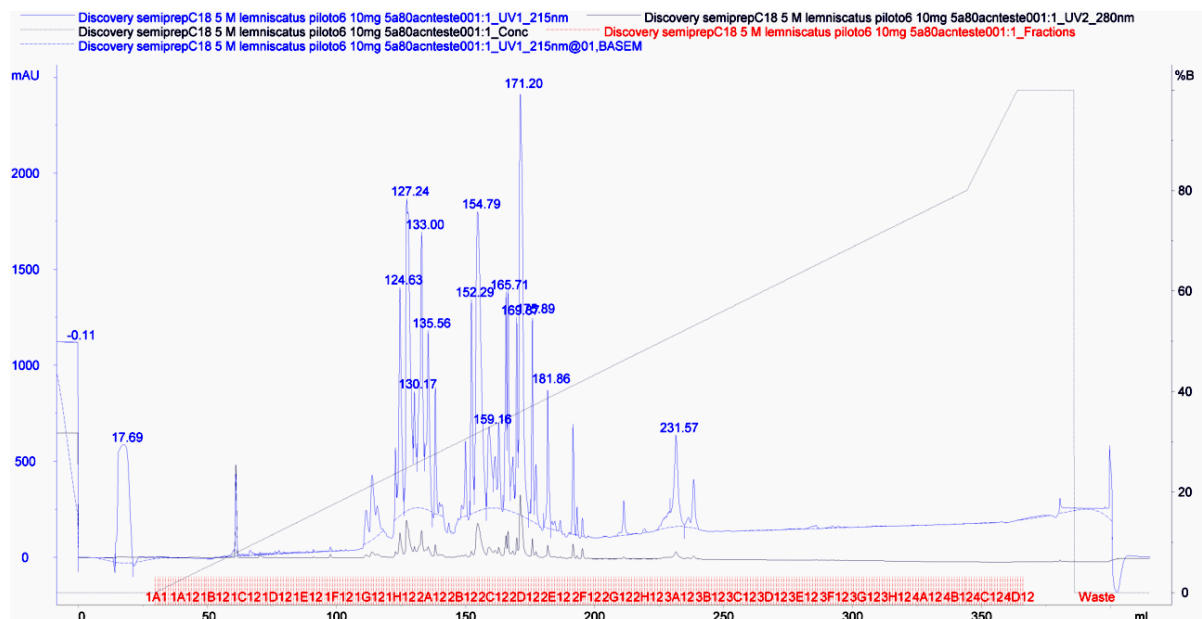
## Anexo A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais

 <p><b>UFMG</b></p>	<p><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b></p> <p><b>CEUA</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b></p>
<p><b>CERTIFICADO</b> Certificamos que o Protocolo nº. 367 / 2012, relativo ao projeto intitulado "SCREENING DAS FRAÇÕES DA PEÇONHA DA SERPENTE MICRURUS LEMNISCATUS COM ATIVIDADE MUSCARÍNICA EM ÍLEO DE COBAIA", que tem como responsável Maria Elena de Lima Perez Garcia, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 14/03/2013. Este certificado expira-se em 14/03/2018.</p>	
<p><b>CERTIFICATE</b> We hereby certify that the Protocol nº. 367 / 2012, related to the Project entitled "SCREENING OF FRACTIONS FROM VENOM OF THE SNAKE MICRURUS LEMNISCATUS WITH MUSCARINICACTIVITY IN GUINEA PIG ILEUM", under the supervision of Maria Elena de Lima Perez Garcia, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 14/03/2013. This certificates expires in 14/03/2018.</p>	
<p>FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 14/03/2013.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a></p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a></p>	

## Anexo B

### Fracionamento do veneno bruto

O veneno foi fracionado em sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) aparelho ÄKTA Explorer 100 (Amersham Biosciences® Uppsala, Suécia) e Ettan Shimadzu em uma ou duas dimensões. Unidimensionalmente, 10 mg de veneno foram fracionadas por cromatografia de fase reversa (RPC) utilizando uma coluna semi-preparativa C18 (Discovery; 25x1cm, 5µm de partículas) previamente equilibrada com solução A (0,1% TFA/H<sub>2</sub>O Mili-Q® v/v). O veneno bruto foi eluído em gradiente linear de 0 a 80% do solvente B (0,1% TFA/acetonitrila v/v). Para o fracionamento em duas dimensões, utilizou-se inicialmente uma cromatografia de troca iônica (CIEX), coluna analítica TSK-Gel® CM-SW (15 cm x 4,6 mm) (Tosoh Biosep, Montgomeryville, EUA), equilibrada com solução A (Acetato de sódio 20 mM, pH5). A eluição de 2 mg de veneno bruto foi realizada em gradiente linear de 0 a 100% do solvente B (Acetato de sódio 20 mM, pH5 e cloreto de sódio 1M). As frações semi-purificadas obtidas foram submetidas a um segundo passo cromatográfico por RPC, coluna analítica Source™ 5 4,6/150 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) com as mesmas soluções utilizadas pela coluna C18. Todas as eluições foram monitorizadas por absorvância a 214 e 280 nm, correspondentes à ligação peptídica e anéis aromáticos respectivamente. As frações semi-purificadas eluídas foram analisadas por espectrometria de massa (MALDI TOF MS) e armazenadas a -20°C. (*Metodologia da doutoranda Micheline Donato*).



**Figura 1. Fracionamento unidimensional do veneno bruto da serpente *Micrurus lemniscatus*.** Através de cromatografia líquida de fase reversa (RPC) 10mg do veneno bruto foram fracionadas em coluna semi-preparativa Supelco C18, equilibrada em 0,1% TFA/água Milli-Q® (v/v) e eluído com 0,1% TFA/acetonitrila (v/v) em gradiente linear de 0 a 80%. A eluição foi monitorada na absorvância de 214 e 280 nm. Foram obtidas 34 frações semi-purificadas, as quais foram eluídas entre 20 e 53% de acetonitrila (*Dados da doutoranda Micheline Donato*).

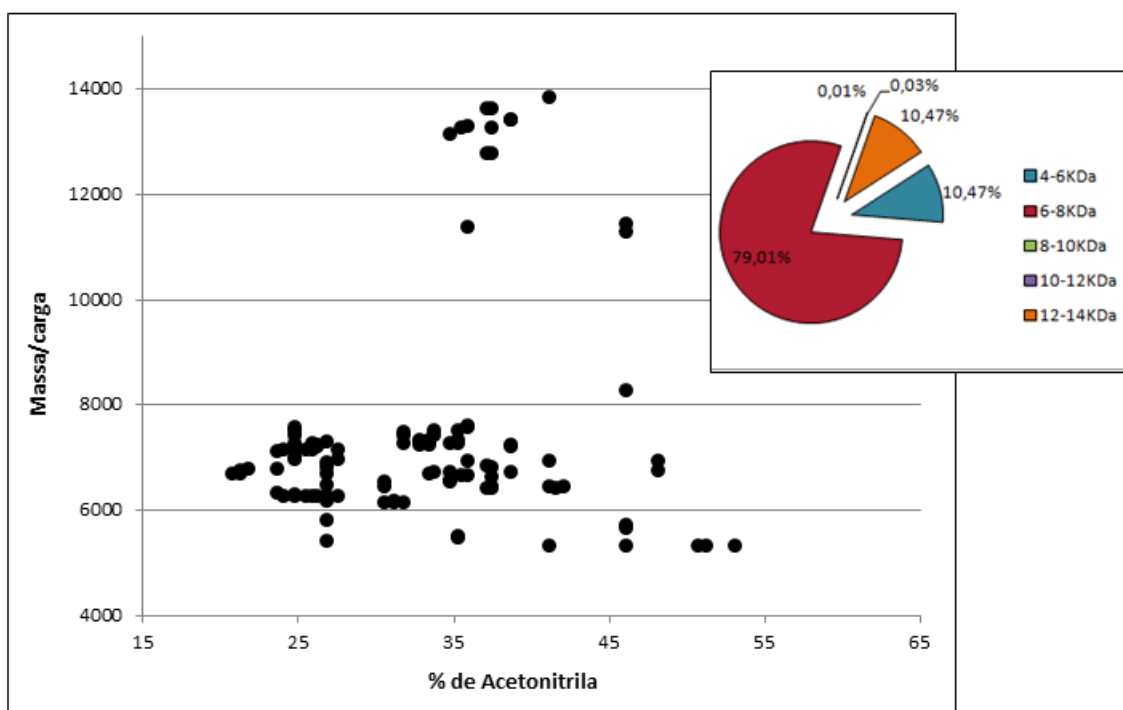
### Determinação da massa molecular por espectrometria de massas

Os materiais de interesse obtidos das cromatografias foram liofilizados e ressuspendidos em 1 mL de água Milli-Q®. Para determinar os valores das massas moleculares das amostras, as análises por espectrometria de massa em MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight) foram realizadas no aparelho Autoflex III (Bruker Daltonics, Alemanha), com o programa Flex Control 2.4.30.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras (0,7 µL), em triplicata, foram aplicadas na placa Anchorchip 600 acrescida de três diferentes soluções matrizes (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico; super-DHB,



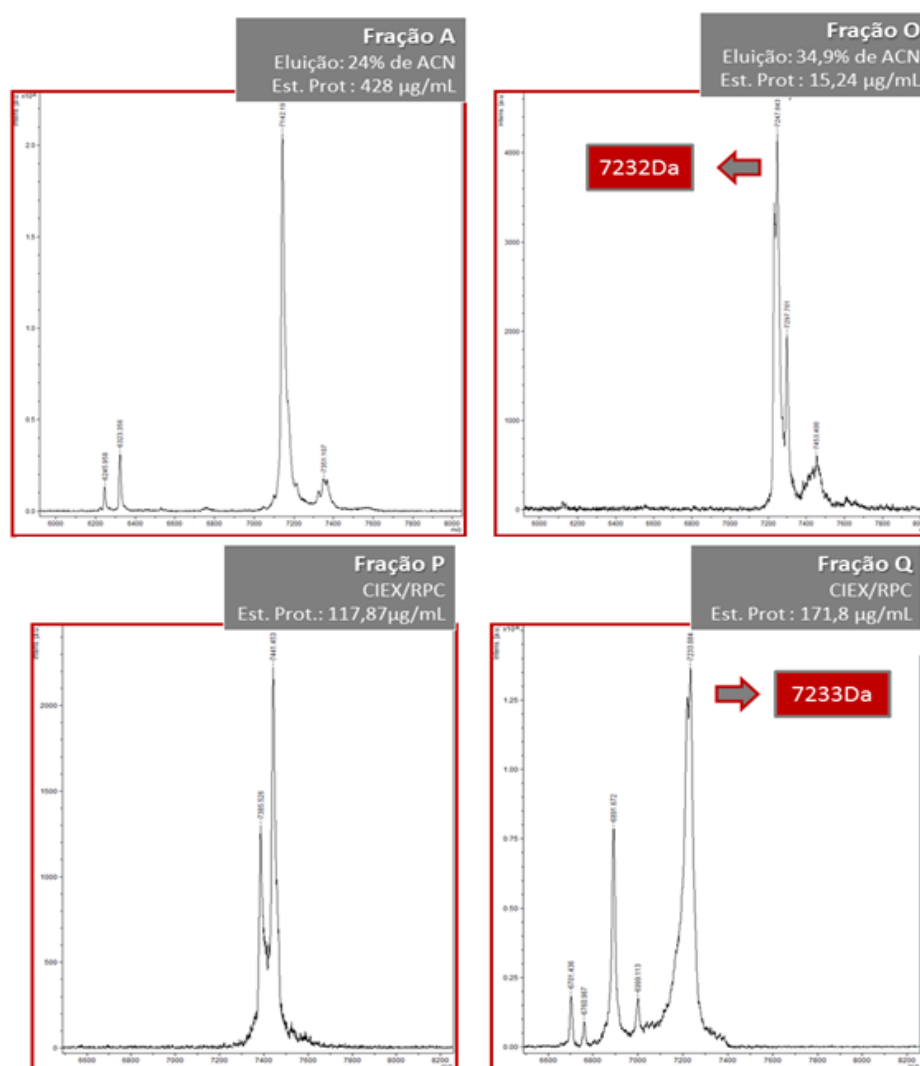
mistura de DHB e 2-hidroxi-5-ácido methoxibenzoico 9:1; e ácido sinapínico) (1:1 v/v) deixando essas misturas cristalizarem. O calibrante utilizado foi o protein standart I e a faixa de massas analisada foi de 5 a 20 KDa. Os espectros de MS foram obtidos em modo positivo linear. Os dados foram analisados através do programa Flex Analysis 3 (Bruker Daltonics, Alemanha). (*Metodologia da doutoranda Micheline Donato*)

### Distribuição de massas/cargas das toxinas que compõem o veneno da serpente *Micrurus lemniscatus*



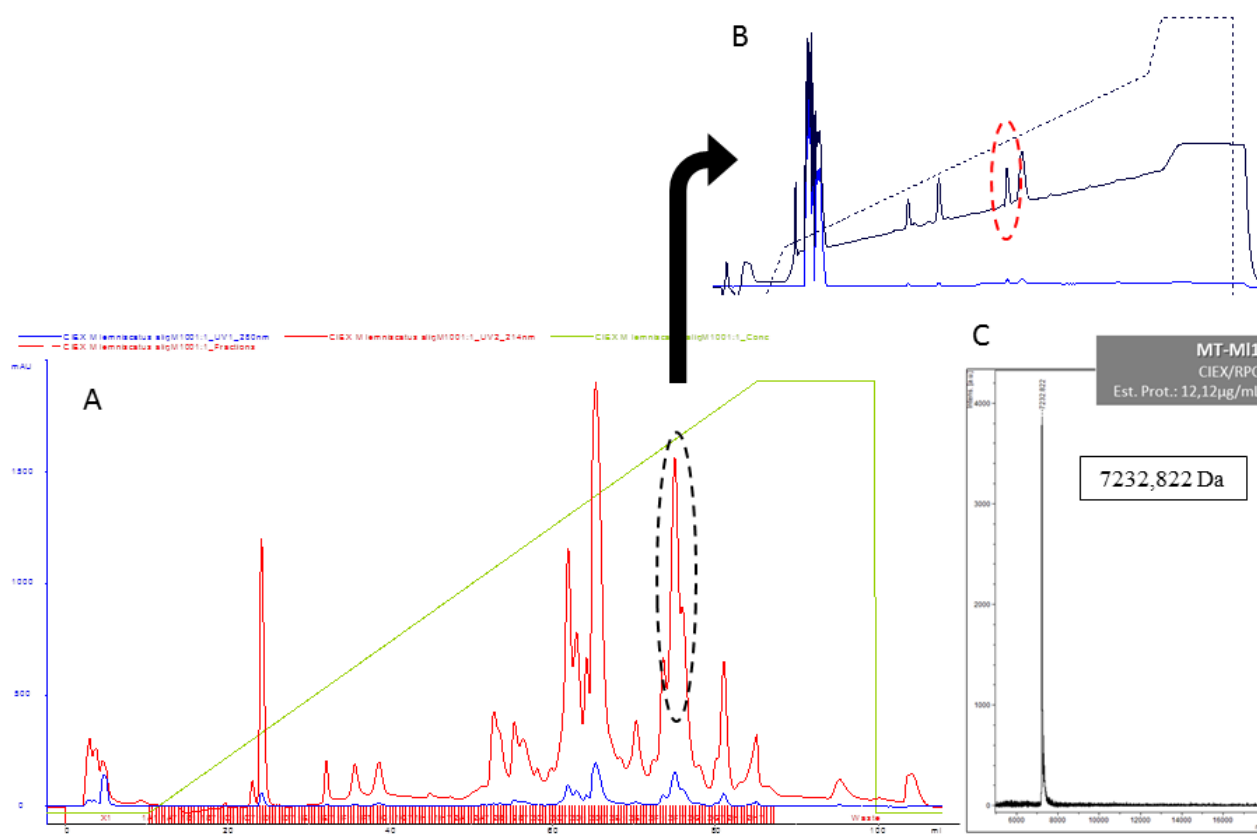
**Figura 2.** Dispersão de massas/cargas das toxinas do veneno de *Micrurus lemniscatus* em relação à porcentagem de eluição em acetonitrila. No detalhe tem-se um gráfico de pizza informando a proporção de toxinas em cada faixa de massa.

### Espectro de masas das frações semi-purificadas com atividade



**Figura 3. Cromatograma das frações semi-purificadas com atividade sob segmentos de músculo liso longitudinal do íleo de cobaia.** Para as amostras fracionadas unidimensionalmente (A e O) são apresentadas as porcentagens de eluição, bem como a estimativa proteica. As frações semi-purificadas P e Q foram submetidas a dois passos cromatográficos (CIEX/RPC). (Cromatogramas obtidos pela doutoranda Micheline Donato).

### Obtenção da toxina MT-MI1 do VB da serpente *Micrurus lemniscatus*



**Figura 4. Obtenção da toxina MT-MI1 do VB da serpente *Micrurus lemniscatus*.** (A)- VB foi fracionado por cromatografia de troca iônica e a fração em destaque (círculo pontilhado) foi submetida a um segundo passo cromatográfico, (B)- por cromatografia de fase reversa. (Dados obtidos pela doutoranda Micheline Donato). (C)- Massa molecular e estimativa proteica da toxina.