UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização estrutural e estudo do perfil neurofarmacológico de
substâncias isoladas do veneno de *Rhinella schneideri*
(Anura: *Bufonidae*)**

Mateus Amaral Baldo

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização estrutural e estudo do perfil neurofarmacológico de
substâncias isoladas do veneno de *Rhinella schneideri*
(Anura: *Bufonidae*)**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia, para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Mateus Amaral Baldo

Orientador: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 11/12/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Baldo, Mateus Amaral.

Caracterização estrutural e estudo do perfil neurofarmacológico de
substâncias isoladas do veneno de *Rhinella schneideri* (Anura:
Bufonidae) Ribeirão Preto, 2015.

130 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Toxicologia.

Orientador: Arantes, Eliane Candiani.

1. *Rhinella schneideri*. 2. Bufadienolídeos. 3. Neuroproteção.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Mateus Amaral Baldo

Título do trabalho: Caracterização estrutural e estudo do perfil neurofarmacológico de substâncias isoladas do veneno de *Rhinella schneideri* (Anura: *Bufonidae*)

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia, para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia
Orientadora: Eliane Candiani Arantes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha Letícia, por seu amor imensurável, e sempre me alegrar nos momentos difíceis.

Dedico este trabalho à minha esposa Elisa, por me apoiar em todas as decisões, e por tornar possível a realização deste trabalho.

Dedico este trabalho à minha mãe, que sempre me incentivou e torceu por mim nesta etapa.

Dedico este trabalho à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes Braga, por não apenas me orientar, mas servir como exemplo a ser seguido, e sobretudo por ser uma verdadeira mãe para todos os seus alunos do LTA.

Dedico este trabalho ao Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos, por toda a ajuda, ensinamentos e principalmente por sua amizade.

Dedico este trabalho a todos os professores que me receberam em seus laboratórios sempre com muita atenção.

Enfim, dedico este trabalho a todas as pessoas que foram envolvidas e contribuíram de alguma forma para o sucesso deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por desviar sempre meu caminho e me colocar no local correto mesmo tendo que passar por trilhas tortuosas. E para atravessar esses obstáculos me dar forças infinitas e coragem.

Agradeço à minha orientadora e madrinha Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes Braga, por todos os momentos iluminados e dedicados ao ensino, que me fez crescer não só como aluno, mas como homem em questão de maturidade. Obrigado por ter me proporcionado a oportunidade e principalmente confiança de me introduzir a ciência.

Agradeço ao Professor e amigo Dr. Wagner Ferreira dos Santos, por me apresentar a neurociência e abrir as portas de seu laboratório para tão grandiosa caminhada nas descobertas da ciência.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Andreia C. K. F. Mortensen da Drexel University (Filadélfia –EUA) por ter me orientado no doutorado sanduíche e me proporcionar um grande aprendizado científico além de uma grande experiência de vida.

Agradeço ao Prof. Dr. Ole Valente Mortensen por todo ensinamento, conversas experiências trocadas sejam elas científicas ou não.

Agradeço ao Prof. Dr. Norberto Pepporine Lopes e aos técnicos pela colaboração nos ensaios de espectrometria de massas e atenção comigo neste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Leonardo Resstel por toda colaboração, abertura do laboratório e por sua amizade, e ao colega de laboratório Leandro pela ajuda na realização dos ensaios.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Luciane Carla Alberici pela ajuda e abertura de seu laboratório.

Agradeço à minha esposa e colega de laboratório Elisa, pela força incondicional e sobrenatural que traz a mim, pelo maior presente que já recebi que é minha filha Letícia, que é por elas que eu dedico a minha vida.

Agradeço à especialista do LTA Karla e à técnica Iara por todo apoio, paciência e disponibilidade, aos colegas do Laboratório de Toxinas Animais (LTA) e aos colegas do Laboratório de Psicobiologia em especial ao Zé, Lívea, Marcus Celani e Alberth.

Agradeço à minha mãe por sempre me apoiar, dar todo o suporte necessário, por seu amor incondicional, e por sempre me querer muito bem, ajudou muito para que este trabalho se realizasse.

À FAPESP e CNPQ por todo apoio financeiro.

Agradeço a todos que de alguma forma, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não vim até aqui para desistir agora”

(Humberto Gessinger)

RESUMO

BALDO, M. A. **Caracterização estrutural e estudo do perfil neurofarmacológico de substâncias isoladas do veneno de *Rhinella schneideri* (Anura: *Bufonidae*)**. 2015. 130f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Toxinas animais sempre foram estudadas ao longo dos tempos por apresentarem um arsenal químico de moléculas com diversas funções biológicas. Estudos podem conduzir essas moléculas para serem aplicadas na geração de agentes terapêuticos e/ou de ferramentas experimentais para a pesquisa básica e aplicada, justificando sua purificação e análise funcional. Considerando que estudos de venenos de sapos são relevantes, por serem estes considerados uma boa fonte de toxinas que atuam sobre diferentes sistemas biológicos, os objetivos deste trabalho foram identificar a fração Rs5 do veneno de *Rhinella schneideri* e caracterizar suas ações farmacológicas e/ou toxicológicas no sistema nervoso central. O veneno de *Rhinella schneideri* foi inicialmente submetido à diálise o que resultou na fração de baixa massa molecular, que foi liofilizada e submetida a uma cromatografia de fase reversa em sistema CLAE em coluna C18. Das 5 frações majoritárias obtidas nesta cromatografia apenas a Rs5 foi utilizada para caracterização de neuroproteção devido aos resultados prévios do grupo. A Rs5 (2 e 4 µg) se mostrou eficiente em proteger células neuronais quando submetidas à crises induzidas por pilocarpina. As frações Rs3, Rs4 e Rs5 e também a bufalina adquirida comercialmente (BAC) foram utilizadas para ensaios em transportadores de neurotransmissores dopamina (Rs5-IC₅₀: 0,063 ± 0,014 µM), serotonina (Rs5-IC₅₀: 0,090 ± 0,065 µM), norepinefrina (Rs5-IC₅₀: 0,079 ± 0,097 µM), glutamato, GABA (Rs5-IC₅₀: 0,010 ± 0,010 µM) e glicina (Rs5-IC₅₀: 0,021 ± 0,015 µM), nos quais demonstraram ações inibitórias ou estimulantes na recaptação. A fração Rs3 foi submetida a ensaios de inibição de crises convulsivas induzidas por PTZ e se mostrou parcialmente eficaz, porém em todos os animais houve aumento do tempo de latência para o desenvolvimento de crises. Na tentativa de se caracterizar um alvo para neuroproteção, ensaios com mitocôndrias isoladas foram realizados. Os resultados mostraram que não ocorre interferência na função mitocondrial em

baixas concentrações da Rs5 (1, 10 e 50 nM) indicando baixa toxicidade nestas doses. Baseando-se nos resultados de recaptção, ensaios comportamentais foram realizados demonstrando que a Rs3 e a Rs5 foram capazes de inibir ansiedade. Por fim, vale ressaltar que estes estudos são inéditos com moléculas do tipo heterosídeos cardiotônicos derivados de anfíbios, sendo pioneiros e relevantes para futuras pesquisas.

ABSTRACT

BALDO, M.A. **Structural characterization and neuropharmacology profile study of substances isolated from *Rhinella schneideri* poison (Anura: Bufonidae).** 2015. 130f. Thesis (PhD). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Animal toxins have been studied over the years because they present a chemical arsenal of molecules with diverse biological functions. Studies can lead these molecules to be applied in the generation of therapeutic agents and / or experimental tools for basic and applied research, justifying its purification and functional analysis. Whereas toads poisons studies are relevant, since these are considered a good source of toxins that act on different biological systems, the objectives of this study were to identify the Rs5 fraction isolated from *Rhinella schneideri* toad poison and characterize their pharmacological actions and / or toxicological in central nervous system. The poison of *Rhinella schneideri* was first submitted to dialysis, which resulted in the fraction of low molecular weight, which was lyophilized and subjected to reverse phase chromatography on HPLC C18 system. Among the majority five fractions obtained by chromatography, only Rs5 was used for characterization of neuroprotection due to previous results of the group. The Rs5 (2 e 4 µg) proved to be efficient in protecting neuronal cells when subjected to seizures induced by pilocarpine. The fractions Rs3, Rs4 and Rs5 and also bufalin purchased commercially (BAC) were used for testing transporters of neurotransmitters dopamine (Rs5-IC₅₀: 0,063 ± 0,014 µM), serotonin (Rs5-IC₅₀: 0,090 ± 0,065 µM), norepinephrine (Rs5-IC₅₀: 0,079 ± 0,097 µM), glutamate, GABA (Rs5-IC₅₀: 0,010 ± 0,010 µM) and glycine (Rs5-IC₅₀: 0,021 ± 0,015 µM), in which they demonstrated inhibitory or stimulating action on reuptake. The Rs3 fraction was subjected to assays of inhibition of seizures induced by PTZ test and proved to be partially effective, but in all animals showed significant increase in latency for the development of seizures. In an attempt to characterize a target for neuroprotection, tests with isolated mitochondria were performed. The results showed that no interference occurs on mitochondrial function at low concentrations of Rs5 (1, 10 e 50 nM) showing low toxicity at these doses. Based on the results of reuptake, behavioral assays were performed showing that Rs3 to Rs5 and were able to inhibit anxiety. Finally, it is important to

emphasize that these studies are unprecedented using cardiotonic glycosides derived from amphibians, being pioneers and relevant for future research.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global das espécies de anfíbios.	3
Figura 2. <i>Rhinella schneideri</i> (Fonte: Laboratório de Toxinas Animais). Em (A) observa-se este animal em um local seco e em (B) ambiente aquático. Os sapos da espécie <i>Rhinella schneideri</i> apresentam adaptações para sobreviver nos dois ambientes.	4
Figura 3. Compostos biologicamente ativos encontrados nos venenos de sapos. Pode-se observar moléculas esteroidais como a bufalina, aminas biogênicas como a serotonina, alcaloides como a bufotenina e peptídeos como a α Aureina.	7
Figura 4. Esquema representando a estrutura química dos heterosídeos cardiotônicos. Pode-se observar na parte superior da figura o exemplo de uma molécula completa, apresentando três constituintes: o glicosídeo, o núcleo esteroidal e o anel lactônico. O anel lactônico de cardenolídeos provenientes de plantas contêm 5 átomos, mas nos bufadienolídeos obtidos de anfíbios o anel lactônico apresenta 6 átomos, como apresentado acima (grupamento R). Pode-se observar também que estruturas contendo apenas o anel lactônico e o núcleo esteroidal (sem o açúcar) formam a parte aglicona ou genina da molécula. O exemplo apresentado é a bufalina.	10
Figura 5. Molécula de bufalina	11
Figura 6. A molécula de bufalina pode ser submetida a algumas modificações em sua estrutura, que irão aumentar ou diminuir a sua atividade citotóxica. Em verde estão as modificações que fazem com que a molécula tenha sua atividade aumentada, e em vermelho, as modificações que fazem com que a molécula tenha sua atividade diminuída. Adaptado de Kamano et al., 1998.	12
Figura 7. Fluxograma dos ensaios realizados para a caracterização estrutural e funcional das toxinas isoladas do veneno de <i>Rhinella schneideri</i> .	25
Figura 8. Extração do veneno de <i>Rhinella schneideri</i> através da compressão de suas glândulas parotóides. Observa-se uma substância viscosa de cor amarelada. (Fonte: Laboratório de Toxinas Animais)	26
Figura 9. Esquema de fracionamento do veneno de <i>Rhinella schneideri</i> utilizado para a obtenção das amostras de baixa massa molecular e suas frações.	29
Figura 10. Representação esquemática do padrão de captura de imagens da camada de células piramidais das regiões CA1 e CA3 e também da camada polimórfica do giro denteado – hilus. Imagem correspondente à prancha 34 (Bregma – 3,6 mm) do atlas de Paxinos e Watson (1998).	37

- Figura 11.** Perfil cromatográfico da fração de baixa massa molar (A), BAC (B) e fração de baixa massa molar + BAC (C) em coluna de fase reversa C18. A coluna C18 foi inicialmente equilibrada com Tampão A (solução aquosa de TFA 0,1%). A vazão foi de 0,8 mL/minuto e a amostra foi eluída com gradiente linear de acetonitrila chegando a 100% do Tampão B (solução aquosa de TFA 0,1 % + acetonitrila 80 %) em aproximadamente trinta e seis minutos. 50
- Figura 12.** Perfil cromatográfico da fração Rs5 em coluna de fase reversa C18. A coluna C18 foi inicialmente equilibrada com Tampão A (solução aquosa de TFA 0,1%). A vazão foi de 0,8 mL/minuto e a amostra foi eluída com gradiente linear de acetonitrila chegando a 100% do Tampão B (solução aquosa de TFA 0,1 % + acetonitrila 80 %) em aproximadamente trinta minutos. 51
- Figura 13.** Espectro de massas da subfração Rs5 (A) do veneno de *Rhinella schneideri* e da BAC (B). 52
- Figura 14.** CG/MS da fração de baixa massa molar mostrando vários picos com diferentes massas, que resultou na provável identificação das várias moléculas presentes no veneno de *Rhinella schneideri*. 53
- Figura 15.** Perfil da cromatografia de fase gasosa da subfração Rs5 (A). Espectro de massas obtido da fragmentação do íon de 386 Da, correspondente à massa molar da bufalina (B). 56
- Figura 16.** Produtos da fragmentação da bufalina proposta por Ye (2005), em que se pode observar primeiramente a saída de duas moléculas de água. Após essa etapa, ocorrem rearranjos moleculares que levam à formação de novos fragmentos. Em A, observa-se as massas formadas e em B, os hipotéticos rearranjos moleculares. 57
- Figura 17.** Perfil da Cromatografia em fase gasosa da BAC (A) e da BAC sobreposto ao da subfração Rs5 (B), demonstrando que ambas apresentam o mesmo tempo de retenção. 58
- Figura 18.** Espectros de massas produzidos pela fragmentação da BAC (A) e da subfração Rs5 (B). 59
- Figura 19.** Latências para o desencadeamento de crises induzidas pelo PTZ após a injeção de diferentes concentrações da Rs3 (0,25 e 0,5 µg – 1 µL). Os dados (médias ± EPM) foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Dunnett. (*) $p < 0,05$, alteração significativa em relação ao controle (salina). Os números entre parênteses acima das colunas representam o número de animais utilizados nos ensaios. 62
- Figura 20.** Imagens representativas da marcação de *Nissl* em secções hipocâmpais de 20 µm da camada piramidal da região CA1 do hipocampo após ensaios agudos envolvendo crises convulsivas induzidas por pilocarpina. Os grupos experimentais (A) NAIVE, (B) Salina, (C) Salina + SE, (D) Rs5 1,0 µg + SE, (E) Rs5 2,0 µg + SE, e (F) Rs5 2,0 µg + SE, utilizando-se um aumento de 400x. 65

- Figura 21.** Imagens representativas da marcação de *Nissl* em secções hipocâmpais de 20 µm da camada piramidal da região CA3 do hipocampo após ensaios agudos envolvendo crises convulsivas induzidas por pilocarpina. Os grupos experimentais (A) NAIVE, (B) Salina, (C) Salina + SE, (D) Rs5 1,0 µg + SE, (E) Rs5 2,0 µg + SE, e (F) Rs5 2,0 µg + SE, utilizando-se um aumento de 400x. 66
- Figura 22.** Imagens representativas da marcação de *Nissl* em secções hipocâmpais de 20 µm da região do *hilus* do giro denteado em ensaios agudos envolvendo crises convulsivas induzidas por pilocarpina. Os grupos experimentais (A) NAIVE, (B) Salina, (C) Salina + SE, (D) Rs5 1,0 µg + SE, (E) Rs5 2,0 µg + SE, e (F) Rs5 2,0 µg + SE, utilizando-se um aumento de 400x. 66
- Figura 23.** Perda celular nas regiões hipocâmpais (A) CA1, (B) CA3 e (C) *hilus* do giro denteado após crise aguda induzida por pilocarpina. Os dados são expressos como porcentagem de perda celular em relação ao grupo NAIVE. Para a análise estatística utilizou-se ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de *Studente-Newman-Keuls*. * $p < 0,05$ em relação ao controle positivo (salina + SE). 67
- Figura 24.** Efeitos da Rs5 em diferentes concentrações sobre o nível de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. A queda nos níveis de ATP foi induzida por CCCP 1mmol/L. Os resultados representam a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. * $p < 0,05$ - estatisticamente significativo em relação ao controle negativo. 70
- Figura 25:** Efeitos da Rs5 em diferentes concentrações sobre o potencial de membrana mitocondrial, avaliados com safranina-o e CCCP 2 µM como controle positivo. Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. U.F.A.(Unidade de Fluorescência Arbitrária). 71
- Figura 26.** Efeito da Rs5 em diferentes concentrações sobre a indução do inchamento mitocondrial. O controle positivo foi induzido com Fosfato Inorgânico (Pi) 1 mmol/L. Os resultados são a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. 73
- Figura 27.** Efeitos da Rs5 sobre o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial, avaliados usando Calcium Green. Succinato (5mM) foi adicionado à suspensão mitocondrial para estimular a captação de cálcio. As amostras foram adicionadas por volta de 150 segundos. O CCCP 2 µM foi utilizado como controle positivo. Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. U.F.A.(Unidade de Fluorescência Arbitrária). 74
- Figura 28.** Perfis representativos de recaptção de glutamato em transportadores (A e B) EAAT1, (C e D) EAAT2 e (E e F) EAAT3, na presença de diferentes concentrações de Rs5 (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 µM). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas. 80
- Figura 29.** Perfis representativos de recaptção de glutamato em transportadores (A e B) EAAT1, (C e D) EAAT2 e (E e F) EAAT3, na 81

presença de diferentes concentrações de BAC (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 μ M). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas.

Figura 30. Perfis representativos de recaptação de diferentes neurotransmissores por seus transportadores específicos: (DAT) Transportador de dopamina, (SERT) transportador de serotonina, (NET) transportador de norepinefrina, (GAT) transportador de GABA e (Glyt) transportador de glicina, na presença de diferentes concentrações de Rs3 (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 μ M). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas. 82

Figura 31. Perfis representativos de recaptação de diferentes neurotransmissores por seus transportadores específicos: (DAT) Transportador de dopamina, (SERT) transportador de serotonina, (NET) transportador de norepinefrina, (GAT) transportador de GABA e (Glyt) transportador de glicina, na presença de diferentes concentrações de Rs4 (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 μ M). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas. 83

Figura 32. Perfis representativos de recaptação de diferentes neurotransmissores em seus transportadores específicos: (DAT) Transportador de dopamina, (SERT) transportador de serotonina, (NET) transportador de norepinefrina, (GAT) transportador de GABA e (Glyt) transportador de glicina, na presença de diferentes concentrações de Rs5 (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 μ M). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas. 84

Figura 33. Perfis representativos de recaptação de diferentes neurotransmissores em seus transportadores específicos: (DAT) Transportador de dopamina, (SERT) transportador de serotonina, (NET) transportador de norepinefrina, (GAT) transportador de GABA e (Glyt) transportador de glicina, na presença de diferentes concentrações de BAC (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 μ M). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas. 85

Figura 34. Comportamentos apresentados por animais tratados com Rs3. (AL) auto limpeza, (E) elevação, (P) tempo de permanência parado, (EXP) tempo gasto em comportamento exploratório (A) tempo gasto nos braços abertos e (F) tempo gasto nos braços fechados. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, (*) $p < 0,05$ alteração significativa em relação ao grupo salina. 87

Figura 35. Comportamentos apresentados por animais tratados com Rs5. (AL) auto limpeza, (E) elevação, (P) tempo de permanência parado, (EXP) tempo gasto em comportamento exploratório (A) tempo gasto nos braços abertos e (F) tempo gasto nos braços fechados. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, (*) $p < 0,05$ alteração significativa em comparação com o grupo salina. 88

Figura 36. Tempo gasto na área clara em grupos não tratados (salina) e tratados com diferentes doses das frações Rs3 (0,5 e 1,0 μ g) e Rs5 (1,0 e 2,0 μ g). Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando (*) $p < 0,05$ alteração significativa em comparação ao grupo NAIVE. 89

- Figura 37:** Avaliação comportamental em ensaios de medo contextual em grupos não tratados (salina) e tratados com a fração Rs3 (1,0 µg). Os dados apresentados correspondem às 3 fases do ensaio: condicionamento, extinção e ensaio propriamente dito. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de duas vias Os números entre parênteses representam o número de animais utilizados. 90
- Figura 38:** Avaliação comportamental em ensaios de medo contextual em grupos não tratados (salina) e tratados com a fração Rs5 (2,0 µg). Os dados apresentados correspondem às 3 fases do ensaio: condicionamento, extinção e ensaio propriamente dito. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de duas vias Os números entre parênteses representam o número de animais utilizados. 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Toxinas extraídas de glândulas da pele de sapos da Família Bufonidae	8
Tabela 2. Modificações de alguns substituintes a partir da molécula de bufalina, mostrando a variedade de compostos presentes no veneno de sapos da família Bufonidae	11
Tabela 3. Drogas utilizadas nos ensaios para a avaliação da ação anticonvulsivante da bufalina adquirida comercialmente e a Rs3, e as respectivas concentrações e vias de administração.	32
Tabela 4. Classificação de crises límbicas. Utilizada na avaliação de crises convulsivas induzidas por NMDA, segundo o índice de Racine (1972).	32
Tabela 5. Descrição dos grupos experimentais e as concentrações de Rs5 utilizadas para o tratamento.	34
Tabela 6. Moléculas identificadas na fração de baixa molar do veneno de <i>Rhinella schneideri</i> e seus respectivos tempos de retenção e massa molar.	54
Tabela 7. Avaliação da ação anticonvulsivante da bufalina adquirida comercialmente (BAC)	60
Tabela 8. Atividade das frações Rs3, Rs4 e Rs5 e também da BAC sobre transportadores de neurotransmissores.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
Ach	Acetilcolina
BAC	Bufalina adquirida comercialmente
BSA	Albumina do soro bovino
CBZ	Carbamazepina
CD	Dose convulsivante
CG	Cromatografia gasosa
CLAE – FR	Cromatografia líquida de alta eficiência – fase reversa
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
ED	Dose efetiva
ESI	Interface eletrospray
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
IC	Concentração inibitória
i.c.v.	Intracrânio ventricular
i.p.	Intraperitoneal
MS	Espectrometria de Massas

NMDA	N-metil-D-aspartato
PTZ	Pentilenotetrazol
PILO	Pilocarpina
SE	<i>Status Epilecticus</i>
TFA	Ácido trifluor acético
VRs	Veneno de <i>Rhinella schneideri</i>
DAT	Transportador de Dopamina
NET	Transportador de Noradrenalina
SERT	Transportador de Serotonina
GAT – 1	Subtipo de Transportador de GABA 1
Glyt-1	Subtipo de Transportador de Glicina 1
LCE	Labirinto em Cruz Elevado

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Estrutura das toxinas	9
1.2. Envenenamento e ação de toxinas	12
1.3. Epilepsia e Ansiedade	14
1.4. Ações de Esteroides, Heterosídeos Cardiotônicos e Venenos Animais e de Plantas sobre o Sistema Nervoso	17
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Material	26
3.1.1. Veneno	26
3.1.2. Drogas	27
3.1.3. Animais	27
3.2. Métodos	28
3.2.1. Filtração do veneno bruto	28
3.2.2. Cromatografia em fase reversa em sistema CLAE	28
3.2.3. Identificação da bufalina na fração de baixa massa molecular por CLAE	29
3.2.4. Cromatografia gasosa seguida por espectrometria de massas (CG/MS)	30
3.2.5. Espectrometria de massas	30
3.2.6. Atividade anticonvulsivante em modelos de crise aguda envolvendo a BAC.	31
3.2.6.1. Cirurgia	31
3.2.6.2. Atividade anticonvulsivante em modelos de indução de crise aguda	31
3.2.6.3. Análise Estatística	33
3.2.7. Avaliação histológica para caracterização da ação neuroprotetora da Rs5 em ensaios agudos in vivo.	33
3.2.7.1. SE induzido por pilocarpina	33
3.2.7.2. Tratamentos	34
3.2.7.3. Eutanásia e Perfusão	34
3.2.7.4. Extração dos encéfalos e processamento histológico	35
3.2.7.5. Técnica de coloração de Nissl com cresil violeta	35

3.2.7.6. Aquisição das imagens do tecido cerebral	36
3.2.7.7. Análise quantitativa do dano neuronal – Nissl	37
3.2.7.8. Análise estatística	38
3.2.8. Avaliação do potencial neuroprotetor em ensaios utilizando mitocôndrias isoladas para avaliações de alterações diretas em sua bioenergética	38
3.2.8.1. Isolamento de mitocôndrias	38
3.2.8.2. Determinação dos níveis mitocondriais de ATP	39
3.2.8.3. Determinação do potencial de membrana mitocondrial	39
3.2.8.4. Inchamento mitocondrial	40
3.2.8.5. Movimentação e Liberação de Ca^{2+}	40
3.2.8.6. Análise estatística	40
3.2.9. Avaliação in vitro dos efeitos das frações Rs3, Rs4 e Rs5 e BAC nos transportadores de neurotransmissores (glutamato, serotonina, dopamina, noradrenalina, GABA e glicina)	41
3.2.9.1. Linhagens celulares	41
3.2.9.2. Cultura celular e preparo das células para ensaios de caracterização farmacológica	41
3.2.9.3. Ensaios dose-resposta de Rs3, Rs4, Rs5 e BAC em vários transportadores de neurotransmissores	42
3.2.9.4. Análise estatística	42
3.2.10. Avaliação do potencial ansiolítico da Rs3 e Rs5 em modelos de claro/escuro e labirinto em cruz elevado.	43
3.2.10.1. Labirinto em cruz elevado	43
3.2.10.2. Caixa claro/escuro	44
3.2.11. Avaliação comportamental de ratos tratados com a Rs3 e Rs5 através de ensaios de medo contextual.	44
3.2.11.1. Ensaios de medo contextual	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. Extração e fracionamento do veneno	47
4.2. Purificação	48
4.3. Espectrometria de massas	51
4.4. CG/MS	52
4.4.1. CG/MS da fração de baixa massa molar e subfração Rs5	52
4.5. Avaliação da atividade anticonvulsivante em modelos de crise aguda envolvendo a BAC	59
4.6. Avaliação histológica para caracterização da ação neuroprotetora da Rs5 em ensaios agudos <i>in vivo</i> .	64
4.7. Avaliação de alterações mitocondriais na presença de toxinas do veneno de <i>Rhinella schneideri</i>	69
4.7.1 Determinação dos níveis mitocondriais de ATP	69
4.7.2 Potencial de membrana mitocondrial	71
4.7.3 Inchamento mitocondrial	72

4.7.4 Movimentação e Liberação de Ca^{2+}	73
4.8. Avaliação in vitro dos efeitos das frações Rs3, Rs4 e Rs5 e BAC nos transportadores de neurotransmissores (glutamato, serotonina, dopamina, e noradrenalina, GABA e glicina).	75
4.8.1. Ensaios de recaptação para avaliar os efeitos dose-resposta de Rs3, Rs4, Rs5 e BAC em vários transportadores de neurotransmissores	76
4.9. Avaliação do potencial ansiolítico da Rs3 e Rs5 em modelos de claro/escuro e labirinto em cruz elevado (LCE).	86
4.9.1. Labirinto em cruz elevado	86
4.9.2. Caixa claro/escuro	88
4.10. Avaliação comportamental de ratos tratados com a Rs3 e Rs5 através de ensaios de medo contextual	89
5. CONCLUSÕES	92
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade os produtos naturais têm fornecido moléculas para as preparações medicinais. Plantas e animais são fontes de uma variedade imensurável de princípios ativos que ainda hoje continuam sendo utilizados em ensaios clínicos (HARVEY, et al., 2015).

Em todo o mundo as pesquisas por novas moléculas derivadas de produtos naturais estão muito avançadas, podendo-se observar um grande número de patentes envolvendo venenos e toxinas animais. Dados encontrados na Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI) demonstraram 1608 pedidos de patente contendo a palavra "veneno", publicados a partir de março 1975 a dezembro de 2014 (ALMEIDA et al., 2015).

Grande parte do conhecimento sobre o arsenal químico encontrado na natureza advém do convívio com povos primitivos e indígenas, que sempre fizeram uso de substâncias tóxicas e farmacologicamente ativas, tanto para fins bélicos como medicamentosos. Este conhecimento etnofarmacológico trouxe grandes contribuições para as pesquisas de produtos naturais (VIEGAS et al., 2006).

A adaptação e sobrevivência das espécies foram alcançadas devido às mutações sofridas ao longo de suas histórias evolutivas, que proporcionaram alterações favoráveis em sua fisiologia. Neste sentido, pode-se comparar a natureza com um grande laboratório de experiências que promove mecanismos de sobrevivência às espécies. Os animais peçonhentos e venenosos têm sido particularmente favorecidos por um arsenal de compostos bioquímicos, que lhes confere a habilidade de paralisar e/ou matar suas presas. Estes compostos, por sua vez, ativam seletivamente estruturas de diversos sistemas orgânicos das presas, incluindo o sistema nervoso. Quando inoculadas, as neurotoxinas de animais peçonhentos ativam ou bloqueiam um vasto espectro de receptores para neurotransmissores inibitórios e/ou excitatórios, transportadores, enzimas e, sobretudo, canais iônicos (MORTARI et al., 2007).

Toxinas animais, muitas vezes, não podem ser sintetizadas em função da complexidade de suas estruturas moleculares, sendo sua purificação e caracterização essencial para a descoberta de compostos com ações biológicas relevantes (KOEHN; CARTER, 2005). Desta forma, estas moléculas poderão ser

aplicadas na geração de novos agentes terapêuticos e/ou de ferramentas experimentais para a pesquisa básica e aplicada.

Uma das classes de animais mais estudadas é a Amphibia, com 7427 espécies catalogadas (AMPHIBIAWEB:<http://amphibiaweb.org>), que se distribuem em três ordens, as quais são denominadas de Caudata, Gymnophiona e Anura (FROST, 2015). Conhecem-se atualmente no Brasil 1026 espécies de anfíbios, dentre essas, 988 pertencem à ordem Anura, que esta dividida em 19 famílias e 87 gêneros. A ordem Caudata apresenta apenas uma família e um gênero contendo cinco espécies de salamandra. As 33 espécies de Cecílias, que se enquadram dentro da ordem Gymnophiona, estão divididas em 4 famílias e 12 gêneros (SBH, 2015). Os anfíbios se localizam principalmente em áreas tropicais e de climas úmidos (Fig. 1), e são encontrados em quase todas as partes do planeta, com exceção das áreas desérticas, mostrando sua dependência da água para a sobrevivência.

Figura 1. Distribuição global das espécies de anfíbios.

Na ordem Anura incluem-se os sapos, as rãs e as pererecas. Os sapos da família Bufonidae estão entre os mais tóxicos, sendo que no Brasil são encontradas 78 espécies, dentre elas a *Rhinella schneideri* (SAKATE; OLIVEIRA, 2000; SBH, 2015).

A espécie *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) (Fig. 2), também já chamada de *Chaunus schneideri*, *Bufo paracnemis* A. Lutz (1925) e *Bufo schneideri* Werner

(1894), é comumente encontrada nos pântanos do Chaco paraguaio e no Pantanal brasileiro. Esses sapos são animais venenosos e somente liberam o veneno quando suas glândulas são pressionadas, como por exemplo, em mordidas de cães ou acidentes com crianças. As toxinas em contato com a boca e/ou mucosa do predador são absorvidas e causam o envenenamento. Estes venenos são muitas vezes utilizados em práticas populares de cura (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2014).

O *Rhinella schneideri* apresenta uma cor cinza-esverdeado, com algumas manchas escuras no dorso, que não formam um desenho como na espécie *Rhinella marinus* (anteriormente denominada *Bufo marinus*), apresenta um dimorfismo sexual muito menos acentuado, tem um aspecto geral maior, sua cabeça é mais curta, suas glândulas parotoides menos salientes e, apesar de ter o mesmo comprimento, possui patas relativamente mais curtas. A face ventral é cinza esbranquiçada, salpicada de pequenas manchas escuras. O macho e a fêmea têm grandes papilas dorsais, largas e numerosas na parte mediana do dorso. O macho se distingue da fêmea por papilas da mesma natureza, mas um pouco mais abundantes e principalmente pela presença de um saco vocal, muito desenvolvido e cujos tegumentos são mais pigmentados do que o resto do ventre (BRAZIL; VELLARD, 1926).

Figura 2. *Rhinella schneideri* (Fonte: Laboratório de Toxinas Animais). Em (A) observa-se este animal em um local seco e em (B) ambiente aquático. Os sapos da espécie *Rhinella schneideri* apresentam adaptações para sobreviver nos dois ambientes.

Os anfíbios representam uma classe de transição entre os meios aquático e terrestre. Durante o processo evolutivo, eles desenvolveram um conjunto de adaptações morfofuncionais (principalmente em sua pele) e comportamentais, para garantir sua nova forma de vida. Eles surgiram no período Devoniano e se encontram em constante adaptação e evolução, inclusive em relação aos novos predadores que o novo ambiente passou a apresentar. Glândulas de veneno presentes nos anfíbios previamente existiam em peixes (TOLEDO; JARED, 1995).

Os vertebrados da ordem Anura ocupam amplos e variados habitats (Fig. 1) e, para isto, sofreram adaptações em relação aos seus ancestrais, dentre estas, a mais característica está em sua pele, que apresenta um elaborado sistema de glândulas cutâneas distribuídas por toda superfície corporal. Estas glândulas liberam substâncias com diferentes ações, desde a regulação das funções fisiológicas à proteção contra predadores ou microrganismos. Se esta proteção for removida, sua pele é facilmente infectada por fungos e bactérias em poucos dias (CLARKE, 1996).

As glândulas se dividem em dois tipos: as glândulas mucosas e as glândulas granulares (serosas ou venenosas), que possuem diferentes posições anatômicas e diferente constituição de secreção. As glândulas mucosas estão mais relacionadas com funções fisiológicas, como reprodução, defesa contra fungos e bactérias, respiração e dessecação, e encontram-se espalhadas por toda a pele do animal. Já as glândulas granulares produzem uma secreção repelente ou tóxica, representando uma das principais formas de defesa passiva do animal (TOLEDO; JARED, 1995).

Nos anfíbios, as glândulas serosas são divididas em vários grupos, de acordo com a região do corpo em que se localiza, como por exemplo, as parotoides (localizadas no dorso, imediatamente atrás do ouvido), lombares, e as peitorais. Esta disposição das glândulas cutâneas de veneno deve-se à necessidade de defesa contra os seus inimigos naturais, que tentam mordê-los ou engoli-los. Na espécie *R. schneideri*, geralmente essas glândulas parotoides contribuem também para uma intimidação do animal, já que se parecem com “grandes olhos”. Estas glândulas apresentam múltiplos poros visíveis, através dos quais o veneno leitoso ou amarelado, elaborado e acumulado em seu alvéolo, é ejetado (TOLEDO; JARED, 1995; BRAZIL; VELLARD, 1926).

Extraído das glândulas parotoides, o veneno de sapo possui o aspecto de um líquido espesso, leitoso ou cremoso, de cor branca (*Rhinella marinus*) ou amarela (*Rhinella schneideri*), de cheiro fortemente alício no *Bufo crucifer* e quase inodoro

nas outras espécies estudadas (BRAZIL; VELLARD, 1926). Já antes utilizado por indígenas como alucinógeno durante seus rituais, ou mesmo para a caça (WEIL; DAVIS, 1994; PHILIPPE; ANGENOT, 2005), o veneno de sapo ainda hoje é utilizado tradicionalmente por chineses, em drogas como ChanSu (conhecida pelos japoneses por Senso) e Yixin Wan, para o tratamento de doenças graves (XUE; ROY, 2003), tais como problemas cardíacos, expectorante, diurético, úlceras, dores em geral, vários tipos de câncer e até mesmo como remédio para dor de dente. No entanto, estes compostos podem causar envenenamento devido à alta concentração de bufotoxinas (CHI et al., 1998; YE; GUO, 2005a; ZHANG et al., 2005). Na cidade de Nova Iorque (NY, USA) houve uma epidemia de envenenamento quando um medicamento afrodisíaco chinês, conhecido como ChanSu, foi ingerido por seus usuários ao invés de ser aplicado topicamente. A bula, que explicava que seu uso era tópico, infelizmente estava escrito apenas em chinês (BARRUETO, 2006).

Os venenos dos anfíbios contêm uma variedade de compostos biologicamente ativos, os quais funcionam como ferramentas de defesa contra predação e/ou como agentes antimicrobianos (MEBS et al., 2005). As toxinas são produzidas em glândulas epidérmicas e parótidas, sendo que em mamíferos a ingestão destas substâncias induz intoxicação severa.

Dentre os compostos biologicamente ativos presentes, podem-se encontrar peptídeos, aminas biogênicas, esteroides e alcaloides (Fig. 3), que estão envolvidos na regulação das funções fisiológicas da pele, bem como em mecanismos de defesa contra predadores e microrganismos. Podem ser associados a essas moléculas efeitos neurotóxicos, cardiotoxicos, hemotóxicos e miotóxicos. Adicionalmente, elas podem provocar anestesia ou apresentar atividade hipotensora e/ou hipertensora (ANJOLETE, et al., 2015).

Bufadienólídeos e outras moléculas que apresentam estruturas derivadas ou muito semelhantes aos mesmos foram objetos de bioensaios, os quais demonstraram efeitos biológicos importantes, que estão relacionados à estrutura da molécula. Dentre esses ensaios estão os que avaliaram suas atividades antivirais (CUNHA-FILHO et al., 2010). Ensaios elaborados utilizando moléculas com estruturas semelhantes aos bufadienólídeos, de origem vegetal, animal ou quimicamente modificadas, mostraram uma atividade muito relevante em células cancerígenas incluindo as de leucemia humana HL-60 e HCT-8 (NOGAWA et al., 2001; YE et al., 2005b; WU et al., 2006). As atividades anticancerígenas são

amplamente estudadas devido ao relevante efeito que essa classe de moléculas produz em baixas concentrações, sendo observada a indução de apoptose em células tumorais (QI et al., 2011; FORNARI-BALDO et al., 2012).

Outra ação de interesse biotecnológico observada com componentes encontrados no veneno de sapo foi sobre os protozoários *Leishmania sp.* e *Trypanossoma cruzi*. Os parasitas apresentaram inibições de crescimento e até mesmo morte ao serem expostos a estas moléculas (TEMPONE et al., 2008).

Bufadienólídeos isolados do veneno de *Rhinella schneideri* demonstraram ações sobre o sistema nervoso central com potencial de inibição de crises convulsivas induzidas por Pentilenotetrazol (PTZ) e N-metil-D-aspartato (NMDA) (BALDO et al., 2012).

Figura 3. Compostos biologicamente ativos encontrados nos venenos de sapos. Pode-se observar moléculas esteroidais como a bufalina, aminas biogênicas como a serotonina, alcaloides como a bufotenina e peptídeos como a α Aureina.

Alguns bufadienolídeos isolados de glândulas da pele de sapos da família Bufonidae estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Toxinas extraídas de glândulas da pele de sapos da Família Bufonidae.

<i>Toxinas</i>	<i>Toxinas</i>
Arenobufagenina	Cinobufotalitoxina
Arenobufagenina hemisuberata	Desacetilcinobufotalina
Arenobufatoxina	Gamabufotalina
Argentinogenina	Gamabufotalitoxina
Bufalina	Hellebrigenina
Bufalina hemisuberata	Hellebritoxina
Bufalitoxina	Marinobufagina
Bufotalina	Ácido Marinóico
Bufotalinina	Marinosina
Bufotalona	Resibufagina
Cinobufagenina	Resibufagenol
Cinobufagenina hemisuberata	Resibufagenina
Cinobufagina	Resibufotoxina
Cinobufotoxina	Telocinobufagenina
Cinobufotalina	Vulgarobufotoxina

Referência: Steyn e Heerden, 1998.

Uma das características do veneno de sapo é a sua resistência aos agentes físico-químicos mais enérgicos, que o difere de outros venenos de origem animal, tais como o das serpentes, escorpiões e aranhas, que são facilmente destruídos ou alterados por agentes externos. Este veneno resiste à luz, ao calor e a reagentes químicos como os ácidos fortes, álcool, éter, acetona, clorofórmio, e mesmo a outros mais comuns como água oxigenada, tintura de iodo, solução de hipossulfito de sódio a 50%, solução deci-normal de soda e solução de nitrato de prata (BRAZIL; VELLARD, 1926). Porém, o anel lactônico contido nessas moléculas pode se abrir facilmente dependendo do solvente, principalmente em meio básico (LAMBERTON et al., 1985).

As soluções concentradas ou diluídas do veneno podem ser esterilizadas a 120°C em autoclave sem que sofram a mínima diminuição de atividade. O veneno em óleo de oliva resiste, sem modificação de atividade, à temperatura de ebulição de

160°C. Sob a influência da luz, as soluções aquosas escurecem lentamente, tomando uma coloração pardacenta, sem que, entretanto, haja modificação das suas propriedades tóxicas. A glicerina e a formalina não exercem influência alguma sobre a sua toxicidade (BRAZIL; VELLARD, 1926).

1.1. Estrutura das toxinas

As moléculas denominadas glicosídeos cardíacos (Fig. 4), tais como os bufadienolídeos e os cardenolídeos, apresentam atividades biológicas semelhantes, ou seja, ambos potencializam a força de contração do coração, por inibirem a enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ (STEYN; HEERDEN, 1998). A diferença entre os cardenolídeos e os bufadienolídeos está na natureza da porção lactona, que é o substituinte do C-17 do núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig. 4), conhecido também como núcleo esteroidal, o qual é considerado o grupamento farmacofórico da molécula. Os cardenolídeos apresentam uma butirolactona, que é um anel de cinco membros insaturado, enquanto os bufadienolídeos contem um anel de seis membros, denominado anel pirona, também insaturado. Diferente dos hormônios sexuais, mineralcorticoides e glicocorticoides, que apresentam a ligação entre os anéis A/B e C/D em posição *trans*, os glicosídeos cardíacos a apresentam na configuração *cis* (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Figura 4. Esquema representando a estrutura química dos heterosídeos cardiotônicos. Pode-se observar na parte superior da figura o exemplo de uma molécula completa, apresentando três constituintes: o glicosídeo, o núcleo esteroidal e o anel lactônico. O anel lactônico de cardenolídeos provenientes de plantas contém 5 átomos, mas nos bufadienolídeos obtidos de anfíbios o anel lactônico apresenta 6 átomos, como apresentado acima (grupo R). Pode-se observar também que estruturas contendo apenas o anel lactônico e o núcleo esteroidal (sem o açúcar) formam a parte aglicona ou genina da molécula. O exemplo apresentado é a bufalina.

Os bufadienolídeos e as bufotoxinas estão presentes nas secreções das glândulas mucosas e glândulas granulares de sapos do gênero *Rhinella*, sendo que estas moléculas não ocorrem somente na forma geninas, mas várias ligações no C-3 são conhecidas, tais como sulfatos, ésteres dicarboxílicos e aminoácidos. Existe uma variedade muito grande de moléculas geradas por modificações químicas dos substituintes do núcleo esteroidal (STEYN; HEERDEN, 1998), como no caso da molécula de bufalina (Fig. 5), que pode ser utilizada para sintetizar diferentes compostos.

Figura 5. Molécula de bufalina

Utilizando a estrutura química da bufalina e alterando alguns substituintes, diferentes toxinas são geradas. Alguns destes compostos encontrados em venenos de animais da classe Bufonidae estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Modificações de alguns substituintes a partir da molécula de bufalina, mostrando a variedade de compostos presentes no veneno de sapos da família *Bufonidae*.

<i>Molécula</i>	<i>RI</i>	<i>RII</i>	<i>RIII</i>
Telocinobufagenina	C-5 = OH	-	-
Helebrigenina	C-5 = OH	C-19 = CHO	-
Marinobufagenina	C-5 = OH	C-14/C-15 = O	-
Arenobufagenina	C-3 = β -OH/H	C-11 = OH	C-12 = O
Marinosina	C-5 = OH	C-11/C-19 = O	C-19 = CHO
Cinobufagina	C-16 = C ₂ H ₃ O	-	-

As modificações estruturais promovidas em algumas partes da molécula de bufalina podem aumentar ou reduzir sua atividade citotóxica em células de carcinoma de fígado primário PLC/PRF/5 (KAMANO et al., 1998). Por exemplo, a introdução de grupamento aldeído no carbono 19 ou uma hidroxila na posição α no carbono 11 aumentam a atividade. Outras modificações podem ser observadas na Figura 6.

Figura 6. A molécula de bufalina pode ser submetida a algumas modificações em sua estrutura, que irão aumentar ou diminuir a sua atividade citotóxica. Em verde estão as modificações que fazem com que a molécula tenha sua atividade aumentada, e em vermelho, as modificações que fazem com que a molécula tenha sua atividade diminuída. Adaptado de Kamano et al., 1998.

1.2. Envenenamento e ação de toxinas

O envenenamento pelo contato com o animal é extremamente raro, exceto quando a secreção ou o próprio animal é ingerido, pois o mesmo só surte efeito em contato com feridas ou mucosas do agressor (como boca e olhos), visto que eles liberam suas secreções somente quando suas glândulas são comprimidas. Contudo, a segunda geração de anfíbios nascidos em cativeiro perde sua capacidade de produzir toxinas e os animais tornam-se totalmente não-tóxicos, pois todas as toxinas são produzidas através de precursores encontrados na dieta do animal (DALY et al., 1997), o que explica a considerável variação da toxicidade dos sapos nas diferentes localizações geográficas.

Os sapos da família *Bufo* são considerados generalistas em relação a sua alimentação, sendo que estudos realizados com a espécie *Rhinella schneideri*, pertencente à região do cerrado brasileiro, demonstraram que eles se alimentam especialmente de larvas de insetos, besouros e formigas, devido a facilidade e disponibilidade desses animais nessa região (BATISTA et al., 2011).

Quanto ao processo de biotransformação das moléculas ingeridas por anfíbios, pode-se dizer que existem outros fatores que os ajudam nesses processos de metabolização, como microrganismos presentes em suas glândulas (HAYES et al., 2009).

O envenenamento por toxinas de sapos manifesta-se primariamente por sintomas digitálicos-símile, efeitos cardioativos que resultam em bradicardia, diferentes graus de bloqueio atrioventricular, taquicardia ventricular, fibrilação ventricular e morte súbita (CHI et al., 1998). Como resposta ao envenenamento, geralmente, o organismo responde de forma a tentar eliminar pelo menos parte do veneno, o que poderia levar a uma diminuição da intoxicação. Dentre as respostas fisiológicas ao envenenamento podem ser citadas: irritação da mucosa, vômito, salivação e muitas vezes diarreia (KNOWLES, 1968; BEDFORD, 1974).

As toxinas dos anfíbios são bem estudadas, mas são escassos os trabalhos sobre espécies brasileiras de sapo. Estas toxinas apresentam ações farmacológicas variadas, como cardiotoxicidade, miotoxicidade, neurotoxicidade, hemotoxicidade, ações colinomimética, simpatomimética, anestésica, vasoconstritora, hipotensiva e antibiótica (HABERMEHL, 1981). As principais toxinas do veneno bruto de sapos são classificadas em dois grupos: derivados esteroides e compostos básicos. No primeiro grupo estão os bufadienolídeos e as bufotoxinas; no segundo, as aminas biogênicas e as bufoteninas. Os derivados esteroides são os responsáveis pelos efeitos cardiotóxicos, com ação digitálicos-símile, e os compostos básicos agem no sistema nervoso autônomo simpático e no sistema nervoso central (BICUDO, 2003).

Rhinella schneideri é uma espécie dentro da família Bufonidae e assim, bufadienolídeos já foram extraídos do seu veneno (ZELNIK et al., 1963).

Os glicosídeos cardíacos têm sido utilizados há séculos como agentes terapêuticos. Estes compostos possuem um núcleo esteroidal contendo lactona insaturada na posição C-17 e uma ou mais (1 a 4) unidades de oses ligadas ao oxigênio da hidroxila com orientação β no C-3. Quando a glicose está presente, encontra-se na posição terminal da molécula (SIMÕES et al., 1999).

Os glicosídeos cardíacos são encontrados em muitas plantas e nas secreções glandulares de várias espécies de sapos, em geral atuando para a proteção contra predadores. Todos glicosídeos cardíacos são inibidores potentes e altamente seletivos do transporte ativo de Na^+ e K^+ através de membranas celulares, ligando-se a um local específico na superfície extracitoplasmática da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (KELLY;

SMITH, 1996). Dentre os compostos presentes no veneno de sapos, as bufogeninas e bufotoxinas, derivadas do colesterol, possuem propriedades que alteram o funcionamento normal do coração, aumentando a força do batimento cardíaco e diminuindo seu ritmo (CLARKE, 1996). Estes esteroides possuem efeito cardíaco similar aos glicosídeos encontrados em plantas. Uma só gota deste veneno, depositada diretamente sobre o coração do *Bufo sp.* ou de um sapo do gênero *Leptodactylus*, provoca imediatamente violentas contrações do ventrículo (BRAZIL, V.; VELLARD, 1926).

Foram descritas substâncias extraídas das glândulas parotóides de *Rhinella marinus* que contém fatores endógenos semelhantes ao da digoxina, diferentes da bufalina, porém exercendo os mesmos efeitos cardioativos como, por exemplo, vasoconstrição via mecanismo noradrenérgico, e inibição direta da bomba de sódio e potássio no sistema vascular (BAGROV et al., 1993).

Os glicosídeos cardíacos, especialmente a ouabaína, são considerados drogas inibidoras específicas da atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPásica}$. Por este motivo, a técnica clássica de dosagem $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPásica}$ utiliza a diferença entre a dosagem da atividade ATPásica total e da fração inibida pela ouabaína (IBRAHIM, 1997).

Alguns glicosídeos cardíacos inibidores da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ demonstraram ações neuroprotetoras, tendo como destaque a molécula neriifolina. Essas ações foram registradas contra Isquemia Neonatal induzida por hipóxia. Outras moléculas de glicosídeos cardíacos também demonstraram ações neuroprotetoras (WANG et al., 2006). Estes estudos indicam que a busca de substâncias neuroativas nas secreções de sapos pode resultar na identificação de novos componentes com potencial aplicação como medicamento ou como ferramenta molecular para o estudo de sistemas biológicos.

1.3. Epilepsia e Ansiedade

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2015) a epilepsia é uma doença que atinge cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. Nos dias atuais, a proporção estimada da população que apresenta crises convulsivas com necessidade de tratamento é de 4 a 10 pessoas a cada 1000. Estima-se que 2,4 milhões de pessoas são diagnosticadas com epilepsia a cada ano.

Pacientes diagnosticados com epilepsia apresentam grandes alterações na concentração de neurotransmissores como ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato, noradrenalina e serotonina, e estas alterações podem acarretar outros tipos de doenças como distúrbios do humor e depressão (WANDA et al., 2015).

As síndromes epiléticas se dividem em duas grandes categorias: crises generalizadas e crises parciais. Nas crises generalizadas os disparos das crises convulsivas iniciam-se nos dois hemisférios cerebrais simultaneamente. Já nas crises parciais ocorrem em um ou mais pontos isolados no cérebro (CHANG; LOWENSTEIN, 2003).

A atividade anticonvulsivante pode ser obtida através da modificação das propriedades de transmissão de neurônios, reduzindo a sua sincronização. A inibição de crises convulsivas pode ser conseguida com o uso de drogas que apresentam diversos mecanismos de ação. Para ser eficiente a droga anticonvulsivante poderá atuar de três maneiras diferentes: (1) modulando canais iônicos dependentes de voltagem, (2) aumentando a inibição sináptica, (3) inibindo a excitação sináptica (STEFAN; FEUERSTEIN, 2007).

O arsenal terapêutico de drogas antiepiléticas se divide em primeira, segunda e terceira gerações. Exemplos de drogas de primeira geração são carbamazepina, clobazam, clonazepam, etosuximida, fenobarbital, fenitoína, sultiam e ácido valproico. Como drogas de segunda geração apresentam-se felbamato, gabapentina, lamotrigina, levetiracetam, oxcarbazepina, pregabalina, tiagabina, topiramato, vigabatrina, zonisamida. As drogas mais recentemente aprovadas são conhecidas como novas drogas antiepiléticas de terceira geração, e essa classe inclui acetato de eslicarbazepina, lacosamida, perampanel, retigabina, rufinamida, e estiripentol (ROSATI et al., 2015).

Para o sucesso do tratamento da epilepsia, a modulação dos canais iônicos voltagem dependentes pode ser realizada utilizando alguns fármacos clássicos antiepiléticos como a fenitoína, valproato de sódio e carbamazepina. Esses fármacos apresentam como principal mecanismo de ação o bloqueio de canais para Na^+ voltagem dependentes. Existem também drogas que atuam em canais para Ca^{+2} voltagem dependentes, como a lamotrigina e etosuximida (COGNATO et al., 2007; ROGAWSKI, 2002).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos. Porém o L-glutamato tem sido implicado em importantes

condições patológicas como isquemia cerebral, esclerose lateral amiotrófica, epilepsia, doença de Alzheimer e Doença de Huntington (FONTANA et al., 2003; MATHEWS et al., 2012).

Altas concentrações extracelulares de glutamato podem levar a toxicidade do sistema nervoso central. Sendo assim, diminuir essas concentrações é essencial para a proteção contra patologias excitatórias do sistema nervoso central. Para a regulação das concentrações extracelulares de glutamato, cinco subtipos de transportadores dependentes de sódio são descritos: (1) transportador de glutamato e aspartato GLAST ou EAAT1; (2) GLT-1 ou EAAT2, predominantemente em astrócitos; (3) EAAC1 ou EAAT3 em neurônios; (4) EAAT4 em cerebelo e Células de Purkinje e (5) EAAT5 na retina (FONTANA et al., 2007; KESSLER, 2013).

Contrastando com o glutamato, o ácido gama-aminobutírico (GABA), apresenta como receptores o GABA_A e o GABA_B, que causam a hiperpolarização das membranas dos neurônios, fazendo com que ocorra uma diminuição dos impulsos nervosos (ISAACSON; SCANZIANI, 2011).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central de mamíferos e desempenha um papel fundamental na regulação da transmissão neuronal em todo o cérebro, afetando numerosos processos fisiológicos e psicológicos. Alterações nos níveis de GABA podem provocar desequilíbrio entre os sinais excitatórios e inibitórios, e estão envolvidas no desenvolvimento de vários distúrbios neuropsiquiátricos. Os receptores GABAérgicos são alvos de muitas drogas que são amplamente utilizadas no tratamento de desordem de ansiedade, epilepsia, insônia, espasticidade, comportamentos agressivos e outros estados fisiopatológicos (SHETTY, 2014; JEMBREK; VLAINIĆ, 2015).

O desenvolvimento de novas terapias que envolvam o sistema GABAérgico poderão ser efetivas no tratamento de várias doenças além da epilepsia e ansiedade, tais como esquizofrenia, dor neuropática e as doenças de Alzheimer e Parkinson. Terapias clássicas envolvendo a potencialização GABAérgica podem ser observadas quando se faz uso de barbitúricos e benzodiazepínicos (KIM et al., 2014; GALVEZ et al., 2015; SHETTY; BATESA, 2015).

A ansiedade é uma das principais doenças psiquiátricas da atualidade, e está ligada ao modo cada vez mais complicado de vida das pessoas na sociedade, apresentando grande importância como doença incapacitante. Os sintomas associados a essa doença são: inquietação, cansaço, dificuldades em concentrar,

irritabilidade, tensão muscular e insônia (JUNG et al., 2002; RAVINDRAN; STEIN, 2010). Essa patologia é dividida em vários distúrbios que são classificados em categorias como: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno do pânico, fobia, transtorno de ansiedade social (também conhecido como fobia social), transtorno do estresse pós-traumático, e transtorno obsessivo-compulsivo (TOC). Para o tratamento existe uma combinação entre abordagens psicológicas e farmacológicas, podendo ser de curto ou longo prazo, o que dificulta a adesão (BALDWIN et al., 2014).

As monoaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina e serotonina) estão envolvidas diretamente com patologias relacionadas a distúrbios psiquiátricos como a depressão, esquizofrenia e a ansiedade. Essas patologias estão ligadas com deficiências ou excessos desses neurotransmissores, alterando as transmissões sinápticas e resultando em respostas comportamentais diferenciadas. Alterações na concentração desses neurotransmissores também podem causar epilepsia (NG et al., 2015).

Os tratamentos desenvolvidos hoje em dia estão relacionados a uma variedade de drogas muito grande, que envolve além da classe ansiolítica, drogas antidepressivas, antiepiléticas e beta-bloqueadores. Os benzodiazepínicos se enquadram dentro da classe dos ansiolíticos que potencializam ações GABAérgicas atuando em GABA_A. Os antidepressivos desenvolvem ação inibitória em transportadores responsáveis pela recaptação de serotonina e transportadores de recaptação de serotonina e noradrenalina (FARACH et al., 2012).

1.4. Ações de Esteroides, Heterosídeos Cardiotônicos e Venenos Animais e de Plantas sobre o Sistema Nervoso

Os venenos de sapo apresentam uma grande quantidade de moléculas em sua constituição, que são produzidas por glândulas em sua pele. Muitas dessas moléculas são derivadas de esteroides, sendo classificadas como heterosídeos cardiotônicos e apresentam um grande poder cardiotóxico. Essa ação ocorre devido a sua afinidade pela enzima Na⁺K⁺ATPase (ROSTELATO-FERREIRA et al., 2014).

Além de enzimas, outros alvos biológicos são importantes por desencadearem reações sistêmicas. As toxinas animais foram selecionadas por um longo processo evolutivo para atingir alvos essenciais à manutenção da vida, tais

como receptores e canais iônicos. Desta maneira, além de heterosídeos cardiotônicos, o veneno de sapo apresenta em sua composição alguns esteroides e certos tipos de alcaloides que podem estar relacionados com sua ação neurotóxica (RASH et al., 2011).

Alcaloides (termo linguisticamente derivado da palavra árabe *alquali*, denominação vulgar da planta da qual a soda foi originalmente obtida) são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos e são encontrados predominantemente nas Angiospermas. Na sua grande maioria, possuem caráter alcalino, com exceções como colchicina, piperina, oxinas e alguns sais quaternários como o cloridrato de laurifólia (KUTCHAN, 1995; EVANS, 1996).

Alcaloides esteroidais também são frequentemente observados em estudos com venenos de sapos. Estes apresentam aminoácidos como seus precursores, principalmente os aromáticos. Um bom exemplo é a morfina, um alcaloide originado de plantas, mas que apresenta como base de sua gênese os aminoácidos, assim como outras substâncias com intensa atividade biológica. A batracotoxina é um exemplo destes alcaloides encontrados nas secreções de sapos (BARRAVIERA, 1994). Além desses, também são encontrados diversos núcleos diferenciados de alcaloides com ações neurotóxicas por inibição de canais iônicos. Dentre eles podemos citar os pirrolidínicos e piperidínicos (DALY et al., 2005).

Os canais iônicos pertencem a uma superfamília de proteínas formadoras de poros (CATTERALL et al., 2007). Estas estruturas são fundamentais para sinalização elétrica entre células excitáveis e homeostase intra e/ou extracelular, participando de processos celulares vitais sendo, portanto, alvos moleculares para diversas neurotoxinas (DENAC et al., 2000; CATTERALL et al., 2007).

A membrana celular mantém o meio interno da célula separado e isolado do meio externo garantindo uma concentração iônica que favorece os processos metabólicos (DENAC et al., 2000). Fluxos iônicos ocorrem quando há abertura de canais permeáveis aos íons de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} ou Cl^- , sendo estes fenômenos ativados por um ligante (canais iônicos dependentes de ligantes); pela alteração no potencial de membrana (canais iônicos dependentes de voltagem) ou por estímulo mecânico. Neste intricado balanço iônico, pequenas alterações podem desencadear repostas adaptativas ou condições patológicas (LEWIS; GARCIA, 2003; GARCIA, 2004).

Devido à grande afinidade e seletividade de algumas neurotoxinas para tipos específicos de canais iônicos, estas moléculas têm sido utilizadas para caracterização de aspectos farmacológicos, fisiológicos e bioquímicos de vários tipos de canais. Devido às interações que realizam com diferentes alvos, estes compostos são ferramentas úteis tanto no estudo de mecanismos de transmissão sináptica, como no estudo e desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de doenças neurológicas, como as epilepsias, doença de Parkinson, Huntington, Alzheimer e isquemia (MORTARI et al., 2007).

A presença de heterosídeos cardiotônicos endógenos em seres humanos foi demonstrada e verificou-se que suas concentrações estavam alteradas em algumas condições patológicas (BAGROV et al., 2009).

Bufadienólídeos extraídos do ChanSu, um medicamento da medicina tradicional chinesa, demonstraram atividades em canais iônicos de neurônios isolados do hipocampo. Canais para sódio voltagem dependentes foram alterados pela ação da resino bufagina (HAO et al., 2011a). Canais para potássio também foram analisados e também sofreram alterações por dois bufadienólídeos, a resino bufagina e a cinobufagina (HAO et al., 2011b).

O ChanSu apresenta três bufadienólídeos em maior concentração: bufalina, cinobufagina e resibufogenina. Esta droga apresenta propriedades anestésicas, analgésicas, e ativa o sistema respiratório. Dentre outras ações, os bufadienólídeos exibem muitos efeitos farmacológicos e tóxicos sobre o sistema nervoso periférico e central (WANG et al., 2014).

O extrato metanólico do veneno da espécie *Rhinella schneideri*, demonstrou ter ações pré-sinápticas, pois ao ser adicionado em preparações neuromusculares, aumentou a força de contração em diafragma de ratos e pintainhos, efeito que sugere um aumento da liberação de neurotransmissores (ROSTELATO-FERREIRA et al., 2011; ROSTELATO-FERREIRA et al., 2014).

Moléculas esteroidais são alvos de estudos recentes e tem demonstrado eficácia em modular a transmissão sináptica e os impulsos nervosos, pois modificam a excitabilidade dos neurônios atuando diretamente na membrana de canais iônicos. Esses efeitos podem ser observados com metabólitos da progesterona: pregnanolona (5 β -pregnan-3 α -ol-20-ona) e alopregnanolona (5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona), que atuam em GABA_A, mostrando uma acentuada ação antiepilética, ansiolítica e sedativa (KOKATE et al., 1999).

As ações antiepilética e ansiolítica podem também ser observadas ao se utilizar venenos animais que apresentam a capacidade de produzir efeitos sobre o sistema nervoso. Ações da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* sobre alvos no sistema nervoso central produziu efeitos ansiolíticos e antiepilépticos (LIBERATO et al., 2006).

Em outros estudos, foram observados que moléculas de poliaminas extraídas de aranhas, interagem com receptores de *L*-glutamato, particularmente com os ionotrópicos, atuando como antagonistas destes receptores (BELEBONI et al., 2004; STROMGAARD et al., 2005). Isto não é surpresa uma vez que antagonizam a transmissão glutamatérgica da junção neuromuscular de insetos (MELLOR; USHERWOOD, 2004).

Os receptores de NMDA estão estreitamente relacionados com disfunções neurológicas. Tais receptores apresentam sítios para ligação de moléculas, as quais atuam como moduladores destes receptores.

Uma vez que alterações na neurotransmissão glutamatérgica estão relacionadas com doenças neurológicas, moléculas que interferem com este sistema são estruturas potenciais para prospecção de novas drogas. Estas podem ser ensaiadas *in vivo*, utilizando-se modelos neuroetológicos, os quais podem servir de base para o entendimento e tratamento dessas doenças. A interação de toxinas com algum alvo neuronal pode também apresentar efeitos anticonvulsivantes (CAIRRÃO et al., 2002).

Ensaio realizados com camundongos tratados com extratos de *Nerium oleander*, vegetal que apresenta heterosídeos cardiotônicos como principal classe de metabólitos secundários, demonstraram que o tempo para os animais desencadearem crise convulsiva induzida por Pentilenotetrazol (PTZ) diminuiu em relação ao controle. Porém, o tempo de crise também foi menor, demonstrando que o extrato deve possuir alguma molécula com ação neuroprotetora (SINGHAL; GUPTA, 2011).

Segundo Baldo (2010), moléculas extraídas do veneno de *Rhinella schneideri*, foram capazes de inibir crises convulsivas induzidas por PTZ (antagonista não-competitivo de GABA_A) e NMDA (agonista do receptor de glutamato NMDA), indicando a ação anticonvulsivante das mesmas. Portanto, considerando a relevância das atividades biológicas dos componentes presentes em venenos de sapos e os resultados obtidos por Baldo (2010), o presente trabalho visa à

caracterização estrutural e a avaliação da ação neurofarmacológica de substâncias isoladas do veneno de *Rhinella schneideri*.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O projeto tem como objetivo geral a caracterização estrutural e neurofarmacológica das frações Rs3, Rs4 e Rs5 obtidas do veneno de *Rhinella schneideri* que apresentaram, em estudos prévios do grupo (Baldo (2010), importante ação protetora sobre crises convulsivas induzidas por PTZ e NMDA em ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtenção das frações Rs3, Rs4 e Rs5 presentes no veneno de *Rhinella schneideri*.
2. Caracterização estrutural das moléculas isoladas por fragmentação molecular em ensaios de espectrometria de massas.
3. Avaliação histológica de encéfalos de ratos para caracterizar a ação neuroprotetora da Rs5 em ensaios agudos *in vivo*.
4. Avaliação do potencial neuroprotetor da Rs5 em ensaios utilizando mitocôndrias isoladas, para identificar alterações diretas em sua bioenergética.
5. Avaliação do potencial de recaptação do glutamato e de outros neurotransmissores por células COS-7e MDCK na presença das frações Rs3, Rs4 e Rs5.
6. Avaliação do potencial ansiolítico da Rs5 em modelos de claro/escuro e labirinto em cruz elevado.
7. Avaliação comportamental de animais tratados com a Rs5 através de ensaios de medo condicionado.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma abaixo (Fig. 7) apresenta os ensaios realizados para a caracterização estrutural e funcional das toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri* avaliadas neste trabalho.

Figura 7. Fluxograma dos ensaios realizados para a caracterização estrutural e funcional das toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri*.

3.1. MATERIAL

3.1.1. Veneno

O veneno de sapo *Rhinella schneideri* (sapos machos e fêmeas, coletados na região de Ribeirão Preto, Brasil) foi colhido por pressão das glândulas parotóides de animais previamente limpos, imediatamente dessecados e armazenado a -20°C .

Figura 8. Extração do veneno de *Rhinella schneideri* através da compressão de suas glândulas parotóides. Observa-se uma substância viscosa de cor amarelada. (Fonte: Laboratório de Toxinas Animais)

3.1.2. Drogas

Foram utilizados: PTZ (Sigma-Aldrich - antagonista não-competitivo de GABA_A), NMDA (Sigma-Aldrich - agonista do receptor de glutamato NMDA), Pilocarpina (Sigma-Aldrich - agonista inespecífico muscarínico), Bufalina (Sigma-Aldrich).

3.1.3. Animais

A manipulação dos animais experimentais foi realizada segundo os Princípios Éticos na Experimentação Animal - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), o *Guiding Principles for Research Involving Animals e Human Beings* - Sociedade de Fisiologia Americana (APS, 2000) e *Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals* (Zimmermann, 1983). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto (Processo nº 13.1.831.53.5).

Foram utilizados ratos Wistar machos (200 a 250 g) acondicionados dois a dois em gaiolas e mantidos em biotério de manutenção do Departamento de Biologia com ciclo claro/escuro de 12/12hs, temperatura (25°C) e umidade (55%) controladas. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Foram oferecidas água e alimentação *ad libitum*. Os animais foram tratados seguindo as normas da *American Guidelines for Animal Care*, evitando o sofrimento desnecessário aos animais.

Para os experimentos envolvendo ensaios mitocondriais, as mitocôndrias foram isoladas de fígados de ratos Wistar jovens, pesando aproximadamente 150 g, mantidos sob condições adequadas no Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (biotério convencional), com temperatura em torno de 19 a 23°C e a ração servida “*ad libitum*”. Os ratos foram eutanasiados por decapitação, sem o uso de anestésico, para não interferir nos parâmetros bioenergéticos das mitocôndrias.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Filtração do veneno bruto

Foram suspensos 350 mg do veneno dessecado em 50 mL de água, sendo obtida uma suspensão mucosa de cor branca. Essa suspensão foi submetida à diálise contra água. Utilizaram-se membranas Fisherbrand MWCO 6000-8000 contendo 50 mL da amostra. A diálise foi realizada em um béquer contendo 500 mL de água destilada. Foram realizadas quatro trocas de água, de doze em doze horas.

A fração que permeou a membrana de diálise, contendo os componentes de baixa massa molecular, foi congelada e posteriormente liofilizada e submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e à cromatografia gasosa seguida de análise por espectrometria de massas (CG/MS), conforme apresentado na Figura 9. A fração retida pela membrana, contendo os componentes de alta massa molecular, foi também congelada e posteriormente liofilizada.

3.2.2. Cromatografia em fase reversa em sistema CLAE

Utilizou-se a fração de baixa massa molecular, permeada pela membrana de diálise para fazer a separação em CLAE, utilizando-se uma coluna C18 de fase reversa. A coluna foi equilibrada e inicialmente eluída com uma mistura de 85% Tampão A (solução aquosa de TFA a 0,1%) e 15% de tampão B (solução aquosa de TFA a 0,1 % + acetonitrila 80 %). A vazão foi de 0,8 mL/min e a amostra foi eluída com gradiente linear de acetonitrila chegando a 100% do Tampão B em trinta e seis minutos.

A cromatografia da amostra foi realizada utilizando o comprimento de onda de 280 nm para a detecção dos constituintes da amostra, e resultou em vários picos de absorvância, sendo que os de escolha para as análises subsequentes foram denominados de Rs1, Rs2, Rs3, Rs4 e Rs5. No entanto, verificou-se que as frações Rs1 e Rs2 eram compostas de diferentes moléculas e, portanto, não foram incluídas nas análises de caracterização funcional e estrutural.

Figura 9. Esquema de fracionamento do veneno de *Rhinella schneideri* utilizado para a obtenção das amostras de baixa massa molecular e suas frações.

3.2.3. Identificação da bufalina na fração de baixa massa molecular por CLAE

Para identificação da Rs5, molécula que segundo Baldo (2010) inibiu crises convulsivas induzidas por PTZ e NMDA, utilizou-se a molécula pura de bufalina adquirida comercialmente (BAC) e a fração de baixa massa molecular de veneno de *Rhinella schneideri* (VRs).

O protocolo foi realizado utilizando-se amostras nas seguintes proporções:

- * 400 µL VRs + 100 µL Tampão A
- * 400 µL Tampão A + 100 µL BAC
- * 400 µL VRs + 100 µL BAC

3.2.4. Cromatografia gasosa seguida por espectrometria de massas (CG/MS)

Os ensaios de cromatografia gasosa seguida de análise por espectrometria de massa (CG/MS) foram realizados em colaboração com o Professor Dr. Norberto Peporine Lopes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

Para identificação das moléculas e confirmação de suas massas moleculares, a amostra de baixa massa molecular permeada pela membrana de diálise e as subfrações obtidas em cromatografia, foram submetidas à CG/MS, utilizando-se um aparelho Shimadzu Modelo: QP-2010 - com uma coluna ZB-5MS (30 m x 0.25 μ m x 0.25 mm). O gás Hélio (He) foi utilizado como gás de arraste e foi ajustado para uma taxa de fluxo constante (1,0 mL/min). A temperatura foi controlada de 200 a 290°C a 15°C/min, e então, foi mantida isotermicamente a 290°C por mais 30 min, dando um tempo de análise total de 45 min. O volume de injeção foi de 1,0 mg.mL⁻¹, e a temperatura do injector foi fixada em 260°C com uma razão de separação de 1:5. A saída da coluna foi inserida diretamente no bloco de ionização de elétrons operando em fonte de 70 eV, e a faixa de varredura foi 50-500 Da. A identificação de massa espectral foi investigada por comparação com a biblioteca Wiley e bancos de dados em massa espectral comercial NIST.

3.2.5. Espectrometria de massas

A subfração Rs5 teve sua estrutura analisada por espectrometria de massas empregando um sistema triplo-quadrupolo, Quattro LC (Micromass, Manchester, US) equipado com uma interface electrospray (ESI). A subfração foi dissolvida em acetonitrila:água (1:1, v/v) e submetida por infusão direta na interface ESI, operada no modo positivo. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram de 80 e 250°C, respectivamente. O gás nitrogênio foi usado na dessolvatação e nebulização, o argônio foi usado como gás de colisão e os espectros dos íons e seus fragmentos foram obtidos por monitoramento de reação múltipla (MRM).

3.2.6. Atividade anticonvulsivante em modelos de crise aguda envolvendo a BAC.

Os ensaios de atividade anticonvulsivante em modelos de crise aguda, envolvendo a bufalina adquirida comercialmente (BAC), foram realizados em colaboração com o Professor Dr. Wagner Ferreira dos Santos da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP).

3.2.6.1. Cirurgia

Antes da anestesia, foram injetados nos animais sulfato de atropina (0,5 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.)) para evitar efeitos negativos sobre a respiração. Os animais foram então anestesiados com cetamina (80 mg/kg) em associação com xilazina (10 mg/kg) e fixados em um estereotático (Stoelting-Standard). Foi realizada injeção local de lidocaína (2%), sendo logo a seguir exposto o crânio do animal para o implante de uma cânula no VL (ventrículo lateral): AP (ântero-posterior) – 0,9 mm, ML (médio-lateral) - 1,6 mm, DV (dorso-ventral) - 3,4 mm, tendo como base a linha do bregma, de acordo com o Atlas de Paxinos & Watson (1986).

A cânula consiste de um segmento de agulha hipodérmica BD-25X7 (22 G) com 10 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro externo. Após sua implantação, a cânula foi fixada com acrilato dental. Após a cirurgia, os animais receberam antibiótico profilático contra infecções (ceftriaxona sódica 50 mg/kg, i.p.) e analgésico (meloxicam 1,5 mg/kg, i.p.).

3.2.6.2. Atividade anticonvulsivante em modelos de indução de crise aguda

Após o descanso pós-cirúrgico (1 semana), os animais (n = 6, por grupo) foram levados para a sala de experimentação e injetados com salina (controle) ou BAC (0,2 µg), por via intracranioventricular (i.c.v.) (Tab. 3). Após 15 min, cada grupo recebeu uma injeção de NMDA (20 µg/µL, via i.c.v. 1 µL) ou PTZ (85 mg/kg, via i.p. 0,1 mL). A fração Rs3 (0,25 µg ou 0,5 µg) também foi analisada (Tab. 3), porém apenas em ensaios com PTZ, a qual se demonstrou mais eficaz em experimentos prévios realizados por Baldo (2010).

Tabela 3. Drogas utilizadas nos ensaios para a avaliação da ação anticonvulsivante da bufalina adquirida comercialmente e a Rs3, e as respectivas concentrações e vias de administração.

<i>Drogas</i>	<i>Dose</i>	<i>Via de administração</i>
PTZ	80 mg/kg	via i.p
NMDA	1 µL, 20 µg/µL	via i.c.v
Bufalina (BAC)	1 µL, 2 µg/µL;	via i.c.v
Rs3	1 µL, 0,5 µg/µL	via i.c.v.
Rs3	1 µL, 0,25 µg/µL	via i.c.v.

Foi utilizada a dose CD₉₇ dos convulsivantes, ou seja, a dose que produziu convulsão em 97% dos animais ensaiados para cada convulsivante (ensaios piloto). Em seguida, os animais foram filmados por 30 minutos e observados por três horas em suas gaiolas.

Para avaliação das crises convulsivas induzidas por NMDA foi utilizado o índice de Racine (1972) (Tab. 4).

Tabela 4. Classificação de crises límbicas. Utilizada na avaliação de crises convulsivas induzidas por NMDA, segundo o índice de Racine (1972).

Classe	Comportamento
1	Movimentos orofaciais
2	Mioclonia de cabeça
3	Mioclonia das patas anteriores
4	Elevação
5	Todos os comportamentos da classe além de período de hipertonia.

A análise das crises convulsivas induzidas pela injeção sistêmica de PTZ foi realizada de acordo com o índice de Lamberty & Klitgaard (2000), como segue: (0) ausência de crises, (1) movimentos faciais e nas orelhas, (2) mioclonias localizadas, (3) mioclonias generalizadas, (4) convulsões clônicas dos membros anteriores, (5) convulsões clônicas generalizadas com episódios de elevação e queda, (6) convulsões clônicas generalizadas com episódios de extensão tônica e *Status epilepticus* (SE).

3.2.6.3. Análise Estatística

As frequências de animais protegidos contra morte ou crise induzidas pelos convulsivantes PTZ e NMDA foram submetidas à análise de frequência utilizando-se o teste de qui-quadrado. Cada grupo foi comparado ao grupo controle utilizando-se o teste de Fischer. As médias das latências para o desencadeamento das crises em animais não protegidos foram comparadas utilizando-se o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-teste de Tukey, quando $p < 0,05$. Foram utilizados os programas SPSS de estatística (versão 13.0, USA, 2004) e Graph Prism (versão 4.0, GraphPad Software, U.S.A.) para confecção dos gráficos.

3.2.7. Avaliação histológica para caracterização da ação neuroprotetora da Rs5 em ensaios agudos *in vivo*.

Para os ensaios de avaliação de neuroproteção da fração Rs5, os animais sofreram uma lesão aguda causada por *status epilepticus* (SE) induzido por pilocarpina (PILO). Para isso os animais passaram por cirurgia estereotóxica como descrito no item 3.2.8.1.

3.2.7.1. SE induzido por pilocarpina

Após a cirurgia os animais passaram por um período de recuperação. Os animais ($n = 8$, por grupo) receberam microinjeção via i.c.v. de cloridrato de pilocarpina (PILO) (2,4 mg/ μ L) para indução de SE. A microinjeção foi aplicada utilizando uma seringa de 10 μ L (Hamilton, Ref 80300, EUA) acoplada a uma bomba de infusão (Insigth - Brasil), sendo a taxa de infusão de 0,5 μ L/ min e o volume de injeção de 1,0 μ L. Após a injeção os ratos foram colocados em caixas de acrílico transparente (15 x 30 x 30 cm) e observados para a avaliação comportamental. As alterações comportamentais resultantes da administração de PILO foram analisadas baseadas conforme Racine (1972) (Tab. 4).

O início do SE foi considerado quando o animal passou a apresentar crises tônico-clônicas continuas ou pequenas crises sem recuperação (RIGOULOT et al., 2004). Para atenuar o SE e diminuir o índice de mortalidade, os animais foram tratados com uma administração via i.p. de tiopental sódico (30 mg/kg) 180 minutos o início do SE.

3.2.6.2. Tratamentos

Os ratos que entraram em SE foram separados randomicamente e 60 minutos após receberem a injeção de tiopental sódico, foram tratados com três diferentes doses de Rs5 (1,0; 2,0 ou 4,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Este tratamento foi realizado diariamente, durante 72 horas, sempre no mesmo horário. Um grupo controle foi injetado com salina ao invés de Rs5. A divisão dos grupos experimentais está descrito na tabela 5.

Tabela 5. Descrição dos grupos experimentais e as concentrações de Rs5 utilizadas para o tratamento.

Grupo	Droga - PILO	Rs5	Via de administração
NAIVE	-	-	<i>Sem cirurgia</i>
Controle	-	-	<i>Cirurgia</i>
Controle	2,4 mg/ μL	-	Salina - via i.c.v.
Tratamento	2,4 mg/ μL	Dose 1 - 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	via i.c.v, 1 μL
Tratamento	2,4 mg/ μL	Dose 2 - 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	via i.c.v, 1 μL
Tratamento	2,4 mg/ μL	Dose 3 - 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	via i.c.v, 1 μL

Após 24 horas do último tratamento os animais foram eutanasiados, perfundidos e seus cérebros retirados para os cortes histológicos.

3.2.7.3. Eutanásia e Perfusão

Para a avaliação do efeito neuroprotetor da fração Rs5, os animais foram submetidos à eutanásia após 96 horas do SE. Foi injetada uma dose letal de tiopental sódico (120 mg/kg – Cristália). Após, os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com solução tampão de fosfato de sódio (PBS – 0,05 M; pH 7,4), seguida de solução de para formaldeído a 4% (PFA – diluído em PBS 0,05 M; pH 7,4). Para a infusão utilizou-se uma bomba peristáltica (EL 500 Insigth - Brasil), com um fluxo de 10 mL/min com duração de 15 min cada etapa.

3.2.7.4. Extração dos encéfalos e processamento histológico

Após a perfusão dos animais, os encéfalos (telencéfalo, diencéfalo, cerebelo e tronco encefálico) foram extraídos da caixa craniana e refixados em solução de PFA a 4% e mantidos em geladeira a 4° C, por 12 horas. Após essa etapa foi realizado um procedimento de crio proteção para preservação das células do tecido cerebral, impedindo que ocorra lise durante o processo de congelamento. Para a realização da crio proteção os encéfalos foram adicionados em solução de sacarose diluída 10, 20 e 30% em PBS (0,05 M), por um período de 24 horas em cada solução, as quais foram mantidas a 4° C. Posteriormente os encéfalos foram colocados em um suporte de inclusão, recobertos por uma solução de congelamento ótimo (OCT Tissue-Tek; Jung – EUA), congelados em acetona resfriada com gelo seco e conservados em *freezer* a -70° C.

Para a realização dos cortes histológicos, utilizou-se um micrótomo de congelamento (CM 1850, Leica Microsystems – Alemanha). Os encéfalos congelados foram fatiados no sentido coronal, em secções com espessura de 20 µm cada e distendidos em lâminas com três fatias cerebrais, sendo um total de 18 fatias de cada animal dos grupos experimentais estudados. Para uma demonstração da densidade de células do hipocampo, utilizou-se o princípio de Cavalieri (ISMAIL; BEDI, 2009), que consiste em uma seleção das fatias de tecido cerebral que compuseram cada lâmina, considerando intervalos de 120 µm entre cada fatia em uma mesma lâmina. Para o início dos cortes observou-se o Atlas de coordenadas estereotáticas de Paxinos e Watson (1998), o qual determinou as posições para início das fatias entre -3,14 e -4,16 mm, no sentido anteroposterior do neuro eixo a partir do Bregma.

Após a montagem das lâminas, estas foram mantidas em estufa a 37° C por 18 horas, sendo posteriormente acondicionadas em caixas porta-lâminas e conservadas a 4° C.

3.2.7.5. Técnica de coloração de Nissl com cresil violeta

O corpo celular de neurônios apresenta grande quantidade da organela denominada retículo endoplasmático rugoso, o qual é constituído de agregados de cisternas paralelas, com inúmeros polirribossomos livres. Esses grupos são responsáveis pela síntese proteica, e os neurônios que apresentaram alta taxa de síntese de proteínas, possuem maior quantidade de ácido ribonucleico (ARN) em

seu citoplasma que qualquer outra célula. Quando corados com corantes básicos, esses grupos de ribossomos e cisternas podem ser evidenciados, apresentando-se ao microscópio óptico como manchas basófilas espalhadas no citoplasma, denominadas corpúsculos de Nissl (BITTENCOURT; ELIAS, 2007).

Ao observar uma lesão neuronal os corpúsculos de *Nissl* tendem a desaparecer, um fenômeno conhecido como cromatólise, sendo assim essa técnica serve de indicador da viabilidade neuronal (SCORZA et al., 2005). Esta técnica histológica foi utilizada para possibilitar a visualização das células das regiões hipocâmpais consideradas e estimar a densidade média de células neuronais viáveis.

Para realizar esta coloração as secções foram hidratadas em banhos repetidos com solução alcoólica de 90% a 0%, com duração de 5 minutos cada banho. Em seguida, as lâminas foram imersas durante uma hora em solução de cresil violeta (0,5%), sendo submetidas logo após, a uma bateria de desidratação a partir de solução alcoólica a 95% até xilol a 100%. As lâminas foram recobertas com lamínula, Entellan (Merk – Alemanha) como meio de montagem.

3.2.7.6. Aquisição das imagens do tecido cerebral

As imagens foram obtidas utilizando-se um sistema de captura constituído por uma câmera digital colorida (DFC300 FX, Leica Microsystems – Alemanha) conectada a um microscópio de epifluorescência (DM 5000 B, Leica Microsystems – Alemanha) e ambos conectados a um microcomputador (processador INTEL® CORE™ 2-DUO – EUA).

Para a captura, foram escolhidas três imagens de diferentes pontos das camadas de células piramidais das regiões CA1 e CA3, bem como da região da camada de células polimórficas (*hilus*) do giro denteado. Para as análises histológicas, foram consideradas três secções coronais da região descrita no item 3.2.9.4. Todas as imagens foram capturadas em aumento de 400x, com exceção do *hilus*, cujas imagens foram capturadas em aumento de 200x. O padrão de captura das imagens está representado na figura 10.

Figura 10. Representação esquemática do padrão de captura de imagens da camada de células piramidais das regiões CA1 e CA3 e também da camada polimórfica do giro dentado – *hilus*. Imagem correspondente à prancha 34 (Bregma – 3,6 mm) do atlas de Paxinos e Watson (1996).

3.2.7.7. Análise quantitativa do dano neuronal – Nissl

A análise quantitativa constituiu-se da avaliação das três secções do hipocampo dorsal de cada animal. O experimentador realizou a quantificação sem saber da procedência da lâmina analisada. As imagens foram capturadas de acordo com os pontos demonstrados no item 9.2.9.5 (figura 10).

Os neurônios viáveis foram quantificados manualmente com auxílio do software Q-Win (Leica Microsystems – Alemanha), o qual também foi utilizado para mensurar as áreas das regiões hipocâmpais analisadas.

A densidade média estimada de neurônios viáveis (N) foi considerada como sendo a média da quantidade de células/mm² ($\pm$ SEM) das imagens capturadas de acordo com a figura 10. Foi também medido o diâmetro médio (D) dos núcleos de alguns neurônios representativos de cada região para correção da potencial polarização da amostragem e desconsiderar a quantificação de células com diâmetros inferiores a 7 μ m. A metodologia utilizada para calcular a densidade neuronal foi o método de correção descrito por Abercrombie (1946):

$$N \text{ (por mm}^2\text{)} = n [T / (T+D)] / A$$

3.2.7.8. Análise estatística

Para análise de dados foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de *Studen-Newman-Keuls*, para distribuições normais, considerando-se significantes os valores com $p < 0,05$.

3.2.8. Avaliação do potencial neuroprotetor em ensaios utilizando mitocôndrias isoladas para avaliações de alterações diretas em sua bioenergética

3.2.8.1. Isolamento de mitocôndrias

Após a eutanásia dos animais, o fígado (10-15 g) foi imediatamente removido, picotado com o auxílio de tesoura em 50 mL de meio de homogeneização (sacarose 250 mmol/L, EGTA 1 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) a 4°C, lavado com o mesmo meio de homogeneização para retirada do excesso de sangue e homogeneizado em homogenizador Potter-Elvehjen (3 ciclos de 15 segundos com intervalos de 1 minuto). O homogenato foi centrifugado em centrífuga refrigerada (HITACHI Himac CR21E), a temperatura constante de 4°C, a 580 g por 5 minutos. Verteu-se o sobrenadante para outro tubo, desprezando-se o sedimento por possuir restos de células intactas, membranas e núcleos. O sobrenadante (onde estão as mitocôndrias) foi novamente centrifugado a 10300 g por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspensionado em meio de lavagem (sacarose 250 mmol/L, EGTA 0,3 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) e novamente centrifugado a 3400 g por 15 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento contendo as mitocôndrias foi ressuspensionado em 1 mL de meio de ressuspensão (sacarose 250 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) obtendo-se assim a suspensão mitocondrial com concentração de proteínas a ser determinada e que foi mantida em gelo e utilizada dentro de um período de 3 horas (PEDERSEN et al., 1978). A concentração de proteína mitocondrial foi determinada pela reação de Biureto (CAIN; SKILLETER, 1987). Uma alíquota de 10 µL da amostra foi adicionada a 100 µL de uma solução de ácido deoxicólico 5% (m/v) e água q.s.p. 1,5 mL. A essa mistura foi adicionado 1,5 mL de Reagente de Biureto. A absorbância foi monitorada em espectrofotômetro em λ 540 nm, a partir de uma curva de calibração usando BSA como padrão.

3.2.8.2. Determinação dos níveis mitocondriais de ATP

Os níveis de ATP mitocondrial foram determinados por quimioluminescência utilizando-se o sistema luciferina-luciferase. A suspensão mitocondrial (1 mg de proteína/mL) foi centrifugada a 9.000 *g* por 5 minutos, a 4°C, e o sedimento contendo as mitocôndrias foi tratado com 1 mL de HClO₄. Após centrifugação a 14.000 *g* por 5 minutos, a 4°C, alíquotas (100 µL) do sobrenadante foram neutralizadas com 70 µL de KOH 2 M, acrescidas de Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 (volume final 1 mL), e novamente centrifugadas. A luminescência do sobrenadante foi medida, utilizando-se o “kit” da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) empregando um luminômetro AutoLumat LB953 Luminescence photometer (Perkin Elmer Life Sciences, Wildbad Germany). Foram realizados 3 experimentos utilizando suspensão mitocondrial de diferentes ratos.

3.2.8.3. Determinação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado espectrofluorimetricamente monitorando-se as alterações na fluorescência da safranina-o, um corante catiônico fluorescente, que se distribui eletroforicamente na matriz em resposta a carga negativa da membrana mitocondrial interna, utilizando-se comprimentos de onda de excitação em 495 nm e de emissão 586 nm (LEMASTERS et al., 1987). As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação (sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2), acrescido de rotenona 2,5 µmol/L + safranina-o 10 µmol/L e das soluções do VRs, em volume final de 2 mL, e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L. O potencial de membrana foi totalmente desfeito utilizando 5 µL de CCCP (Cianeto de Carbonila Clorofenilhidrazona) 1 mmol/L. A diminuição do potencial de membrana, observada pelo influxo eletrogênico do cátion CCCP, correlaciona-se linearmente com o aumento da intensidade de fluorescência do corante na medida em que ele é liberado das mitocôndrias (AKERMAN, 1976; EMAUS et al., 1986). Foram realizados 3 experimentos utilizando suspensão mitocondrial de diferentes ratos.

3.2.8.4. Inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial foi monitorado por 10 minutos através da diminuição da absorbância aparente da suspensão de mitocôndrias (0,4 mg proteína/mL), incubadas em 1,5 mL do meio padrão acrescido de rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$, succinato 5 mmol/L, CaCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$ e das soluções de Rs5, utilizando-se espectrofotômetro em 540 nm. O inchamento mitocondrial é acompanhado da diminuição na turbidez da suspensão e, portanto, da diminuição proporcional na absorbância (LEMASTERS et al., 1999). Foram realizados 3 experimentos utilizando suspensão mitocondrial de diferentes ratos.

3.2.8.5. Movimentação e Liberação de Ca^{2+}

A movimentação de Ca^{2+} foi monitorada utilizando-se o marcador fluorescente Calcium Green 5N, com comprimento de onda em 506 nm e 531 nm de emissão (RAJDEV, 1993). Utilizou-se 1 mg de proteína mitocondrial em volume final de 2 mL de meio de reação padrão acrescido de rotenona 2 $\mu\text{mol/L}$ + Ca^{2+} 10 $\mu\text{mol/L}$ + Calcium Green 5N 150 nmol/L. As mitocôndrias foram energizadas com succinato de potássio 5 mmol/L e as soluções de Rs5 foram adicionadas. A captação e efluxo de Ca^{2+} foram monitorados por 600 segundos em espectrofluorímetro. O efluxo total de Ca^{2+} foi realizado utilizando-se CCCP 1 mmol/L. À medida que o Calcium Green 5N é captado pela mitocôndria observa-se uma diminuição na fluorescência do meio. Foram realizados 3 experimentos utilizando suspensão mitocondrial de diferentes ratos.

3.2.8.6. Análise estatística

A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada pela análise de variância ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Dunnett para a comparação de vários grupos tratados em relação aos seus controles, utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 5.0 (San Diego, CA, U.S.A.). Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.2.9. Avaliação *in vitro* dos efeitos das frações Rs3, Rs4 e Rs5 e BAC nos transportadores de neurotransmissores (glutamato, serotonina, dopamina, noradrenalina, GABA e glicina)

Os ensaios de avaliação *in vitro* dos efeitos das frações Rs3, Rs4 e Rs5 e BAC nos transportadores de neurotransmissores foram realizados em colaboração com a Professora Dra. Andréia C. K. Fontana Mortensen no Departamento de Farmacologia e Fisiologia da Universidade de Drexel na Filadélfia – USA.

3.2.9.1. Linhagens celulares

Para os ensaios de receptação, dois tipos de células foram cultivadas neste estudo: as células COS-7, adequada para transfecções instáveis e Madin-Darby de rim canino (MDCK), para transfecções estáveis.

3.2.9.2. Cultura celular e preparo das células para ensaios de caracterização farmacológica

Para os ensaios de recaptação, dois tipos de células foram cultivadas neste estudo: as células COS-7 que são células pertencentes a uma linhagem celular do tipo fibroblasto derivada de tecido renal de macaco, largamente empregada em estudos de Biologia Celular e Molecular e Bioquímica, pela possibilidade de transfecção de DNAs de proteínas recombinantes e células Madin-Darby de rim canino (MDCK).

A caracterização da atividade das frações Rs3, Rs4 e Rs5 foram realizadas nos transportadores de glutamato, monoaminas (dopamina, serotonina e norepinefrina), GABA e glicina.

As células COS-7 e MDCK foram mantidas em meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado com soro bovino fetal a 10%, com adição de penicilina e estreptomicina em incubadora com atmosfera umidificada com 5% CO₂ a 37°C.

Em um tubo cônico foram transfectadas nas células COS-7 os seguintes cDNAs (em plasmídeos de expressão apropriados): EAAT1, EAAT2, EAAT3 (subtipos de transportadores de glutamato, ARRIZA et al., 1994) e em células MDCK: hDAT, hSERT e hNET (transportadores de dopamina, serotonina e noradrenalina humanos, respectivamente), GAT-1 e GAT-3 (subtipos de

transportadores de GABA), Glyt-1 (transportador de glicina), e vetor vazio (pcDNA3 ou pCMV-5) para obtenção do *background* (nível endógeno de captação do respectivo neurotransmissor) utilizando o reagente de transfecção TransIT®-LT1 (Mirus Bio LLC, Madison, WI - EUA), e plaqueadas na densidade de aproximadamente 100 mil células por poço, em placa de cultura de tecido de 24 ou 96 poços.

Dois dias após a transfecção foram realizados os ensaios de captação, de acordo com FONTANA et al. (2007). O meio de cultura das células foi removido e substituído por tampão D-PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na₂HPO₄, 1,4mM KH₂PO₄, pH 7,4) contendo 0,1 mM de CaCl₂ e 1 mM de MgCl₂ (PBS-CM) logo antes do ensaio com auxílio de aspirador a vácuo.

3.2.9.3. Ensaios dose-resposta de Rs3, Rs4, Rs5 e BAC em vários transportadores de neurotransmissores

Para ensaios dose-resposta as células foram pré incubadas por 10 minutos com várias concentrações de Rs3, Rs4, Rs5 e BAC ou tampão e em seguida as reações de captação foram iniciadas com a adição de 50 nM do respectivo neurotransmissor radioativo ([³H]-L-glutamato, [³H]-serotonina, [³H]-dopamina, [³H]-noradrenalina, [³H]-GABA ou [³H]-glicina) e incubados por 10 min a temperatura ambiente. Todos os ensaios de transporte de dopamina tiveram no tampão a adição do inibidor da catecol o-metiltransferase Ro 41-0960 (5 µM), para evitar a degradação da dopamina. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicatas. As reações foram finalizadas com duas lavagens em tampão, e as células foram solubilizadas numa solução de SDS 0,1% e NaOH 0,1M. Após essa etapa, líquido de cintilação será adicionado e os tubos serão contados em contador de cintilação líquida LS 6500 (Beckman Coulter, CA - EUA). Esses ensaios determinaram a especificidade de ação das frações Rs3, Rs4, Rs5 e BAC em vários tipos de transportadores de neurotransmissores.

3.2.9.4. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism versão 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA - EUA) com nível crítico fixado a 5% (P<0,05) para se admitir uma diferença de valores estatisticamente significativa.

Para determinar o ED₅₀ da molécula as curvas dose-resposta foram geradas e ajustadas com regressão não-linear na equação de Hill com auxílio do software GraphPad Prism. ED₅₀ foram representados como médias $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes. Análises estatísticas nos valores de ED₅₀ foram realizadas com teste *t* de *Student* para dados pareados.

As análises estatísticas dos ensaios de liberação foram feitas considerando a porcentagem de liberação entre diferentes tratamentos como variável dependente. Para esta análise a quantidade total de radioatividade (suspensão + células solubilizadas) nas amostras foi calculada, e as contagens das suspensões foram divididas pelo total e multiplicadas por 100 para obter a porcentagem de liberação. Gráficos em barra e estatísticas (teste ONE-WAY ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Dunnett entre os tratamentos (veículo (tampão), substrato (não radioativo) e Rs3, Rs4, Rs5 e BAC) foram realizados usando o software Graph Pad Prism.

3.2.10. Avaliação do potencial ansiolítico da Rs3 e Rs5 em modelos de claro/escuro e labirinto em cruz elevado.

Os ensaios de avaliação do potencial ansiolítico em modelos de caixa claro/escuro e labirinto em cruz elevado foram realizados em colaboração com o Professor Dr. Wagner Ferreira dos Santos da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

3.2.10.1. Labirinto em cruz elevado

Um labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado segundo Lister (1987). Grupos de ratos ($n = 6$) operados como descrito em 3.2.8.1, foram tratados 15 minutos antes do experimento com 1 μ L das frações Rs3 (0,5 e 1,0 μ g/ μ L) e Rs5 (1,0 e 2,0 μ g/ μ L) e salina como controle. Os animais foram colocados no centro do LCE de frente para a parte fechada. Após os tratamentos, ratos foram deixados a explorar o LCE por 5 min, quando os comportamentos foram gravados por uma câmera de vídeo. As seguintes respostas comportamentais foram analisadas: exploratória, elevação, autolimpeza e imobilidade. Além disso, o número de entradas e tempo gasto na parte aberta e parte fechada foram registrados nos braços do LCE (LIBERATO et al., 2006).

3.2.10.2. Caixa claro/escuro

O teste claro/escuro foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Belzung et al. (1987). O aparelho consiste em uma caixa (41 × 20 × 38 cm) dividida ao meio por uma parede com uma abertura para ligar um compartimento em outro. O compartimento escuro foi construído com acrílico preto, enquanto o compartimento claro com acrílico branco com tampa transparente, a fim de permitir que a luz entre na caixa. Todos os experimentos foram realizados na sala de habitação para não causar estresse desnecessário nos animais. Grupos independentes de animais (n = 6) foram tratados 15 minutos antes do experimento com 1µL das frações Rs3 (0,5 e 1,0 µg/µL) e Rs5 (1,0 e 2,0 µg/µL) e salina como controle. Após os tratamentos, os animais foram colocados na caixa de frente para o compartimento escuro e deixados a explorar durante 5 minutos. O tempo gasto em cada compartimento foi gravado (LIBERATO et al., 2006).

3.2.11. Avaliação comportamental de ratos tratados com a Rs3 e Rs5 através de ensaios de medo contextual.

Os ensaios de avaliação de medo contextual foram realizados em colaboração com o Professor Dr. Leonardo Resstel da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

3.2.11.1. Ensaios de medo contextual

Os animais foram previamente submetidos a cirurgia como descrito em 8.2.3.1 e após a recuperação foram habituados no ambiente dos experimentos.

Para a execução deste paradigma comportamental, foi utilizado uma caixa de 23x20x26 cm formada por três paredes de alumínio e a parte frontal em acrílico, cujo assoalho é constituído por barras metálicas, 23x20x2 cm cada (Insight Instruments Ribeirão Preto, São Paulo - Brasil) que conduzem corrente elétrica. O protocolo experimental consiste em três dias. No Primeiro dia, foi empregada a sessão de habituação, onde os animais foram expostos individualmente durante 10 minutos à caixa, para familiarização com o ambiente (LISBOA et al., 2010a). Após o intervalo de 2 horas, iniciou-se a sessão de condicionamento contextual. Os animais foram

reexpostos, individualmente, à caixa de condicionamento durante 5 minutos de habituação seguidos de 4 choques nas patas de 0,85mA com duração de 1 s e intervalos variando de 40 s à 130 s (randomizado), mantendo o animal na caixa, após a emissão do último estímulo elétrico, durante 120 s (LISBOA et al., 2010b), totalizando 10 minutos. No segundo dia, foi realizada a sessão de extinção, que consiste em expor, individualmente, os animais à mesma caixa onde foram previamente habituados e condicionados, durante 30 min (SUZUKI et al., 2004), na ausência de choques elétricos (estímulo condicionado). No terceiro dia de teste, foi avaliada a retenção da memória de extinção, que consiste em expor os animais, individualmente, à mesma caixa utilizada nas sessões do dia 1 e dia 2, durante 10 min. O tempo total de freezing (imobilidade do animal exceto os movimentos respiratórios) foi mensurado em todas as sessões do protocolo experimental como medida comportamental (FIORENZA et al., 2012). A sessão de teste foi realizada em uma sala de experimento diferente da que utilizada para o procedimento de condicionamento (HOTT et al., 2012). O aparato experimental foi limpo com o auxílio de papel toalha e álcool 70%, antes e após o uso, com o propósito de que não permaneçam no local pistas olfativas para o próximo animal que será exposto à caixa (LISBOA et al., 2010b).

As drogas utilizadas para tratamento foram injetadas 10 minutos antes do experimento com 1 μ L das frações Rs3 (1,0 μ g/ μ L) e Rs5 (2,0 μ g/ μ L) e salina como controle. Os tratamentos ocorreram no terceiro dia de experimento para avaliação do potencial em extinguir o medo contextual.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração e fracionamento do veneno

No presente trabalho foram realizados o isolamento e a caracterização molecular de toxinas do veneno de *Rhinella schneideri*, comparando ainda a fração isolada Rs5 com a bufalina adquirida comercialmente (BAC) em ensaios anticonvulsivantes. Várias espécies de anfíbios produzem e/ou acumulam compostos biologicamente ativos em vísceras, glândulas e na pele. Estas moléculas funcionam como mecanismos de defesa contra predação e/ou como agentes antimicrobianos (MEBS et al., 2005). Dentre os compostos isolados se encontram: batracotoxinas, histonicotoxinas, pumiliotoxinas, quinolinas, bufogeninas e bufotoxinas, cuja ingestão induz intoxicação severa (DALY et al., 2005).

O veneno bruto foi extraído pela compressão das glândulas paratoides (Fig. 8) localizadas logo atrás dos olhos do animal. Este veneno apresentou um aspecto amarelado e com uma grande quantidade de muco, com uma textura pastosa, que dificulta a manipulação do mesmo. Para este fracionamento foram utilizados métodos físicos, como a separação por uma membrana de diálise, que resultaram em frações de baixa massa molar, que permearam a membrana, e frações de alta massa molar, que não permearam a membrana. Substâncias descritas na literatura como bufadienolídeos apresentam um esqueleto molecular esteroideal, portanto, devem ser encontrados na fração de baixa massa molar, por outro lado, a fração retida pela membrana é, provavelmente, composta por proteínas e outras moléculas de alta massa molar.

Dentre as moléculas de baixa massa molar são encontradas uma diversidade de estruturas químicas, dentre elas: heterosídeos cardiotônicos, alcaloides indólicos, ácidos orgânicos. Os bufadienolídeos pertencem a classe dos heterosídeos cardiotônicos e são moléculas esteroidais que apresentam 24 carbonos entre eles encontra-se a bufalina (TIAN et al., 2010; TIAN et al., 2013).

A diálise não é capaz de separar totalmente os componentes de baixa massa molar dos de alta massa molar, visto que ao atingir concentrações iguais dos dois lados da membrana, a permeação das moléculas pequenas para dentro e para fora do saco de diálise se igualam. Por esse motivo espera-se que um mesmo composto seja encontrado em mais de uma amostra, mas em diferentes proporções.

4.2. Purificação

A fração de baixa massa molar foi submetida à cromatografia em sistema CLAE com coluna de fase reversa C18, em que foram obtidas várias subfrações, das quais as 5 majoritárias foram denominadas por ordem de eluição como *Rs1*, *Rs2*, *Rs3*, *Rs4* e *Rs5* (Fig. 11A). Algumas frações eluídas entre *Rs2* e *Rs3* não foram numeradas porque não eram evidenciadas em todos os lotes de veneno.

Logo após a denominação das subfrações foi realizada a avaliação comparativa do perfil de eluição da BAC e o perfil de eluição dos componentes de baixa massa molar do veneno (Fig.11B e C).

Neste experimento, observa-se inicialmente a presença da fração *Rs5* na fração de baixa massa molar do veneno de *Rhinella schneideri* (Fig. 11A). Logo após realizou-se a injeção da solução contendo apenas a molécula de BAC, utilizando as mesmas condições cromatográficas (Fig. 11B). Verificou-se que esta foi eluída na mesma concentração de tampão B que a fração *Rs5*. Já no terceiro perfil cromatográfico (Fig. 11C) tem-se a fração de baixa molar do veneno de *Rhinella schneideri* juntamente com a BAC. Percebe-se nesta figura o aumento do pico identificado como *Rs5*, indicando a presença de bufalina na fração de baixa massa molar do veneno. O aumento da absorvância do pico *Rs5* deve-se à soma das massas da *Rs5* e da BAC que eluem na mesma concentração de tampão B. Dessa forma pode-se levantar a hipótese da presença de bufalina no veneno de *Rhinella schneideri*.

Estudos anteriores demonstraram a presença de várias moléculas de bufadienolídeos no veneno de *Rhinella schneideri*, incluindo a bufalina (ZELNIK et al., 1964). Assim, a semelhança do perfil cromatográfico da *Rs5* e da bufalina, indica a identidade das mesmas. Diferente da maioria dos estudos, os quais trazem referências de bufadienolídeos encontrados no ChanSu, extraído do veneno de *Bufo bufo gargarizans* (KAMANO, et al. 1998), este trabalho apresenta o isolamento e confirma a presença de bufalina em extrato do veneno de *Rhinella schneideri*, um sapo encontrado na fauna brasileira.

Os bufadienolídeos apresentam em sua estrutura básica o núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno com um anel lactônico de seis membros ligado ao carbono 17 (STEYN; HEERDEN, 1998). A grande semelhança entre estas moléculas, que apresentam a mesma estrutura como núcleo base e diferenciam-se

apenas nos radicais, talvez seja a melhor explicação para a dificuldade de isolamento das mesmas.

Devido à enorme dificuldade em se obter grandes quantidades de amostras isoladas, foram padronizados e realizados diferentes métodos a fim de reduzir o tempo da cromatografia e o aumentar a quantidade de corridas cromatográficas, visando obter maior quantidade de subfrações isoladas. Resultados inadequados quanto à pureza dos compostos foram corrigidos posteriormente.

Percebeu-se que a coluna C18 utilizada não estava apresentando a devida eficácia no isolamento dos compostos, motivo que levou à troca por uma coluna C2/C18, que posteriormente também apresentou perda de resolução dos picos. O problema ocorreu devido à adsorção das moléculas na coluna, o que levava a perda de muita amostra. Após várias pesquisas e tentativas de padronizações, o problema foi resolvido com lavagens sucessivas da coluna em diferentes gradientes de concentração de acetonitrila e finalmente a opção foi pela coluna C18, porém esta deveria ser utilizada sem uma pré-coluna que atrapalhava na resolução dos componentes da amostra.

Figura 11. Perfil cromatográfico da fração de baixa massa molar (A), BAC (B) e fração de baixa molar + BAC (C) em coluna de fase reversa C18. A coluna C18 foi inicialmente equilibrada com Tampão A (solução aquosa de TFA 0,1%). A vazão foi de 0,8 mL/min e a amostra foi eluída com gradiente linear de acetonitrila chegando a 100% do Tampão B (solução aquosa de TFA 0,1 % + acetonitrila 80 %) em aproximadamente trinta e seis minutos.

Outro problema encontrado no processo de purificação foi a semelhança estrutural das moléculas de bufadienolídeos, que fez com que houvesse dificuldade na separação por CLAE. Esses problemas fizeram com que um segundo passo cromatográfico fosse realizado na tentativa de se obter a molécula purificada (Fig. 12). Após a adequação dos métodos de purificação, tanto a coluna C2/C18 quanto a C18, apresentaram melhor resolução do perfil cromatográfico.

Figura 12. Perfil cromatográfico da fração Rs5 em coluna de fase reversa C18. A coluna C18 foi inicialmente equilibrada com Tampão A (solução aquosa de TFA 0,1%). A vazão foi de 0,8 mL/min e a amostra foi eluída com gradiente linear de acetonitrila chegando a 100% do Tampão B (solução aquosa de TFA 0,1 % + acetonitrila 80 %) em aproximadamente trinta minutos.

4.3. Espectrometria de massas

Os espectros de massas da subfração Rs5 e da BAC (Fig. 13) demonstraram a presença dos íons majoritários formados pela bufalina + hidrogênio [$M + H$], o dímero + H [$2M + H$], bufalina adicionada de Na^+ [$M + 23$] e K^+ [$M + 39$], com massas de 387, 773, 409 e 425 u.m.a., respectivamente. Observa-se ainda, que a subfração Rs5 (Fig. 13A) não se encontra totalmente purificada, quando comparada a BAC (Fig. 13B). A presença dos mesmos íons no espectro de massas da Rs5 e da bufalina comercial comprova que a subfração analisada e identificada por CG/MS e CLAE é a bufalina.

Figura 13. Espectro de massas da subfração Rs5 (A) do veneno de *Rhinella schneideri* e da BAC (B).

4.4. CG/MS

4.4.1. CG/MS da fração de baixa massa molar e subfração Rs5

A fração de baixa massa molar e a subfração Rs5 tiveram as massas molares de seus componentes determinadas por CG/MS (cromatografia gasosa seguida de espectrometria de massas). Essa metodologia permite identificar moléculas pela sua fragmentação quando submetidas a altas temperaturas. Dessa maneira, permite-se a comparação dos fragmentos com resultados observados na literatura. Os resultados obtidos mostraram a presença de várias moléculas já descritas na literatura na fração de baixa massa molar, incluindo a bufalina (Fig. 14). Pode-se observar também o tempo de retenção de cada molécula na cromatografia gasosa e suas respectivas massas molares. Algumas prováveis moléculas identificadas por este ensaio foram listadas na Tabela 6.

Figura 14. CG/MS da fração de baixa massa molar mostrando vários picos com diferentes massas, que resultou na provável identificação das várias moléculas presentes no veneno de *Rhinella schneideri*.

Tabela 6. Moléculas identificadas na fração de baixa molar do veneno de *Rhinella schneideri* e seus respectivos tempos de retenção e massa molar.

Tempo de Retenção (min)	Massa Molar (Da)	Provável Molécula
8,762	429	$C_{12}H_{16}N_2$
10,128	204	Bufotenina
19,525	281	
21,014	355	
21,325	419	
21,467	341	Escaleno
21,638	414	
21,905	338	
22,186	356	
22,539	371	
22,670	373	
22,787	429	
22,877	358	
22,975	372	
23,236	428	
23,350	415	
23,415	430	
24,044	415	
24,184	432	
24,641	372	
25,020	388	
26,925	357	
27,272	364	$C_{24}H_{32}O_5$
28,431	364	
28,833	351	
33,924	441	
34,439	386	Bufalina
36,400	440	
39,022	382	Desacetilcinobufotalina

O perfil obtido da cromatografia em fase gasosa (CG) da fração Rs5 (Fig.15 A) demonstrou que a bufalina obtida após o segundo passo cromatográfico em coluna C18, após a identificação dos problemas ocorridos, mostrou elevado teor de pureza. Porém esta ainda não se apresentou totalmente pura, confirmando a enorme dificuldade em se manipular este tipo de veneno. Pode-se observar que após ajustes no processo cromatográfico e a adição de uma segunda etapa no processo de CLAE, que a bufalina (tempo de eluição de 44 min) apresenta-se como componente majoritário da fração Rs5, quase sem contaminantes (Fig. 15 A). A identificação da mesma foi obtida por meio da fragmentação do íon majoritário, sendo que a massa molar determinada para a bufalina foi de 386 Da. Os dados obtidos da fragmentação são apresentados na figura 15 B.

Figura 15. Perfil da cromatografia de fase gasosa da subfração Rs5 (A). Espectro de massas obtido da fragmentação do íon de 386 Da, correspondente à massa molar da bufalina (B).

Os produtos naturais são fontes riquíssimas de compostos com importantes ações farmacológicas, sendo o isolamento e a identificação desses compostos de fundamental importância para o estudo de seus mecanismos de ação (LIU et. al, 2010).

Segundo Ye (2005a), a bufalina produz fragmentos iniciais que podem ser observados na Figura 16. Ao analisar esses fragmentos, primeiramente identifica-se que a bufalina foi submetida a uma protonação com íon hidrogênio. Dessa forma, a sua massa molar, que é de 386 Da, passou a ser de 387 Da, e as subseqüentes fragmentações também apresentaram uma massa molar com 1 Da a mais. Comparando-se a fragmentação da bufalina

obtida neste trabalho com a hipótese apresentada por Ye (2005a), observa-se a formação de fragmentos identificados em (B), com 1 Da a menos, porque neste trabalho o íon fragmentado não estava protonado (386 Da).

A

B

Figura 16. Produtos da fragmentação da bufalina proposta por Ye (2005), em que se pode observar primeiramente a saída de duas moléculas de água. Após essa etapa, ocorrem rearranjos moleculares que levam à formação de novos fragmentos. Em A, observa-se as massas formadas e em B, os hipotéticos rearranjos moleculares.

Observa-se na figura 17A o perfil cromatográfico da BAC submetida à cromatografia gasosa (CG) e pode-se comparar o seu perfil com o da subfração Rs5 (Fig. 15A). Verifica-se que os tempos de retenção de ambas se equivalem. Na figura 15B é apresentada a sobreposição dos dois perfis cromatográficos (em preto BAC e em rosa Rs5), mostrando que as duas moléculas apresentam o mesmo tempo de retenção. Este é mais um dado indicando que ambas devem apresentar a mesma estrutura molecular.

Figura 17. Perfil da Cromatografia em fase gasosa da BAC (A) e da BAC sobreposto ao da subfração Rs5 (B), demonstrando que ambas apresentam o mesmo tempo de retenção.

A identificação da subfração Rs5 do veneno de *Rhinella schneideri*, pode ser confirmada ao se comparar os espectros de massas obtidos das fragmentações da Rs5 e da BAC (Fig. 18), quando ambas foram submetidas ao mesmo processo e sob as mesmas condições de ensaio.

A análise dos fragmentos produzidos pela BAC e os fragmentos produzidos pela subfração Rs5 (Fig. 18), demonstraram que esta subfração se equivale à bufalina, devido à presença de praticamente todos os fragmentos em ambos os processos. Estes resultados são muito confiáveis e, com isso, é possível afirmar que o componente majoritário da fração Rs5 é realmente a bufalina.

Figura 18. Espectros de massas produzidos pela fragmentação da BAC (A) e da subfração Rs5 (B).

4.5. Avaliação da atividade anticonvulsivante da BAC em modelos de crise aguda

Analisando-se os trabalhos que relatam os efeitos desencadeados por moléculas esteroidais encontradas em venenos de sapos, verifica-se que suas ações no sistema nervoso central e periférico não são estudadas com ensaios adequados para a determinação de seus mecanismos de ação.

Estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa com moléculas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri*, incluindo a fração Rs5, mostraram alta efetividade da mesma contra crises convulsivas induzidas por convulsivantes químicos. Suas ações no sistema nervoso central podem estar relacionadas a agonistas GABAérgicos e/ou antagonistas glutamatérgicos, visto que as drogas utilizadas para desencadear as crises convulsivas foram o PTZ (Pentilenotetrazol; antagonista não –competitivo de GABA_A) e o NMDA (N-Metil-D-Aspartato; agonista do receptor de glutamato NMDA). Outra ação observada foi sobre a junção neuromuscular em sistema nervoso periférico. As mesmas moléculas que proporcionaram neuroproteção causaram inibição pré-sináptica da junção neuromuscular (BALDO, 2010).

Baldo (2010) comprovou a eficácia da subfração Rs5 em inibir crises convulsivas agudas induzidas por PTZ e NMDA. Após a identificação do principal componente da subfração Rs5, que seguramente é a molécula de bufalina, decidiu-se verificar se os efeitos farmacológicos obtidos com a Rs5 eram também observados utilizando a bufalina comercial. Para isso os mesmos procedimentos cirúrgicos e experimentais foram realizados.

Ao se utilizar a BAC na mesma dose (1 µL de solução a 2 µg/µL) em que a fração Rs5 foi capaz de inibir crises induzidas por PTZ e NMDA, os resultados não foram os mesmos aos encontrados previamente, visto que somente crises induzidas por NMDA foram inibidas (100% de proteção) pela BAC (Tab. 7).

Tabela 7. Avaliação da ação anticonvulsivante da bufalina adquirida comercialmente (BAC)

Droga *	Animais tratados (n)	Animais protegidos (n)
PTZ + BAC	6	0
NMDA + BAC	6	6

* **BAC:** injeção *via i.c.v.*, 1 µL (2 µg/µL)
PTZ: injeção *via i.p.*, dose de 80 mg/kg
NMDA: injeção *via i.c.v.*, 1 µL (20 µg/µL)

Os resultados demonstrados neste experimento indicam que a fração Rs5 pode ter mais de um componente capaz de inibir crises convulsivas por diferentes mecanismos, uma vez que os resultados de massas mostraram que essa fração não está totalmente pura (Fig. 13A).

Hormônios endógenos que apresentam núcleo esteroidal, como por exemplo, a progesterona, demonstraram ações de inibição contra crises convulsivas, tendo ainda o efeito potencializado quando adicionado junto a estrógeno, outra molécula esteroidal (REDDY; ROGAWSKI, 2009). Receptores do tipo GABA_A podem ser modulados por moléculas esteroidais. No sistema nervoso central pode ser detectada a presença de neuroesteroides (HERD et al., 2007). Estes estudos indicam que moléculas esteroidais podem interferir com o sistema nervoso.

Ensaio prévios com a fração Rs3 realizados por Baldo (2010) demonstraram que, as doses ensaiadas (1, 2 e 4 µg - 1µL) não foram eficazes para inibir as crises convulsivas induzidas por PTZ e/ou NMDA. Percebeu-se também nestes ensaios que quanto maior a dose menor o tempo de latência para os ratos desenvolverem crise. Baseado nesses estudos preliminares, doses menores foram utilizadas para análise em modelo de crise induzida por PTZ, no qual a Rs3 demonstrou-se mais eficaz.

A Rs3 foi utilizada em duas doses diferentes (0,25 e 0,5 µg - 1µL), como apresentado na figura 19. Os resultados demonstraram que a menor dose da fração não foi capaz de inibir crise convulsiva em ratos injetados com PTZ, mas aumentou o tempo de latência para o início do SE (*status epilepticus*) em relação ao controle. Pode-se observar também que um dos animais tratados com a Rs3 (0,25 µg - 1µL) não morreu após o SE, fato que ocorreu com todos os animais do grupo controle. Já os animais que não resistiram, levaram um tempo maior que os do grupo controle, que morreram rapidamente após o início do SE. O aumento do tempo de latência para o início da crise, quando a Rs3 foi administrada, sugere uma ação depressora do SNC.

Na dose de 0,5 µg, a Rs3 inibiu crise convulsiva em dois ratos do grupo (n = 6), mas não se demonstrou eficaz em aumentar o tempo de latência para o início das mesmas. Este resultado demonstra mais uma vez correlações com ações depressoras no sistema nervoso central, apesar de não ter inibido 100% das crises induzidas por PTZ.

Figura 19: Latências para o desencadeamento de crises induzidas pelo PTZ após a injeção de diferentes concentrações da Rs3 (0,25 e 0,5 µg – 1 µL). Os dados (médias ± EPM) foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Dunnett. (*) $p < 0,05$, alteração significativa em relação ao controle (salina). Os números entre parênteses acima das colunas representam o número de animais utilizados nos ensaios.

Moléculas esteroidais, como os hormônios progesterona e estradiol e seus metabólitos, apresentam grande influência no comportamento e humor de mulheres. A alopregnanolona e a pregnanolona são considerados neuroesteroides e interagem com o receptor GABA_A (BÄCKSTRÖM et al., 2015). A alopregnanolona é um derivado da progesterona e apresenta propriedades ansiolíticas potentes devido a sua atuação como um modulador alostérico no receptor GABA_A (SRIPADA et al., 2013). Além das propriedades ansiolíticas, a alopregnanolona demonstrou-se também eficaz como anestésico e anticonvulsivante em vários modelos animais de crises induzidas (DHIR; CHOPRA, 2015).

Em baixas concentrações, alguns neuroesteroides moduladores de receptores GABA_A se ligam em locais diferentes do neurotransmissor GABA, benzodiazepínicos, etanol e barbitúricos. Quando ocorre a ligação, essas moléculas podem atuar como moduladores positivos ou negativos da função de GABA_A. Em concentrações nanomolares, a pregnanolona apresenta sinergismo com o neurotransmissor GABA em GABA_A, potencializando sua

ação. Quando essas concentrações são elevadas ela ativa diretamente o seu receptor (IRWIN; BRINTON, 2014).

Mecanismos de modulação de receptores GABA_A podem ser estudados por meio de ensaios em que crises convulsivas são induzidas por PTZ. Com base nos ensaios realizados com a BAC (Tab. 7), pode-se inferir que a inibição das crises induzidas por PTZ demonstrada pela fração Rs5 descrita por Baldo, (2010), deve ser causada pelo sinergismo entre ela e outros componentes presentes na fração Rs5 do veneno de *Rhinella schneideri*.

A inibição de crises convulsivas induzidas por NMDA está relacionada a um mecanismo glutamatérgico, visto que o mesmo é um agonista do receptor de glutamato (principal neurotransmissor excitatório central). O NMDA é, portanto, uma molécula que atua excitando o sistema nervoso central e, como consequência, desencadeia crises convulsivas.

O glutamato, presente em excesso na fenda sináptica, resulta em uma superestimulação dos seus receptores, que eleva o influxo de Ca²⁺, gerando danos neuronais por excitotoxicidade (LOUZADA-JUNIOR et al., 1992). Tal dano excitotóxico mostra-se importante em várias doenças, como: isquemia, trauma, doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e acidente vascular cerebral (MELDRUM, 1994; OLNEY et al., 1997; CHOI, 1998).

O mecanismo de captação do glutamato é fundamental para prevenir a excitotoxicidade, causada pela elevação dos seus níveis (GEGELASHVILI; SCHOUSBOE, 1997; DANBOLT, 2001), uma vez que excesso de glutamato na fenda sináptica resulta, quase sempre, em morte neuronal (LENT, 2004; MORTENSEN et al., 2015).

Dentro deste contexto, não foram encontrados na literatura consultada, nenhum relato de moléculas esteroidais oriundas de sapo que modulassem o sistema glutamatérgico. A molécula de bufalina inibiu 100% das crises induzidas por NMDA (Tab. 7). Dessa forma, pode-se dizer que este é o primeiro relato de inibição de crises convulsivas por bufadienolídeos.

Ao analisar os resultados obtidos com a Rs3 nos experimentos de crises convulsivas induzidas por PTZ junto aos dados de literatura envolvendo neuroesteroides, pode-se sugerir que a Rs3 possui uma ação modulatória em GABA_A ou uma ação potencializadora da ação do neurotransmissor GABA, como por exemplo, uma inibição de sua recaptação.

Considerando os resultados obtidos com a bufalina e a relevância do sistema glutamatérgico e GABAérgico em diferentes patologias, pode-se inferir que uma molécula que atua nestes sistemas possui um grande potencial biotecnológico. Ela pode ser utilizada para o desenvolvimento de fármacos para tratar doenças do sistema nervoso central. Sendo assim, os resultados aqui apresentados poderiam fornecer novas e relevantes informações sobre alvos terapêuticos, para uma molécula bem estudada e definida, como a bufalina e Rs3.

4.6. Avaliação histológica para caracterização da ação neuroprotetora da Rs5 em ensaios agudos *in vivo*.

A Rs5 se mostrou eficaz em modelos animais envolvendo crises convulsivas agudas induzidas por PTZ e NMDA (Baldo, 2010). Assim, decidiu-se realizar ensaios para a avaliação do potencial neuroprotetor da molécula em crises agudas induzidas por pilocarpina (PILO). Foram determinadas as alterações histológicas em três regiões do hipocampo: CA1 (Fig. 20), CA3 (Fig. 21) e hilus do giro dentado (Fig. 22). A PILO foi a droga indutora de crise escolhida, pois é um alcaloide agonista colinérgico que atua em receptores muscarínicos, sendo assim ela excita o sistema nervoso central causando o SE. O motivo da escolha foi que as crises induzidas por pilocarpina podem ser controladas e os animais não chegam a morrer, sendo possível realizar um tratamento durante 72 horas. Os grupos (n= 6) foram divididos em NAIVE (animais sem qualquer tipo de intervenção), animais que sofreram intervenção cirúrgica e foram tratados apenas com solução salina (0,9% NaCl) na ausência de SE, animais que sofreram intervenção cirúrgica e foram induzidos a SE sendo tratados com salina (SE + salina) e animais que foram induzidos a SE e foram submetidos ao tratamento com diferentes doses de Rs5 (1,0; 2,0 e 4,0 µg). Os resultados das densidades estimadas de neurônios demonstraram que o dano neuronal maior ocorreu no grupo que sofreu o SE e foi tratado apenas com salina (salina + SE). Esse grupo apresentou perda neuronal relativa em relação ao grupo NAIVE nas regiões CA1 e CA3 de 44,8% e 45,6%, respectivamente (Fig. 23). Na região do *hilus* do giro denteado a perda neuronal foi maior, apresentando 70,2% em relação ao grupo NAIVE.

Os resultados envolvendo o tratamento com a Rs5 mostraram-se eficazes em relação ao grupo SE + salina, apresentando diferenças quanto à perda celular. Nas doses (2,0 e 4,0 μg) houve uma diminuição da perda neuronal sugerindo a ocorrência de neuroproteção. As diferenças na quantidade de células foram significativas após a análise de ANOVA seguida por *Student-Newman-Keuls*, realizadas após o SE como pode ser observado na Figura 23.

Os ensaios envolvendo a indução de SE agudo seguido por tratamento durante 72 horas utilizando-se diferentes concentrações da fração Rs5, sugerem uma atividade neuroprotetora em relação ao grupo controle SE + salina.

Figura 20. Imagens representativas da marcação de *Nissl* em secções hipocâmpais de 20 μm da camada piramidal da região CA1 do hipocampo após ensaios agudos envolvendo crises convulsivas induzidas por pilocarpina. Os grupos experimentais (A) NAIVE, (B) Salina, (C) Salina + SE, (D) Rs5 1,0 μg + SE, (E) Rs5 2,0 μg + SE, e (F) Rs5 2,0 μg + SE, utilizando-se um aumento de 400x.

Figura 21. Imagens representativas da marcação de *Nissl* em secções hipocâmpais de 20 μ m da camada piramidal da região CA3 do hipocampo após ensaios agudos envolvendo crises convulsivas induzidas por pilocarpina. Os grupos experimentais (A) NAIVE, (B) Salina, (C) Salina + SE, (D) Rs5 1,0 μ g + SE, (E) Rs5 2,0 μ g + SE, e (F) Rs5 2,0 μ g + SE, utilizando-se um aumento de 400x.

Figura 22. Imagens representativas da marcação de *Nissl* em secções hipocâmpais de 20 μ m da região do *hilus* do giro denteado em ensaios agudos envolvendo crises convulsivas induzidas por pilocarpina. Os grupos experimentais (A) NAIVE, (B) Salina, (C) Salina + SE, (D) Rs5 1,0 μ g + SE, (E) Rs5 2,0 μ g + SE, e (F) Rs5 2,0 μ g + SE, utilizando-se um aumento de 400x.

Figura 23: Perda celular nas regiões hipocâmpais (A) CA1, (B) CA3 e (C) *hilus* do giro dentado após crise aguda induzida por pilocarpina. Os dados são expressos como porcentagem de perda celular em relação ao grupo NAIVE. Para a análise estatística utilizou-se ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de *Studente-Newman-Keuls*. * $p < 0,05$ em relação ao controle positivo (salina + SE).

Neuroesteroides são moléculas cada vez mais estudadas devido à grande eficácia demonstrada em ensaios realizados no sistema nervoso central. Foi demonstrado que a administração de pregnanolona diminuiu a formação de células glióticas no córtex cerebral e em hipocampo de ratos quando submetidos à lesão. Esta molécula apresenta também efeitos neuroprotetores contra glutamato e proteína beta-amiloide (VALLÉE, 2015). Por essas moléculas apresentarem estruturas muito semelhantes aos esteroides do grupo da classe dos heterosídeos cardiotônicos, pode-se sugerir uma correlação na neuroproteção observada com a Rs5.

A neurodegeneração pode ocorrer através de apoptose, necrose ou ambos. Existem muitos mecanismos e moduladores neuroquímicos responsáveis pelos danos do sistema nervoso central. Entre estes, os mais importantes que contribuem para a morte de células neuronais são: fatores genéticos, excitotoxicidade mediada por glutamato levando a perturbações em cálcio intracelular e metabolismo de sódio, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, retirada de fatores de crescimento, citocinas e toxinas. Pesquisas recentes tem demonstrado que os neuroesteroides apresentam uma função neuroprotetora contra esses agentes (WOJTAL et al., 2006).

Ensaio realizado com moléculas de sapo no sistema nervoso central são raros, tornando este trabalho muito relevante em relação aos resultados de neuroproteção, pois é a primeira vez que se descreve este tipo de ação.

Segundo dados obtidos por Wang (2006) e colaboradores, a neriifolina, uma molécula da classe dos heterosídeos cardiotônicos e que é extraída da planta *Thevetia peruviana*, promoveu neuroproteção contra isquemia. A administração dessas moléculas aumentou o número de neurônios viáveis em ratos que sofreram danos neuronais. O estudo também comparou ações das moléculas digoxina, digitoxina e oubaína, as quais não demonstraram níveis significantes de neuroproteção.

Concentrações subnanomolares de oubaína e digoxina foram capazes de inibir a apoptose de neurônios quando submetidos a estresse induzido com glutamato e kainato. Algumas hipóteses sugerem que ao se ligarem na enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ eles emitem sinalizações anti-apoptóticas (SIBAROV et al., 2015). É importante ressaltar que esses estudos encontrados na literatura

foram conduzidos utilizando-se cardenolídeos, moléculas oriundas do metabolismo secundário vegetal e não animal como descritos neste trabalho.

4.7. Avaliação de alterações mitocondriais na presença de toxinas do veneno de *Rhinella schneideri*

Devido aos resultados obtidos nos ensaios de neuroproteção, iniciou-se a busca por alvos que poderiam ser ativados ou inibidos por heterosídeos cardiotônicos a fim de promover a neuroproteção.

Os heterosídeos cardiotônicos apresentam como alvo primário a enzima Na⁺K⁺ATPase. Quando o funcionamento desta enzima está comprometido, há alteração da concentração iônica no interior celular, principalmente Na⁺ e Ca²⁺. Nesta situação, ela tem demonstrado ações importantes em uma variedade de estados neuropatológicos e fenômenos apoptóticos (WANG et al., 2006).

As mitocôndrias apresentam um papel fundamental nos estágios apoptóticos celulares, tendo suas funções ligadas diretamente com alterações nas concentrações iônicas celulares, principalmente envolvendo os íons Ca²⁺ e Na⁺. As doenças mitocondriais representam o grupo mais comum de erros inatos do metabolismo. Adicionalmente, sintomas neurológicos, como atrofia, ataxia, convulsões, demência, síndromes extrapiramidais, ou neuropatia, são frequentemente associadas à disfunções mitocondriais. Isso reflete a elevada dependência do sistema nervoso central com a função da mitocôndria (MORAT et al., 2014). Dentro deste contexto, alterações na enzima Na⁺K⁺ATPase podem exercer influências diretas no funcionamento mitocondrial.

4.7.1. Determinação dos níveis mitocondriais de ATP

Foram utilizadas mitocôndrias isoladas de fígado de rato devido a facilidade e rapidez do processo e à grande semelhança existente entre as mitocôndrias de neurônios e hepatócitos.

Neste ensaio o ATP presente na amostra é consumido durante a oxidação da Luciferina, catalisada pela enzima luciferase com emissão de luz, conforme reação:

Quando as concentrações de luciferina, luciferase e oxigênio são mantidas constantes, o ATP é o reagente limitante, e a quantidade de luz emitida é proporcional ao ATP presente no meio (THORE, 1979).

Os níveis mitocondriais de ATP foram avaliados após 15 minutos de incubação das mitocôndrias com as amostras de Rs5. (Fig. 24).

Figura 24: Efeitos da Rs5 em diferentes concentrações sobre o nível de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. A queda nos níveis de ATP foi induzida por CCCP 1mmol/L (controle positivo). Os resultados representam a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. *p < 0,05 - estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

Através dos resultados obtidos, nota-se que não houve variação significativa dos níveis de ATP quando as amostras de Rs5 foram adicionadas ao meio. Estes dados confirmam que a Rs5, nas concentrações utilizadas, não foi capaz de interferir nos parâmetros respiratórios, não interferindo na produção de ATP, e mantendo os níveis de ATP semelhantes aos do controle negativo.

Disfunções mitocondriais estão geralmente relacionadas ao estresse oxidativo. A maior parte da deficiência motora que ocorre em algumas doenças pode ser atribuída à perda ou degeneração mitocondrial. Axônios apresentam uma demanda extremamente elevada de energia, essa energia é necessária para manter o gradiente iônico e para suportar a neurotransmissão (MORAT et al., 2014).

Como os resultados demonstraram que não ocorreu perda de ATP, a energia necessária para manter as funções essenciais das células não foi comprometida pela presença da Rs5.

4.7.2. Potencial de membrana mitocondrial

Alterações no processo de fosforilação oxidativa ou quando sinais de morte afetam a mitocôndria podem levar ao colapso do potencial de membrana interna mitocondrial (SLUSE; JARMUSZKIEWICZ, 1998). Desta forma, foi avaliada a habilidade da Rs5 em dissipar o potencial de membrana mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. O CCCP foi utilizado como controle positivo, levando à dissipação total do potencial (Fig. 25).

Figura 25. Efeitos da Rs5 em diferentes concentrações sobre o potencial de membrana mitocondrial, avaliados com safranina-o e CCCP 2 μ M como controle positivo. Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. U.F.A. (Unidade de Fluorescência Arbitrária).

Os resultados obtidos demonstram que o Rs5 não foi capaz de alterar o potencial de membrana mitocondrial em nenhuma das concentrações testadas (1-1000 nM).

4.7.3. Inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial está associado à alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial provocada por vários fatores, tais como íons, agentes desacopladores, estado inicial das mitocôndrias, condições de incubação e interferências na respiração ou fosforilação. Este processo de intumescimento é observado na amostra mitocondrial levada a espectrofotômetro, acompanhando-se a diminuição da dispersão de luz (CÂMARA et al., 2001).

A capacidade da Rs5 em alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial foi avaliada através do ensaio de inchamento mitocondrial. O fosfato inorgânico (Pi) foi utilizado para induzir o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, gerando intumescimento da mitocôndria e consequente diminuição da turbidez da suspensão, resultando em uma redução da absorbância em 540 nm (Fig. 26).

Observou-se que nas concentrações mais elevadas testadas da Rs5 (100, 500 e 1000 nM), esta foi capaz de aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial (Fig. 26), como evidenciado pela redução dos valores de absorbância (Fig. 26 – inserto).

Figura 26. Efeito da Rs5 em diferentes concentrações sobre a indução do inchamento mitocondrial. O controle positivo foi induzido com Fosfato Inorgânico (Pi) 1 mmol/L. Os resultados são a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. Inseto: traçados representativos obtidos com todas as amostras em um dos ensaios. * $p < 0,05$ alteração significativa em relação ao controle.

4.7.4. Movimentação e Liberação de Ca^{2+}

A homeostase cálcica é fundamental para o bom funcionamento das mitocôndrias. O teste de análise de captação e efluxo de cálcio pelas mitocôndrias foi realizado utilizando CCCP 2 μM como controle positivo (dissipa o potencial de membrana). As amostras de Rs5 foram adicionadas após aproximadamente 100 segundos do início do ensaio para verificação dos seus efeitos (Fig. 27).

Figura 27. Efeitos da Rs5 sobre o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial, avaliados usando Calcium Green. Succinato (5mM) foi adicionado à suspensão mitocondrial para estimular a captação de cálcio. As amostras foram adicionadas por volta de 100 segundos após o início do ensaio. O CCCP 2 μM foi utilizado como controle positivo. Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. U.F.A. (Unidade de Fluorescência Arbitrária).

É geralmente aceito que a despolarização neuronal crônica seguida pelo aumento da concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma celular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) inicia a apoptose neuronal, que acontece durante o estresse no processo de excitotoxicidade (SIBAROV et al., 2012).

Os resultados (Fig. 27) demonstram que a Rs5 não interferiu na movimentação do cálcio nas mitocôndrias. Alterações na homeostase do cálcio podem induzir a formação de poros na membrana mitocondrial, alterando a sua permeabilidade e levando ao inchamento mitocondrial.

Analizando os resultados obtidos com a mitocôndria quando submetida a situações de estresse e tratada com diferentes concentrações de Rs5, percebeu-se que a mesma não induz disfunções mitocondriais e a mitocôndria manteve as suas atividades normais.

A membrana interna mitocondrial também exprime um permutador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (diferente do trocador do sarcolema $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). Esta é a principal via

para o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial. Estas vias de efluxo de Ca^{2+} mitocondrial são os principais reguladores da normalidade intramitocondrial (BERS, 2010).

Estudos recentes analisaram se os glicosídeos podem prejudicar a energética mitocondrial em miócitos cardíacos devido à elevação $[\text{Na}^+]_i$. A homeostase mitocondrial de Ca^{2+} desempenha um papel central no fornecimento de energia. O aumento do Na^+ estimula o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e traz problemas para os processos oxidativos envolvendo NADH em células cardíacas (LIU et al., 2010). Sendo assim pode-se explicar o inchamento celular ocorrido quando houve o aumento da dose de Rs5.

Os resultados obtidos demonstram que a Rs5 pouco afeta a função mitocondrial, porém nas maiores doses ela pode induzir disfunção mitocondrial, provavelmente por causar aumento da $[\text{Na}^+]_i$.

4.8. Avaliação *in vitro* dos efeitos das frações Rs3, Rs4 e Rs5 e BAC nos transportadores de neurotransmissores (glutamato, serotonina, dopamina, e noradrenalina, GABA e glicina).

Na tentativa de esclarecer o mecanismo de ação envolvendo das frações Rs3, Rs4 e Rs5, isoladas do veneno de *Rhinella schneideri*, ensaios de recaptação de neurotransmissores foram realizados. Esses ensaios se justificam pois um aumento ou diminuição de neurotransmissores na fenda sináptica pode causar desequilíbrios na transmissão do impulso nervoso.

As frações Rs3 e Rs5 apresentaram resultados positivos em relação às crises convulsivas induzidas por PTZ e NMDA, isso pode decorrer de uma diminuição de neurotransmissores excitatórios ou aumento de depressores na fenda sináptica.

4.8.1. Ensaios de recaptação para avaliar os efeitos dose-resposta de Rs3, Rs4, Rs5 e BAC em vários transportadores de neurotransmissores

Para estes ensaios, células COS-7 foram cultivadas e transfectadas com o respectivo material genético e após o tempo de espera para a expressão dos transportadores específicos iniciou-se os ensaios de recaptação.

A determinação dos efeitos das frações Rs3, Rs4 e Rs5 e BAC sobre a recaptação de neurotransmissores foi realizada para os transportadores de glutamato, monoaminas (dopamina, serotonina e norepinefrina), GABA e glicina.

Vale ressaltar que ensaios dessa natureza com esse tipo de molécula são inéditos na literatura e este trabalho é o primeiro a demonstrar os efeitos de heterosídeos cardiotônicos de sapos em transportadores de recaptação de neurotransmissores. Sendo assim, a dificuldade em discutir os resultados com base em estudos prévios é expressiva.

Transportadores de neurotransmissores desempenham papéis críticos na regulação da neurotransmissão. Sendo assim são extremamente importantes para a modulação das respostas fisiológicas que envolvem homeostase, o estresse, comportamento, motivação e recompensa (TIMPLE et al., 2013).

O veneno bruto da aranha *Parawixia bistriata* quando aplicado ao sistema nervoso de ratos induz convulsões, enquanto que frações de veneno sem conter a parte protéica, inibiu crises convulsivas generalizadas tônico-clônicas induzidas com os antagonistas GABAérgicos, bicuculina, picrotoxina e pentilenotetrazol (PTZ). Além disso, em sinaptossomas de rato, o veneno bruto aumentou a recaptação do L-glutamato (L-Glu) e inibiu a captação de GABA (FACHIM et al., 2011).

Os transportadores de amino ácido excitatórios são fundamentais para manter em níveis baixos as concentrações de glutamato no meio extracelular. Esta função do transportador de glutamato é crucial para evitar a neurotoxicidade (FONTANA et al. 2007).

Os resultados obtidos mostraram uma atividade dose-resposta das frações Rs3 e Rs5 em todos os transportadores estudados. A BAC apresentou

ações de inibição e/ou aumento da atividade do transportador, sem exibir ação dose resposta, não sendo possível o cálculo da EC_{50} ou IC_{50} . A fração Rs4 apresentou ação sobre determinados neurotransmissores, mas com resultados ambíguos. Estes resultados de inibição ou aumento da atividade juntamente com as EC_{50} ou IC_{50} podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8. Atividade das frações Rs3, Rs4 e Rs5 e também da BAC sobre transportadores de neurotransmissores.

Amostras	Transportadores de Neurotransmissores							
	EAAT1	EAAT2	EAAT3	DAT	SERT	NET	GAT-1	GlyT
Rs3	x	x	x	Inibição da atividade $IC_{50} = 0,349$ $\pm 0,174$	Inibição da atividade $IC_{50} = 0,199$ $\pm 0,142$	Inibição da atividade $IC_{50} = 0,074$ $\pm 0,049$	Inibição da atividade $IC_{50} = 0,029$ $\pm 0,029$	Inibição da atividade $IC_{50} = 0,08$ $\pm 0,055$
Rs4	x	x	x	Inibição da atividade $IC_{50} = *$	Inibição da atividade $IC_{50} = *$	Inibição da atividade $IC_{50} = *$	Sem efeito	Aumentou a atividade $IC_{50} = *$
Rs5	Inibição e aumento da atividade	Inibição e aumento da atividade	Inibição e aumento da atividade	Inibição da atividade $IC_{50} = 0,063$ $\pm 0,014$	Inibição da atividade $IC_{50} = 0,090$ $\pm 0,065$	Inibição da atividade $IC_{50} = 0,079$ $\pm 0,097$	Inibição da atividade $IC_{50} = 0,010$ $\pm 0,010$	Inibição da atividade $IC_{50} = 0,021$ $\pm 0,015$
BAC	Inibição e aumento da atividade	Aumento da atividade	Inibição e aumento da atividade	Inibição da atividade $IC_{50} = *$	Inibição da atividade $IC_{50} = *$	Inibição da atividade $IC_{50} = *$	Inibição da atividade $IC_{50} = *$	Inibição da atividade $IC_{50} = *$

* Não foi possível obter o valor de IC_{50}

IC_{50} = Concentração Inibitória 50% ; EC_{50} = Concentração Efetiva 50%

Os resultados são a média $\pm$ SE de pelo menos 3 ensaios independentes realizados em quadruplicatas. $P < 0,05$ – alteração significativa em relação ao controle.

Como a Rs5 demonstrou-se eficaz em inibir crises convulsivas induzidas por NMDA, optou-se por buscar algum tipo de mecanismo envolvendo esta molécula e a BAC juntamente ao neurotransmissor glutamato. Ao realizar ensaios de recaptação de glutamato utilizando essas moléculas, percebeu-se que os resultados se modificavam em experimentos independentes, não apresentando uma correlação nas doses-respostas. Alguns experimentos aumentaram a captação de glutamato sugerindo uma possível depressão da neurotransmissão e outros inibiram a recaptação o que causaria neurotoxicidade (Figs. 28 e 29).

Os transportadores de aminoácido excitatório (EAAT) realizam o transporte do neurotransmissor glutamato do meio extracelular para o meio intracelular utilizando energia. Para este processo ele necessita de um co-substrato que é o Na^+ . O transportador se abre para o lado externo, capta o neurotransmissor junto ao co-substrato e muda sua conformação liberando-os no meio intracelular (MORTENSEN et al., 2015).

A $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ regula os níveis celulares de Na^+ e K^+ e, como os heterosídeos cardiotônicos são inibidores dessa enzima pode ocorrer a interferência no transporte de glutamato via diferenças no gradiente iônico, visto que este tipo de transporte é dependente desses dois íons.

Além da dependência indireta sobre a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ através de gradientes de íons, ainda existe a possibilidade de uma ligação mais expressiva entre transportadores de glutamato e $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. Experimentos utilizando a ouabaína mostraram que a inibição da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ pode atrapalhar a atividade do transportador de glutamato e a injeção desta em cérebro de ratos recém-nascidos induz excitotoxicidade (ROSE et al., 2009).

A Figura 28 apresenta perfis de recaptação de glutamato em que (A) e (C) demonstram um aumento da captação e (B) e (D) demonstram uma inibição da recaptação. Sendo assim é impossível avaliar a interferência da Rs5 na recaptação de glutamato. Os efeitos observados podem estar relacionados a um mecanismo indireto envolvendo a inibição da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar esta interferência.

Figura 28. Perfis representativos de recaptação de glutamato em transportadores (A e B) EAAT1, (C e D) EAAT2 e (E e F) EAAT3, na presença de diferentes concentrações de Rs5 (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 μM). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas.

Figura 29. Perfis representativos de recaptação de glutamato em transportadores (A e B) EAAT1, (C e D) EAAT2 e (E e F) EAAT3, na presença de diferentes concentrações de BAC (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 μ M). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas.

Observa-se também que a BAC atua principalmente como inibidor do transportador de glutamato, mas os resultados também não são conclusivos.

Na busca de possíveis alvos para prováveis mecanismos de ação na inibição de crises e na neuroproteção, decidiu-se realizar também ensaios de recaptação em neurotransmissores de dopamina, serotonina, norepinefrina, GABA e glicina com as frações Rs3 (Fig. 30), Rs4 (Fig. 31) e Rs5 (Fig. 32). Os resultados demonstram uma inibição na recaptação desses neurotransmissores, com destaque para as moléculas Rs3 (Fig 30) e Rs5 (Fig 32) que mostraram uma ação dose-dependente.

Figura 30. Perfis representativos de recaptação de diferentes neurotransmissores por seus transportadores específicos: (DAT) Transportador de dopamina, (SERT) transportador de serotonina, (NET) transportador de norepinefrina, (GAT) transportador de GABA e (Glyt) transportador de glicina, na presença de diferentes concentrações de Rs3 (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 μM). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas.

Figura 31. Perfis representativos de recaptação de diferentes neurotransmissores por seus transportadores específicos: (DAT) Transportador de dopamina, (SERT) transportador de serotonina, (NET) transportador de norepinefrina, (GAT) transportador de GABA e (Glyt) transportador de glicina, na presença de diferentes concentrações de Rs4 (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 μM). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas.

Nesses ensaios percebe-se que a fração Rs4 não modulou a ação destes transportadores.

Figura 32. Perfis representativos de recaptação de diferentes neurotransmissores em seus transportadores específicos: (DAT) Transportador de dopamina, (SERT) transportador de serotonina, (NET) transportador de norepinefrina, (GAT) transportador de GABA e (GlyT) transportador de glicina, na presença de diferentes concentrações de Rs5 (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 μM). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas.

Figura 33. Perfis representativos de recaptação de diferentes neurotransmissores em seus transportadores específicos: (DAT) Transportador de dopamina, (SERT) transportador de serotonina, (NET) transportador de norepinefrina, (GAT) transportador de GABA e (GlyT) transportador de glicina, na presença de diferentes concentrações de BAC (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 μM). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas.

A dopamina está envolvida em processos neurológicos de aprendizagem e desempenha um papel importante nas funções normais de atenção, humor, memória e sono. A norepinefrina desempenha um papel na aprendizagem, memória, atenção e percepção da dor. O GABA é o principal neurotransmissor depressor presente em nosso sistema nervoso, sendo responsável por todo processo inibitório das transmissões nervosas (TIMPLE et al., 2013).

Sendo assim, essas moléculas que apresentam uma ação sobre os transportadores destes neurotransmissores poderão ser utilizadas em estudos futuros envolvendo neurotransmissores do tipo aminas biogênicas. Estes estudos poderão auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos para reverter patologias envolvendo neurotransmissores.

4.9. Avaliação do potencial ansiolítico da Rs3 e Rs5 em modelos de claro/escuro e labirinto em cruz elevado (LCE).

Com os resultados obtidos nos ensaios de recaptação de neurotransmissores, os quais demonstraram inibições em transportadores de dopamina, serotonina, norepinefrina e GABA, decidiu-se realizar experimentos comportamentais para avaliação do potencial ansiolítico causado por pelas drogas Rs3 e Rs5.

Desordens envolvendo monoaminas podem causar disfunções neurológicas desde ordem psiquiátricas como depressão, esquizofrenia, ansiedade até mesmo doenças que causam a morte neuronal através de desordens mitocondriais e epilepsia (NG et al., 2015).

Mais uma vez esses dados são apresentados pela primeira vez, sendo que moléculas como os bufadienolídeos são pouco estudadas nesses modelos. Sendo assim a relevância de informações aqui obtidas são de grande valor científico.

4.9.1. Labirinto em cruz elevado

Ratos foram divididos em grupos (n = 6) e induzidos à crise convulsiva por pilocarpina dois dias antes do início desses experimentos, com exceção do grupo NAIVE. Os resultados do labirinto em cruz elevado mostraram que os comportamentos se assemelham entre os animais tratados com Rs3 e não tratados,

não havendo diferença estatística nos comportamentos de auto limpeza, elevação, comportamento exploratório, tempo gasto nos braços abertos e tempo gasto nos braços fechados. O único comportamento que apresentou diferença significativa foi o tempo de permanência parado. Os animais tratados com 0,5 µg de Rs3 ficaram mais tempo parado que os animais do grupo controle salina (Fig. 34).

Figura 34. Comportamentos apresentados por animais tratados com Rs3. (AL) auto limpeza, (E) elevação, (P) tempo de permanência parado, (EXP) tempo gasto em comportamento exploratório (A) tempo gasto nos braços abertos e (F) tempo gasto nos braços fechados. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, (*) $p < 0,05$ alteração significativa em relação ao grupo salina.

Os animais quando tratados com a Rs5 não demonstraram diferenças estatísticas em ensaios de LCE em relação ao comportamento de elevação, porém demonstraram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo salina, como demonstra a figura 35. Foi observado que os animais passaram grande parte do tempo nos braços fechados.

Animais tratados com pilocarpina, um agonista colinérgico inespecífico, apresentam crises epilépticas agudas que podem ser recorrentes após um período de aproximadamente 30 dias. Isso ocorre devido a uma grande liberação de glutamato na região do hipocampo. Essas atividades podem alterar o comportamento emocional das pessoas e em modelos animais, sendo a ansiedade a mais comum das alterações (DUARTE et al., 2013).

Figura 35. Comportamentos apresentados por animais tratados com Rs5. (AL) auto limpeza, (E) elevação, (P) tempo de permanência parado, (EXP) tempo gasto em comportamento exploratório (A) tempo gasto nos braços abertos e (F) tempo gasto nos braços fechados. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, (*) $p < 0,05$ alteração significativa em comparação com o grupo salina.

O modelo de epilepsia envolvendo a pilocarpina é o mais utilizado, pois pode ser utilizado de forma crônica, sendo assim pode ser estudado alterações causadas por crises convulsivas e distúrbios do humor. As crises convulsivas são responsáveis alterações comportamentais tais como depressão, ansiedade, psicose e alterações cognitivas (OLIVEIRA et al., 2015).

4.9.2. Caixa claro/escuro

As mesmas condições experimentais do LCE foram utilizadas. Ratos foram divididos em grupos ($n = 6$) e induzidos a crise convulsiva por pilocarpina dois dias antes do início desses experimentos, com exceção do grupo NAIVE. Neste experimento buscou-se avaliar se animais que apresentaram crises convulsivas apresentariam comportamento diferenciado dos grupos tratados. Os resultados obtidos nos ensaios da caixa claro escuro demonstraram que ratos induzidos à crise passaram mais tempo nos braços abertos que os tratados que se assemelharam ao grupo NAIVE (Fig 36). Os animais tratados com $1,0 \mu\text{g}$ de Rs3 e Rs5 assemelharam-se muito com o comportamento normal (NAIVE), indicando que as drogas podem reverter comportamentos de estresse após as crises.

Figura 36. Tempo gasto na área clara em grupos não tratados (salina) e tratados com diferentes doses das frações Rs3 (0,5 e 1,0 µg) e Rs5 (1,0 e 2,0 µg). Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de *Tukey*, considerando (*) $p < 0,05$ alteração significativa em comparação ao grupo NAIVE.

A caracterização de compostos que afetam os transportadores de dopamina, noradrenalina e GABA são importantes porque esses locais tornaram-se alvos estabelecidos de condições farmacológicas. Estes estudos podem levar ao desenvolvimento de novos medicamentos para pacientes sofrendo com doenças neurológicas e psiquiátricas (TIMPLE et al., 2013).

4.10. Avaliação comportamental de ratos tratados com a Rs3 e Rs5 através de ensaios de medo contextual

O protocolo experimental foi realizado em três dias. No Primeiro dia, foi empregada a sessão de habituação, onde os animais foram expostos individualmente, durante 10 minutos, à caixa, para familiarização com o ambiente (LISBOA et al., 2010). No segundo dia, foi realizada a sessão de extinção, que consiste em expor, individualmente, os animais à mesma caixa onde foram previamente habituados e condicionados, durante 30 min (SUZUKI et al., 2004), na ausência de choques elétricos (estímulo condicionado). No terceiro dia, teste, foi avaliada a retenção da memória de extinção, que consiste em expor os animais na presença das drogas Rs3 (1,0 µg) e Rs5 (2,0 µg) e grupos controle ($n = 6$),

individualmente, à mesma caixa utilizada nas sessões do dia 1 e dia 2, durante 10 min.

Os resultados demonstraram que ambas as frações foram capazes de reduzir o tempo de congelamento, o que significa que a droga apresentou ações ansiolíticas nos animais (Fig 37 e 38).

Figura 37: Avaliação comportamental em ensaios de medo contextual em grupos não tratados (salina) e tratados com a fração Rs3 (1,0 µg). Os dados apresentados correspondem às 3 fases do ensaio: condicionamento, extinção e ensaio propriamente dito. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de duas vias Os números entre parênteses representam o número de animais utilizados.

Figura 38: Avaliação comportamental em ensaios de medo contextual em grupos não tratados (salina) e tratados com a fração Rs5 (2,0 µg). Os dados apresentados correspondem às 3 fases do ensaio: condicionamento, extinção e ensaio propriamente dito. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de duas vias Os números entre parênteses representam o número de animais utilizados.

Os dados apresentados nesse experimento demonstram diferenças estatísticas entre o tempo de congelamento entre os grupos tratados e não tratados. O que sugere uma ação na extinção do medo contextual.

Mecanismos GABAérgicos tem se demonstrado eficazes em terapias celular para a esquizofrenia e dor crônica sendo muito utilizado também em desordens psiquiátricas como ansiedade (TIMPLE et al., 2013 e SHETTY; BATES, 2015).

Outro mecanismo que pode estar associado é o aumento de monoaminas na fenda sináptica, promovido pela inibição da recaptação em transportadores específicos promovido pelas frações Rs3 e Rs5.

Algumas evidências clínicas e experimentais sugerem que os desequilíbrios de neurotransmissores tais como GABA, glutamato, noradrenalina, e serotonina, que se presume que ocorra em doentes com epilepsia, pode contribuir simultaneamente para o desenvolvimento da depressão (WANDA et al., 2015).

Neste contexto os resultados sugerem um potencial dessas moléculas para atuar em mecanismos de patologias que envolvem neurotransmissores monoaminas.

Este trabalho apresentou novos alvos e mecanismos não estudados anteriormente para a ação de bufadienolídeos no sistema nervoso central.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

- O veneno permeado pela membrana de diálise apresenta componentes proteicos e esteroidais.
- Estudos de espectrometria de massas da Rs5 demonstraram que essa molécula é a bufalina.
- A Rs3 é capaz de inibir crises convulsivas e aumentar o tempo de latência para a ocorrência das mesmas.
- A Rs5 demonstrou-se eficaz em ensaios de neuroproteção em crises agudas induzidas por pilocarpina.
- A Rs5 em baixas doses não demonstrou alterações mitocondriais em ensaios de produção de ATP, potencial de membrana e movimentação de cálcio.
- Rs3 e Rs5 inibiram a recaptação de dopamina, serotonina, norepinefrina, GABA e glicina.
- Rs3 e Rs5 não demonstraram efeitos prejudiciais em ensaios comportamentais mostrando-se eficazes em tratamento de ratos induzidos a crise epilética.
- Rs3 e Rs5 apresentaram ações ansiolíticas em ensaios de medo contextualizado.

Referências

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE, M., Estimation of nuclear population from microtome sections. **The Anatomical Record**, v. 94, i. 2, p. 239–247, 1946.

AKERMAN, K.E.O.; WIKSTROM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **Febs Lett.**, v.68, p.191-197, 1976.

ALBERS, R.W. Biochemical aspects of active transport. **Ann Rev Biochem.**, v.36, p.727-66, 1967.

ALMEIDA F. M., PIMENTA A.M.C, OLIVEIRA M.C., DE LIMA M.E. Venoms, toxins and derivatives from the Brazilian fauna: valuable sources for drug discovery, **Acta Physiologica Sinica**, 67(3): 261–270, June 25, 2015.

ANJOLETTE, F. A. et al. Biological characterization of compounds from *Rhinella schneideri* poison that act on the complement system. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 21, p. 25, 2015.

BACKSTROM, T.; BIXO, M.; STROMBERG, J. GABAA Receptor-Modulating Steroids in Relation to Women's Behavioral Health. **Curr Psychiatry Rep**, v. 17, n. 11, p. 92, 2015.

BAGROV, A.Y.; ROUKOYATKINA, N.I.; FEDOROVA, O.V.; PINEV, A.G.; UKHANOVA, M.V.; Digitalis-like and vasoconstrictor effects of endogenous digoxin-like factor(s) from the venom of *Bufo marinus* toad. **European Journal of Pharmacology**, v.234, p. 165-172, 1993.

BAGROV, A.Y.; SHAPIRO, J.I.; FEDOROVA, O.V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological reviews**, v 61, p. 9–38, 2009.

BALDO M.A., LIBERATO J.L., GODOY L.D., DOS SANTOS W.F., ARANTES E.C. New Perspective for Therapy against Seizures Using Molecules from *Rhinella schneideri* Toad Poison, **Toxicon**, 60 (2012) 95–248, 2012.

BALDWIN, D. S. et al. Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: a revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. **J Psychopharmacol**, v. 28, n. 5, p. 403-39, 2014.

BARRAVIERA, B. Venenos Animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro, EPUC, cap.63 p.97-105, 1994.

BARRUETO, F. JR.; KIRrane, B. M.; COTTER, B. W.; HOFFMAN, R. S.; NELSON, L. S. Cardioactive Steroid Poisoning: A Comparison of Plant- and Animal-Derived Compounds. **Journal of Medical Toxicology**, v. 2, n. 4, p. 162-166, 2006.

BATISTA, R.C.; et al., Diet of *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) (Anura: Bufonidae) in the cerrado, Central Brazil. **Herpetology Notes**, v. 4, p.17- 21, 2011.

BEDFORD, P.G.C. Toad venom toxicity and its clinical occurrence in small animals in the United Kingdom. **Vet. Rec.**, v.94, n.26, p.613-614, 1974.

BELEBONI, R.O.; PIZZO, A.B.; FONTANA, A.C.; CAROLINO, R.O.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W.F. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. **Eur. J. Pharmacol.** 493:1-17. 2004.

BELZUNG C.; MISSLIN R.; VOGEL E.; DODD R.H.; CHAPOUTHIER G. Anxiogenic effects of methyl-beta-carboline-3-carboxylate in a light/dark choice situation. **Pharmacol Biochem Behav.** V. 28(1), p. 29-33, 1987.

BERS, D. M. Digitalis and Na/Ca exchange: old dog learns new mitochondrial tricks. **J Mol Cell Cardiol**, v. 49, n. 5, p. 713-4, 2010.

BICUDO, P.L. Envenenamentos em animais domésticos sobre causados por serpentes, artrópodes e sapos. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo, Sarvier, p.437-449, 2003.

BRAZIL, V.; VELLARD, J. Contribuição ao estudo dos Batrachios. Memórias do Instituto de Butantan, São Paulo, v. 3, p. 7-70, 1926.

BRAZIL, V.; VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno de batráchios do gênero *Bufo*. **Brazil-Medico.** Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p.176-180, 1926.

CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Eds.). **Biochemical Toxicology.** Oxford: IRL Press, p.217-254, 1987.

CAIRRÃO, M.A.R.; RIBEIRO, A.M.; PIZZO, A.B.; FONTANA, A.C.K.; BELEBONI, R.O.; COUTINHO-NETO J.; MIRANDA, A.; SANTOS, W.F. Anticonvulsant and GABA uptake inhibition properties of *P. bistriata* and *S. raptoria* spider venom fractions. **Pharm. Biol.**, 40: 472-477, 2002.

CÂMARA, R.L.B.; ROSELINO, J.E.S.; COLLI, B.O. *Swelling* mitocondrial em amostras teciduais de gatos submetidos à oclusão da artéria cerebral média. **Acta Cir. Bras.**, vol.16, suppl.1 São Paulo, 2001.

CARDENAS, F., LAMPREA, M. R., MORATO, S.). Vibrissal sense is not the main sensory modality in the rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, 122, 169-174. 2001

CATTERALL, W.A., CESTELE, S., YAROV-YAROVYOY, V., YU, F.H., KONOKI, K., SCHEUER, T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, 9(2):124-41, 2007.

CHANG, B. S.; LOWENSTEIN, D. H. Mechanisms of disease: Epilepsy. **N Engl J Med**, v. 349, p.1257-66, 2003.

CHI, H. T; HUNG M D.Z.; HU, W.H.; YANG, D.Y. Prognostic implications of hyperkalemia in toad toxin intoxication. **Human & Experimental Toxicology**, v.17, p.343-346, 1998.

CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. **Neuron**;v.1, p.623-634, 1998.

CLARKE, B.T. The Natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potencial medical applications. **Biol. Rev.**, United Kingdom, v.72, p. 366-379, 1996.

COGNATO GDE, P. et al. Antiepileptic drugs prevent changes induced by pilocarpine model of epilepsy in brain ecto-nucleotidases. **Neurochem Res**, v. 32, n. 6, p. 1046-55, 2007.

CRESS, L.M.; FREAS, W; HADDY, F.; MULDOON, S. Effect of bufalin on norepinephrine turnover in canine saphenous vein. **Hypertension**, 18, 516, 1991.

CUNHA-FILHO, G. A.; RESCK, I.S.; CAVALCANTI, B.C.; PESSOA, C.Ó.; MORAES, M.O.; FERREIRA, J.R.O.; RODRIGUES, F.A.R.; SANTOS, M.L. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, 1-10, 2010.

DALY, J.W.; GARAFFO, H.M.; HALL, G.S.E.; COVER, J.F. Absence of skin alkaloids in captive-raised Madagascan mantelline frogs (*Mantella*) and sequestration of dietary alkaloids. **Toxicon**, Bethesda, v.36, n.7, p.1131-1136, 1997.

DALY,J.W.; SPANDE,T.F.; GARAFFO, H.M. Alkaloids from Amphibian Skin: A Tabulation of Over Eight-Hundred Compounds. **J. Nat. Prod.**, v.68, 1556-1575, 2005.

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

DEAN, R.B. Theories of electrolyte equilibrium in muscle. **Biol Symp.**, v.3, p. 331-48, 1941.

DENAC H.; MEVISSEN M.; SCHOLTYSIK G. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, 362(6):453-79, 2000.

DHIR, A.; CHOPRA, K. On the anticonvulsant effect of allopregnanolone (a neurosteroid) in neonatal rats. **Life Sci**, v. 143, p. 202-8, 2015.

DORIS, P.A. Ouabain in plasma from spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, 266, H360, 1994.

DUARTE, F. S. et al. Anxiogenic-like profile of Wistar adult rats based on the pilocarpine model: an animal model for trait anxiety? **Psychopharmacology** (Berl), v. 227, n. 2, p. 209-19, 2013.

EMAUS, R.K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J.J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.850, p.436-448, 1986.

EVANS, W.C. Trease and Evan's pharmacognosy. 14 ed. London: WB Saunders, 1996.

FACHIM, H. A. et al. Neurobiological activity of Parawixin 10, a novel anticonvulsant compound isolated from *Parawixia bistriata* spider venom (Araneidae: Araneae). **Epilepsy Behav**, v. 22, n. 2, p. 158-64, 2011.

FARACH, F. J. et al. Pharmacological treatment of anxiety disorders: current treatments and future directions. **J Anxiety Disord**, v. 26, n. 8, p. 833-43, 2012.

FIORENZA N.G.; ROSA J.; IZQUIERDO I.; MYSKIW J.C. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. **Behav Brain Res**. V. 232(1), p. 210–6, 2012.

FONTANA, A. C. et al. Enhancing glutamate transport: mechanism of action of Parawixin1, a neuroprotective compound from *Parawixia bistriata* spider venom. **Mol Pharmacol**, v. 72, n. 5, p. 1228-37, 2007.

FONTANA, A. C. et al. Purification of a neuroprotective component of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate uptake. **Br J Pharmacol**, v. 139, n. 7, p. 1297-309, 2003.

FORNARI BALDO E.C., DA SILVA C. P., SAMPAIO S. V., ARANTES E.C. Evaluation of the Cytotoxic Activity of *Rhinella schneideri* Toad Poison on Tumor Cells and on Healthy Mononuclear Cells, **Toxicon**, 60 (2012) 95–248, 2012.

FROST; DARREL, R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 (8 April, 2015). **Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History>**, New York, USA. 2015.

GALVEZ, J. et al. Involvement of the GABAergic system in the neuroprotective and sedative effects of acacetin 7-O-glucoside in rodents. **Restor Neurol Neurosci**, v. 33, n. 5, p. 683-700, 2015.

GARCIA, M.L. Ion channels: gate expectations. **Nature**, 430(6996):153-5, 2004.

GEGELASHVILI, G.; SCHOUSBOE, A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. **Mol Pharmacol**. v.52, p.6-15, 1997.

GOTO, A.; YAMADA K.; YAGI, N.; YOSHIOKA M.; SUGIMOTO, T. Physiology and pharmacology of endogenous digitalis-like factors. **Pharmacol.**, Rev. 44, 377, 1992.

GRUBER, K. A.; METZLER, C. H.; ROBINSON, T. E. J.; BUGGY, J.; BULLOCK, B. C.; LYMANGROVER, J. R. Cardiovascular investigation of endogenous digoxin-like factor. **Fed. Proc.**, 44, 2795, 1985.

HABERMEHL, G. G. Amphibia (Amphibians). Cap.6. In:**Venomous Animals and Their Toxins**. New York, Spring-Verlag Berlin Heidelberg, 1981.

HAMLYN, J. M.; MANUTA, P. Ouabain, digitalis-life factors and hypertension, **J. Hypertens.**, 10 (Suppl. 7), S99, 1992.

HAMLYN, J. M.; RINGEL, M.; SCHAEFFER, J. S.; LEVINSON, P. D.; HAMILTON, B.P.; KOWARSKI, A.V.; BLAUSTEIN, M.P. A circulating inhibitor of the Na,K-ATPase associated with essential hypertension. **Nature**, 300, 650, 1982.

HAO S., BAO Y., ZHAO R., WANG H., BI J., NA L., JIANG B. Effects of resibufogenin on voltage-gated sodium channels in cultured rat hippocampal neurons. **Neuroscience Letters**. 501, 112–116, 2011a.

HAO S., BAO Y., AN L., CHENG W. , ZHAO R. , BI J. , WANG H. , SUN C. , LIU J. , JIANG B. Effects of Resibufogenin and Cinobufagin on voltage-gated potassium channels in primary cultures of rat hippocampal neurons. **Toxicology in Vitro** 25, 1644–1653, 2011b.

HARTREE, E.F. Determination of protein a modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, Cambridge, v.48, p.422-427, 1972.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat Rev Drug Discov**, v. 14, n. 2, p. 111-29, 2015.

HAYES R. A., PIGGOTT A. M., DALLE K., CAPON R. J., Microbial Biotransformation as a source of chemical diversity in cane toad steroid toxins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 19, 1790–1792, 2009.

HOTT S.C.; GOMES F.V.; FABRI D.R.S.; REIS D.G.; CRESTANI C.C.; CÔRREA F.M.A.; et al. Both $\alpha 1$ - and $\beta 1$ -adrenoceptors in the bed nucleus of the stria terminalis are involved in the expression of conditioned contextual fear. **Br J Pharmacol**. v.167(1), p. 207–21, 2012.

IBRAHIM, M.Y. Revisão/Atualização em Fisiologia e Fisiopatologia Renal: ATPases K-dependentes ao longo do néfron . **J. Bras. Nefrol.**, Rio de Janeiro, v.19, n.1, p. 66-72, 1997.

IRWIN, R. W.; BRINTON, R. D. Allopregnanolone as regenerative therapeutic for Alzheimer's disease: translational development and clinical promise. **Prog Neurobiol**, v. 113, p. 40-55, 2014.

ISAACSON, J. S.; SCANZIANI, M. How inhibition shapes cortical activity. **Neuron**, v. 72, n. 2, p. 231-43, 2011.

ISMAIL, Z.I.M.; BEDI, K.S. Rats exposed to cocaine during late gestation and early postnatal life show deficits in hippocampal pyramidal and granule cells in later life. **Journal of Anatomy** v.210 (6), p. 749–760, 2007.

JEMBREK MJ, VLAINIĆ J, GABA receptors: pharmacological potential and pitfalls. **Curr Pharm Des**. Sep 14. 2015.

JORGENSEN, P.L. Purification of Na,K-ATPase. Enzyme sources, preparative problems and preparation from mammalian kidney. **Methods in Enzymology**, 156, 29-42, 1988.

JUNG, M. E.; LAL H.; GATCH M. B. The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazol as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 429-439, 2002.

KAMANO, Y; KOTAKE, HASHIMA, H.; INOUE, M.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; NANDACHI, N.; SEGAWA, T.; YUKITA, A.; SAITOU, K.; KATSUYAMAE, M.; PETTIT G. R., Structure-Cytotoxic Activity Relationship for the Toad Poison Bufadienolides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 6, p.1103-1115, 1998.

KELLY, R. A.; O'HARA, D. S.; CANESSA, M. L.; MITCH, W. E.; SMITH, T.W. Characterization of digitalis-like factors in human plasma. Interactions with Na,K-ATPase and cross reactivity with cardiac glycosides specific antibodies. **J. Biol. Chem.**, 260, 11396, 1985.

KELLY, R.A.; SMITH, T.W. Tratamento farmacológico da insuficiência cardíaca. In: Goodman & Gilman: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9ª edição, MacGraw-Hill, 1996.

KESSLER, J. P. Control of cleft glutamate concentration and glutamate spill-out by perisynaptic glia: uptake and diffusion barriers. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e70791, 2013.

KETCHA WANDA, G. J.; NGITEDEM, S. G.; NJAMEN, D. Botanicals for mood disorders with a focus on epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 52, n. Pt B, p. 319-28, 2015.

KIEVAL, R. S.; BUTLER, V.P.; DERGUINI, F.; BRUENING, R. C.; ROSEN, M. R. Cellular electrophysiologic effects of vertebrate digitalis-like substances. **J. Am. Col. Cardiol.**, 11, 637, 1988.

KIM, Y. K. et al. Functional Recovery After Ischemic Stroke Is Associated With Reduced GABAergic Inhibition in the Cerebral Cortex: A GABA PET Study. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 28, n. 6, p. 576-583, 2014.

KNOWLES, R.P. Toad poisoning in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.163, p.1202, 1968.

KOEHN, F.E., CARTER, G.T., The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery** v.4, p. 206–220, 2005.

KOKATE, T. G.; JUHNG, K. N.; KIRKBY, R. D.; LLAMAS, J.; YAMAGUCHI, S.; ROGAWSKI, M. A. Convulsant actions of the neurosteroid pregnenolone sulfate in mice. **Brain Research**, v. 831, p. 119–124, 1999.

KONIG, E. et al. Antimicrobial peptides and alytesin are co-secreted from the venom of the Midwife toad, *Alytes maurus* (Alytidae, Anura): implications for the evolution of frog skin defensive secretions. **Toxicon**, v. 60, n. 6, p. 967-81, 2012.

KUTCHAN, T. Alkaloid biosynthesis – the basis for metabolic engineering of medicinal plants. **Plant Cell**, v.7, p.1059-1070, 1995.

LAKSHMI N. RAVINDRAN e MURRAY B. STEIN, The Pharmacologic Treatment of Anxiety Disorders: A Review of Progress. **J Clin Psychiatry**; 71(7):839-854, 2010.

LAMBERTON, J.A.; MORTON, T.C. The epoxy lactone ring of the coumarin micromelin: formation of a new epimer. **Aust. J. Chem.**, 38, 1025, 1985.

LAMBERTY, Y.; KLITGAARD, H. Consequences of pentylene-tetrazole kindling on spatial memory and emotional responding in the rat. **Epilepsy Behav**, 1(4):256-261, 2000.

LEMASTERS, J.J. Mechanisms of hepatic toxicity V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *The American Journal of Physiology*, Washington, v. 276, n. 1, p. G1-G6, 1999.

LEMASTERS, J.J.; DIGIUSEPPI, J.; NIEMINEM, A.L.; HERMAN, B.B. Free calcium and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. **Nature**, v.325, p.78-81, 1987.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios- conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: editora Atheneu, 2004.

LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 2(10):790-802. Review, 2003.

LIBERATO, J. L. et al. Anticonvulsant and anxiolytic activity of FrPbAll, a novel GABA uptake inhibitor isolated from the venom of the social spider *Parawixia bistriata* (Araneidae: Araneae). **Brain Res**, v. 1124, n. 1, p. 19-27, 2006.

LISBOA S.F.; STECCHINI M.F.; CORRÊA F.M.A.; GUIMARÃES F.S.; RESSEL L.B.M. Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. **Neuroscience**. v. 171(3), p. 760–8, 2010a.

LISBOA S.F.; REIS D.G.; DA SILVA A.L.; CORRÊA F.M.A.; GUIMARÃES F.S.; RESSEL L.B.M. Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. **Int J Neuropsychopharmacol Off Sci J Coll Int Neuropsychopharmacol CINP**. 13(9), p.1163–73, 2010b.

LISTER R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 92(2), p.180-5, 1987.

LITCHSTEIN, D.; KACHALSKY, S.; DEUTSCH, J. Identification of a ouabain-like compound in toad skin and plasma as a bufadienolide derivative. **Life Sci.**, 38, 1261, 1986.

LIU, T.; BROWN, D. A.; O'ROURKE, B. Role of mitochondrial dysfunction in cardiac glycoside toxicity. **J Mol Cell Cardiol**, v. 49, n. 5, p. 728-36, 2010.

LIU Y., XIAO Y., XUE X., ZHANG X.; LIANG X. Systematic screening and characterization of novel bufadienolides from toad skin using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 24: 667–678, 2010.

LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. Review. **Eur. J. Pharmacol.** 342: 1-13, 1998.

LOUZADA-JÚNIOR, P., DIAS, J.J., SANTOS, W.F., LACHAT, J.J., BRADFORD, H.F., COUTINHO-NETTO, J. Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: an approach using microdialysis. **J Neurochem.** v.59, p.358-363, 1992.

LOWRY H.O., ROSEBROUGH J.N., L.A., RANDALL J.R. protein measurement with the folin phenol reagent **Journal of Biological Chemistry**, Washington, May 28, 1951

LUDENS, J. H.; CLARK, M. A.; DUCHARME, D.W.; LUTZKE, B.S.; MANDEL, F.; MATHEWS, W. R.; SUTTER, D.M.; HAMLYN, J. M. Purification of an endogenous digitalis-like factor from human plasma for structural analysis. **Hypertension**, 17, 923, 1991.

LUTZ, A.. Batraciens du Brésil. **Comptes Rendus et Mémoires Hebdomadaires des Séances de la Société de Biologie et des ses Filiales**. Paris 93 vol. 2, p. 137-139, 1925.

MASUGI, F.; OGIHARA, H.; HASEGAWA, T; KUMAHARA, J. Ouabain and non ouabain like factors in plasma of patients with essential hypertension. **Clin. Exp. Hypertens.**, A9, 1233, 1987.

MATHEWS, D. C.; HENTER, I. D.; ZARATE, C. A. Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: rationale and progress to date. **Drugs**, v. 72, n. 10, p. 1313-33, 2012.

MEBS, D.; POGODA, W.; MANYERO, R.; KWET, A. Studies on the poisonous skin secretion of individual red bellied toads, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay. **Toxicon**, 46:641-650, 2005.

MELDRUM, B.S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. **Neurology**, v.44, p.4-23, 1994.

MELLOR, I.R.; USHERWOOD, P.N.R. Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins. **Toxicon**, 43: 493-508, 2004.

MORATO, L. et al. Mitochondrial dysfunction in central nervous system white matter disorders. **Glia**, v. 62, n. 11, p. 1878-94, 2014.

MORTARI, M.R.; CUNHA, A.O.; FERREIRA, L.B.; DOS SANTOS, W.F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacol. Ther.**, 114(2):171-83, 2007.

MORTENSEN, O. V. et al. Molecular determinants of transport stimulation of EAAT2 are located at interface between the trimerization and substrate transport domains. **J Neurochem**, v. 133, n. 2, p. 199-210, 2015.

NATH, C.; CHAKRAVORTY, M. K.; CHOWDHURY, S. R. Liebermann-Burchard Reaction for Steroids. **Nature**, 157, 103-104, 1946.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2004.

NG, J. et al. Monoamine neurotransmitter disorders--clinical advances and future perspectives. **Nat Rev Neurol**, v. 11, n. 10, p. 567-84, 2015.

NOGAWA, T.; KAMANO, Y.; YAMASHITA, A.; PETTIT, G.R. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Ch'an Su. **J. Nat. Prod.**, 64 (9), 1148–1152, 2001.

OLIVEIRA, C. V. et al. Evaluation of potential gender-related differences in behavioral and cognitive alterations following pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice. **Physiol Behav**, v. 143, p. 142-50, 2015.

OLNEY, J.W., WOZNIAK, D.F., FARBER, N.B. Excitotoxic neurodegeneration in Alzheimer disease. New hypothesis and new therapeutic strategies. **Arch Neurol**, v.54, p.1234-1240, 1997.

OMS. Epilepsy, OMS, ficha informativa N ° 999, maio de 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>. Acesso em: 10 out. 2015.

PANMANI, M. B.; CLOUGH, D. L.; HOUT, S. J.; HADDY, F. J. Sodium-potassium pump activity in experimental hypertension, in: Vasodilation, eds. P.M. Vanhoutte and I. Leusen. **Raven Press**, New York, p.391, 1981.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates (Second Edition). **Academic Press**, Inc. Sidney, 1986.

PEDERSEN, P.L.; GREENAWALT, J.W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G.L.; SOPER, J.W.; BUSTAMANTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Meth. Cell. Biol.**, v. 20, p.411- 481, 1978.

PEREIRA-CROTT L.S. E ARANTES E.C. Biological characterization of compounds from *Rhinella schneideri* poison that act on the complement system. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases** (21:25) 2015.

PHILIPPE G.; ANGENOT L., Recent developments in the field of arrow and dart poisons. **Journal of Ethnopharmacology** 100: 85–91, 2005.

PHILLIPS, T.D.; FEDOROWSKI, T.; HAYES, A.W. Techniques in membrane toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology. Ed. Hayes, A.W., **Raven Press**, New York, 1982.

PIZZO A.B., BELEBONI R.O., FONTANA A.C., RIBEIRO A.M., MIRANDA A., COUTINHO-NETTO J., e DOS SANTOS W.F. Characterization of the actions of AvTx 7 isolated from *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. **J Biochem Mol Toxicol** 18: 61–68. (2004)

PRASSAS, I; DIAMANDIS, E. P., Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 7:926-935. Review, 2008.

QI, F. et al. Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 3, p. 342-9, 2011.

RACINE R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**. v. 32(3), p.281-94, 1972.

RAJDEV, S.; REYNOLDS, I. J. Calcium green-5N, a novel fluorescent probe for monitoring high intracellular free Ca^{2+} concentrations associated with glutamate excitotoxicity in cultured rat brain neurons. **Neuroscience Letters**. Amsterdam, v. 162, p. 149–152, 1993.

RASH L. D., MORALES R. A. V., VINK S., ALEWOOD P. F., De novo sequencing of peptides from the parotid secretion of the cane toad, *Bufo marinus* (*Rhinella marina*). **Toxicon**. 57: 208-216, 2011.

RAVINDRAN L.N.; STEIN M.B.; The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **J Clin Psychiatry**. V. 71(7), p. 839-54, 2010.

REDDY D. S.; ROGAWSKI M. A. Neurosteroid Replacement Therapy for Catamenial Epilepsy **The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc** v. 6, 392–401, 2009.

RIGOULOT M. A.; KONING E.; FERRANDON A.; NEHLIG A. Neuroprotective Properties of Topiramate in the LithiumPilocarpine Model of Epilepsy. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics** v.308, p.787–795, 2004.

ROGAWSKI, M. A. Principles of antiepileptic drug action. In R. H. Levy, R. H. Mattson, B. S. Meldrum, & E. Perucca (Eds.), **Antiepileptic Drugs**, Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams &Wilkins. pp. 1–22, 5th ed, 2002.

ROGAWSKI, M. A. Principles of antiepileptic drug action. In: **Antiepileptic Drugs** 5 ed, 2002.

ROSATI, A.; MAIS, S.; GUERRINI, R. Antiepileptic Drug Treatment in Children with Epilepsy. **Open access at Springerlink.com**. 2015.

ROSE, E. M. et al. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. **J Neurosci**, v. 29, n. 25, p. 8143-55, 2009.

ROSTELATO-FERREIRA, S. et al. Presynaptic effect of a methanolic extract of toad (*Rhinella schneideri*) poison in avian neuromuscular preparation. **J Venom Res**, v. 2, p. 32-36, 2011.

ROSTELATO-FERREIRA, S. et al. Presynaptic neuromuscular action of a methanolic extract from the venom of *Rhinella schneideri* toad. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 20, p. 30, 2014.

SAKATE, M.; LUCAS DE OLIVEIRA, P. C. Toad envenoming in dogs: effects and treatment. **J. Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v.6, n.1, p.62-62, 2000.

SANTOS, H.; CIANCAGLINI, P. Kinetic characterization of Na,K-ATPase from rabbit outer renal medulla: properties of the ($\alpha\beta$)₂ dimer. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 135, 539–549, 2002.

SBH. 2015. Brazilian amphibians – List of species. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Captured on 08 de julho de 2015.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Antiproliferative activity and new argininy l bufadienolide esters from the "cururu" toad *Rhinella* (*Bufo*) *schneideri*. **J Ethnopharmacol**, v. 155, n. 2, p. 1076-85, 2014.

SCIANI, J. M. et al. Differences and similarities among parotoid macrogland secretions in South American toads: a preliminary biochemical delineation. **Scientific World Journal**, v. 2013, p. 937407, 2013.

SHAIKH, I. M.; LAU, B. W. C.; SIEGFRIED, B.A.; VALDES, R. Isolation of digoxin-like immunoreactive material from mammalian adrenal cortex. **J. Biol. Chem.**, 266, 13672, 1991.

SHETTY, A. K. Hippocampal injury-induced cognitive and mood dysfunction, altered neurogenesis, and epilepsy: can early neural stem cell grafting intervention provide protection? **Epilepsy Behav**, v. 38, p. 117-24, 2014.

SHETTY, A. K.; BATES, A. Potential of GABA-ergic cell therapy for schizophrenia, neuropathic pain, and Alzheimers and Parkinsons diseases. **Brain Res**, 2015.

SHIGEI T, TSURU H, SAITO Y, OKADA M. Structure-activity relationship of the cardenolide, with special reference to the substituents and configurations at C-14 and C-15. **Experientia**. Apr 15;29(4):449-50. 1973

SIBAROV, D. A. et al. Na⁺,K⁺-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na⁺,Ca²⁺ exchanger to prevent Ca²⁺ overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 343, n. 3, p. 596-607, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; et al. **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**, Porto Alegre/Florianópolis Ed.Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999.

SINGHAL K.G.; GUPTA G.D. Some Central Nervous System Activities of *Nerium oleander* Linn (Kaner) Flower Extract. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**; 10 (4): 455-461, 2011.

SKOU, J.C.; The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim Biophys Acta.**; v.23, p.394-401, 1967.

SLUSE, F.E.; JARMUSZKIEWICZ, W. Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. **Braz J Med Biol Res.**,(6):733-47, 1998.

SPELLER, J. M.; WESTBY, G. W. Biccuculline-induced circling from the rat superior colliculus is blocked by GABA microinjection into the deep cerebellar nuclei. **Exp Brain Res**, 110: 425-434, 1996.

SRIPADA, R. K. et al. Allopregnanolone elevations following pregnenolone administration are associated with enhanced activation of emotion regulation neurocircuits. **Biol Psychiatry**, v. 73, n. 11, p. 1045-53, 2013.

STEFAN, H.; FEUERSTEIN, T. J. Novel anticonvulsant drugs. **Pharmacol Ther**, v. 113, n. 1, p. 165-83, 2007.

STEIN, P.S.; HEERDEN, F.R. Bufanolides of plant and animal origin. **Natural Product Reports**, p397-413, 1998.

STROMGAARD, K.; JENSEN, L.S.; VOGENSEN, S.B. Polyamine toxins: development of selective ligands for ionotropic receptors. **Toxicon.**, 45: 249-254, 2005.

SUZUKI A.; JOSSELYN S.A.; FRANKLAND P.W.; MASUSHIGE S.; SILVA AJ, KIDA S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **J Neurosci Off J Soc Neurosci**. V. 24(20), p.4787–95, 2004.

TEMPONE, A.G.; PIMENTA, D.C.; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N.N.; ANDRADE, H.F.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, 52, 13-21, 2008.

THERIEN, A. G.; BLOSTEIN, R Mechanisms of sodium pump regulation. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v.279, p. 641-666, 2000.

THORE, A. The technical aspects of bioluminescent firefly luciferase assay of ATP. **Science Tools**, Stockholm, v. 26, n. 2, p. 30- 34, 1979.

TIAN, H. Y. et al. C23 steroids from the venom of *Bufo bufo gargarizans*. **J Nat Prod**, v. 76, n. 10, p. 1842-7, 2013.

TIAN, H. Y. et al. New bufadienolides and C(23) steroids from the venom of *Bufo bufo gargarizans*. **Steroids**, v. 75, n. 12, p. 884-90, 2010.

TIERNEY, JR M., MC PHEE, J., PAPADAKIS, M.A.(1996). Current – **Medical Diagnosis and Treatment**. 35 th Edition. p 863-868

TIMPLE, J. M. et al. The lignan (-)-hinokinin displays modulatory effects on human monoamine and GABA transporter activities. **J Nat Prod**, v. 76, n. 10, p. 1889-95, 2013.

TOLEDO, R. C; JARED, C.; Review: Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Biochem. Physiol.**, v.111A, n.1, p.1-29, 1995.

VALENTE, L.M.M.; ALVES, F.F.; BEZERRA, G.M.; ALMEIDA, M.B.S.; ROSARIO, S.L.; MAZZEI, J.L.; D'AVILA, L. A.; SIANI, A.C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(2): 216-223, 2006.

VALLEE, M. Neurosteroids and potential therapeutics: Focus on pregnenolone. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 2015.

VASIC, V.; MOMIC, T.; PETKOVIC, M.; KRSTIC, D. Na⁺,K⁺-ATPase as the target enzyme for organic and inorganic compounds. **Sensors**, 8, 8321-8360, 2008.

VIEGAS JR, C., BOLZANI V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WANDA, G.J.M.K., NGITEDEM, S.G., NJAMEN, D. Botanicals for mood disorder with a focus on epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, 52(Pt B):319-28, 2015.

WANG, J. K. et al. Cardiac glycosides provide neuroprotection against ischemic stroke: discovery by a brain slice-based compound screening platform. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 27, p. 10461-6, 2006.

WEIL, A.T.; DAVIS, W; *Bufo alvarius*: a potent hallucinogen of animal origin., **J. Ethnopharmacol.**, v.41, p.1-8, 1994.

WERNER, F. Herpetologische Nova. **Zoologischer Anzeiger**. V.17, p. 410–415, 1894.

WOJTAL, K, TROJNAR M. K., CZUCZWAR, S.J., Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids, **Pharmacological Reports**, v. 58, p. 335-340, 2006.

WU, P.L.; HSU, Y.L.; WU, T.S.; BASTOW, K.F.; LEE, K.H. Kalanchosides A-C, new cytotoxic bufadienolides from the aerial parts of *kalanchoe gracilis*. **Org. Lett.**, 8 (23), 5207–5210, 2006.

XUE, T.; ROY, R.; Studying traditional Chinese medicine. **Science**, 300: 740–741, 2003.

YAMATOGLI, Y. Principles of antiepileptic drug treatment of epilepsy. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v.58, s3-s6, 2004.

YANG, Q, et al., Angel of human health: current research updates in toad medicine, **Am J Transl Res**, v. 7(1) p. 1-14, 2015.

YATIME, L.; BUCH-PEDERSEN, M. J.; MUSGAARD, M.; MORTH, J. P.; WINTHER, A. L.; PEDERNDEN, B. P.; OLESEN, C.; ANDERSEN, J. P.; VILSEN, B.; SCHIOTT, B.; PALMGREN, M. G.; MOLLER, J. V.; NISSEN, P.; FEDOSOVA, N. P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1787, 207-220, 2009.

YE, M.; GUO, H.; GUO, H.; HAN, J.; GUO, D. Simultaneous determination of cytotoxic bufadienolides in the Chinese medicine ChanSu by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array and mass spectrometry detections. **Journal of Chromatography B**, 838, 86–95, 2005a.

YE, M.; HAN, J.; TU, G.; AN, D.; GUO, D. Microbial Hydroxylation of Bufalin by *Cunninghamella blakesleana* and *Mucor spinosus*. **J. Nat. Prod.**, 68 (4), 626–628, 2005b.

ZELNIK, R.; ZITI, L. M.; GUIMARÃES, C. V. A Chromatographic study of the bufadienolides from the venom of the parotid glands of *Bufo Paracnemis* Lutz. **J. Chromatography**, v.16, p.9-14, 1963.

ZHANG, P.; CUI, Z.; LIU, Y.; WANG, D.; LIU, N.; YOSHIKAWA, M. Quality of evaluation of traditional Chinese drug toad venom from different origins through a simultaneous determination of bufogenins and indole alkaloids by HPLC. **Chem. Pharm. Bull.**, 53:1582-1586, 2005.