UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento e caracterização bioquímica de toxinas do veneno de
Rhinella schneideri e avaliação de seus efeitos sobre a atividade da
Na⁺K⁺-ATPase e de suas ações neurotóxicas.**

Mateus Amaral Baldo

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento e caracterização bioquímica de toxinas do veneno de
Rhinella schneideri e avaliação de seus efeitos sobre a atividade da
Na⁺K⁺-ATPase e de suas ações neurotóxicas.**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia, para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Mateus Amaral Baldo
Orientador: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes

Ribeirão Preto
2010

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.

Isolamento e caracterização bioquímica de toxinas do veneno de *Rhinella schneideri* e avaliação de seus efeitos sobre a atividade da Na⁺K⁺-ATPase e de suas ações neurotóxicas. Ribeirão Preto, 2010.

111 p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Arantes, Eliane Candiani.

1. *Rhinella schneideri*. 2. Bufadienolídeos. 3. Na⁺K⁺ATPase

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Mateus Amaral Baldo

Título do trabalho: Isolamento e caracterização bioquímica de toxinas do veneno de *Rhinella schneideri* e avaliação de seus efeitos sobre a atividade da Na⁺K⁺-ATPase e de suas ações neurotóxicas.

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia, para obtenção do título de
Mestre 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: _____

Por Que Se Preocupar?

"Amor, eu vejo o mundo que lhe deixou triste.
Algumas pessoas podem ser más,
Nas coisas que elas fazem, nas coisas que elas dizem,
Mas amor, eu limparei essas lágrimas amargas,
Eu afugentarei esses medos impacientes,
Que fizeram seu céu azul se tornar cinza.

Por que se preocupa? Deveria haver risos após a dor,
Deveria haver a luz do sol após a chuva,
Essas coisas sempre foram as mesmas,
Então por que se preocupar agora?

Amor, quando estou para baixo eu me volto pra você,
E você compreende o que eu faço,
Eu sei que isso não é duro de dizer,
Mas amor, apenas quando esse mundo parece ruim e frio,
Nosso amor brilha vermelho e ouro,
E toda a tranquilidade é um propósito.

Por que se preocupa? Deveria haver risos após a dor,
Deveria haver a luz do sol após a chuva,
Essas coisas sempre foram as mesmas,
Então por que se preocupar agora?"

Dire Straits

*Às minhas maiores bênçãos que são minha filha
Leticia, minha esposa Elisa, minha mãe Márcia e
avós Resinha e Vavá, e que por nunca deixarem de
acreditar em mim, pelo seu amor incondicional, apoio
nos momentos difíceis, dedico este trabalho.*

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 esposa 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 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 Prof. 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 ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini pela acolhida e paciência em seu laboratório e por me auxiliar na parte enzimática deste trabalho.
- ✓ Agradeço à Prof^a. Dr^a. Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado pelo apoio, pelas dicas, e principalmente por seu conhecimento em termos moleculares e purificações.
- ✓ Agradeço à Dr^a. Alexandra Olímpio Siqueira Cunha que me introduziu no meio da neurociência e me fez crescer em conhecimento.
- ✓ Agradeço a Dr^a. Valquíria Jabor pelas espectrometrias de massas e atenção para comigo neste trabalho.
- ✓ Agradeço aos colegas de Laboratório de Toxinas Animais e LCP: Camis, Cris Bregge, Fernando, Carol, Empada, Cuco, Veri, Felipe, Cris, Paty, Matheus, Tortinha, Jô e Rosinha pela convivência.
- ✓ Agradeço às técnicas de Laboratório Flávia e Karla, por todo apoio, paciência e disponibilidade.
- ✓ Aos grandes amigos do Laboratório de Psicobio Zezim, Lívea (e Luiza) por toda calma e paciência em me ajudar a conhecer a neurociência e trabalhar junto em todo esse trabalho.
- ✓ Aos amigos da psicobio Helene, Ma, Pseudo, Dri, e todos outros que me acolheram de forma tão calorosa.
- ✓ À Juliana Sakamoto do Laboratório de Bioquímica por ter me ajudado tanto na parte enzimática deste trabalho, sempre disponível.

- ✓ Ao Sandro e a Prof^a Dr^a Lea Rodrigues Simione pela acolhida em Campinas e realização de parte deste trabalho.
- ✓ 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 qualquer forma direta e indireta contribuíram para realização deste trabalho.

"A vantagem de ter péssima memória é divertir-se muitas vezes com as mesmas coisas boas como se fosse a primeira vez."

"Ensino que a vida jamais deveria ser modificada ou esmagada devido à promessa de outro tipo de vida futura. O imortal é esta vida, este momento."

Friedrich Nietzsche

RESUMO

BALDO, M. A. **Isolamento e caracterização bioquímica de toxinas do veneno de *Rhinella schneideri* e avaliação de seus efeitos sobre a atividade da Na⁺K⁺-ATPase e de suas ações neurotóxicas.** 2010. 111f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Toxinas animais são moléculas aplicáveis 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 isolar toxinas presentes no veneno de *Rhinella schneideri* e avaliar suas ações sobre a atividade da enzima Na⁺K⁺-ATPase e os sistemas nervosos central e periférico. O veneno de *Rhinella schneideri* foi inicialmente submetido a diferentes extrações resultando em quatro amostras. A AMOSTRA A, que apresenta apenas componentes de baixa massa molecular, foi a mais efetiva na redução da atividade da Na⁺K⁺-ATPase e foi, portanto, liofilizada e submetida a uma cromatografia de fase reversa em sistema CLAE em coluna C2C18. Das 5 frações majoritárias obtidas nesta cromatografia apenas as Rs3, Rs4 e Rs5 induziram uma redução concentração-dependente da atividade da Na⁺K⁺-ATPase, mostrando IC_{50%} de 33,6 µg, 47,7 µg e 98,92 µg, respectivamente. Estes resultados indicam que o veneno de *R. schneideri* apresenta pelo menos três substâncias capazes de inibir a Na⁺K⁺-ATPase. As frações Rs3, Rs4 e Rs5, foram submetidas à espectrometria de massa e revelaram massas moleculares de 403, 401 e 387 Da, provavelmente correspondentes à Telocinobufagina, Desacetilcinobufagina e Bufalina, respectivamente. Estes compostos mostraram também neuroproteção central muito relevante sobre crises convulsivas induzidas por PTZ (Pentilenotetrazol) e NMDA (n-metil-d-aspartato), sendo que a Rs5 foi a que causou maior neuroproteção. No entanto, estas mesmas frações apresentaram ação neurotóxica periférica, induzindo bloqueio da junção neuromuscular de pintainhos. Manifestações como alucinações, dormência, confusão mental também são observadas em envenenamentos por sapos, que podem ser induzidos por alcalóides presentes no veneno, o que justifica os estudos para a identificação dos mesmos. Neste trabalho confirmou-se a presença de

alcalóides no veneno. No entanto, foram priorizados os estudos com as toxinas isoladas Rs3, Rs4 e Rs5, por apresentarem ações biológicas importantes. Concluindo, neste trabalho foram isolados 3 compostos de baixa massa molecular, denominados Rs3, Rs4 e Rs5, que são capazes de inibir a atividade da Na^+K^+ -ATPase, bloquear a transmissão do impulso nervoso na junção neuromuscular de pintainhos e, principalmente a Rs5, proteger crises convulsivas induzidas por PTZ e NMDA. Estudos adicionais serão necessários para estabelecer a correlação entre estes efeitos e determinar o mecanismo de ação destas toxinas.

ABSTRACT

BALDO, M. A. **Isolation and biochemical characterization of toxins from the venom of *Rhinella schneideri* and evaluation of its effects on the Na⁺ K⁺-ATPase activity and of its neurotoxic actions.** 2010. 111f. Thesis (Masters). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Animal toxins are molecules applicable in the generation of therapeutic agents and / or experimental tools for basic and applied research, justifying its purification and functional analysis. Whereas studies of poison toads are relevant, since these are considered a good source of toxins that act on different biological systems, the objectives of this work were to isolate toxins in the venom of *Rhinella schneideri* and evaluate their actions on the Na⁺K⁺-ATPase activity and the central and peripheral nervous systems. The venom *Rhinella schneideri* was initially submitted to different extractions resulting in four samples. The SAMPLE A, with only low molecular mass components, was the most effective in reducing the activity of Na⁺K⁺-ATPase and was lyophilized and subjected to reverse phase chromatography in the HPLC system in C2C18 column. Five majority fractions were obtained from this chromatography and only Rs3, Rs4 and Rs5 induced a concentration-dependent reduction in activity of Na⁺K⁺-ATPase, showing IC_{50%} 33.6 µg, 47.7 µg and 98.92 µg, respectively. These results indicate that *R. schneideri* venom presents at least three substances that can inhibit the Na⁺K⁺-ATPase. Fractions Rs3, Rs4 and Rs5 were submitted to mass spectrometry assay showing molecular masses of 403, 401 and 387 Da, probably corresponding to Telocinobufagin, Desacetylcinobufagin and Bufalin, respectively. These compounds also showed a very relevant central neuroprotection on seizures induced by PTZ (Pentylentetrazole) and NMDA (N-methyl-d-aspartate), and the Rs5 caused the highest neuroprotection. However, these same fractions showed neurotoxicity on peripheral nervous system, inducing blockade of the neuromuscular junction of chicks. Manifestations such as hallucinations, numbness, mental confusion are also seen in poisoning by toads, which can be induced by alkaloids present in the venom, which justifies the studies for their identification. This work confirmed the presence of alkaloids in the venom. However, have been prioritized the studies with isolated toxins Rs3, Rs4 and Rs5, because they have important biological actions. In conclusion, in this study were isolated three compounds with

low molecular mass, known as Rs3, Rs4 and Rs5, which are capable of inhibiting the activity of Na^+K^+ -ATPase, blocking the nerve impulse transmission at the neuromuscular junction of chickens, and especially the Rs5 by protecting seizures induced by PTZ and NMDA. Additional studies are necessary to establish the correlation between these effects and determine the mechanism of action of these toxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Rhinella schneideri</i>	3
Figura 2. Esquema mostrando estrutura química e a diferença do anel lactônico entre cardenolideos provenientes de plantas, contendo 5 átomos, e os bufadienolideos obtidos de anfíbios, onde o anel lactônico apresenta 6 átomos	7
Figura 3. Núcleo Perhidrofenantreno.....	8
Figura 4. Substituições de radicais do núcleo perhidrofenantreno, que produzem várias moléculas, com ações tóxicas diferenciadas e características de venenos de plantas e anfíbios.....	8
Figura 5. Molécula de Bufalina	9
Figura 6. Representação esquemática da atividade da enzima Na^+K^+ -ATPase responsável pela repolarização da célula	13
Figura 7. Extração do veneno de <i>Rhinella schneideri</i> através da compressão de suas glândulas parotóides.....	20
Figura 8. Esquema demonstrando as etapas de separação de alcalóides envolvendo uma extração clássica ácido/base	26
Figura 9. Esquema de fracionamento do veneno de <i>Rhinella schneideri</i> utilizado para a obtenção das Amostras A, B, C e D.....	35
Figura 10. Atividade da Na^+K^+ -ATPase purificada na presença das amostras A, B, C e D em diferentes concentrações (5, 50 e 100 μg)	36
Figura 11. Atividade da Na^+K^+ -ATPase inserida na membrana na presença das amostras A, B, C e D em diferentes concentrações	37
Figura 12. Inibição da enzima Na^+K^+ -ATPase por diferentes concentrações da AMOSTRA A do veneno de <i>Rhinella schneideri</i>	38
Figura 13. Varredura da AMOSTRA A de baixa massa molecular em diferentes comprimentos de onda, entre 190 nm e 600 nm	40
Figura 14. Perfil cromatográfico da AMOSTRA A de baixa massa molecular em coluna de fase reversa C2C18	41
Figura 15. Perfil cromatográfico da AMOSTRA A de baixa massa molecular em coluna de fase reversa C2C18	42
Figura 16. Inibição da enzima Na^+K^+ -ATPase por diferentes concentrações da (A) Rs3, (B) Rs4 e (C) Rs5. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão de um ensaio realizado em triplicata	44

Figura 17. Tubo de ensaio contendo a solução com o veneno bruto de <i>Rhinella schneideri</i> onde ocorreu a reação de Libermann-Burchard	45
Figura 18. Perfil cromatográfico da AMOSTRA A, após extração ácido/base, em coluna de fase reversa C2C18 para identificação de alcalóides	46
Figura 19. Fórmula e estrutura molecular da Telocinobufagina.....	47
Figura 20. Espectrometria de massas da Rs3 mostrando o pico com m/z 403, que resultou na provável identificação da molécula de Telocinobufagina	48
Figura 21. Moléculas de cinobufagina sofrendo desacetilação e transformando-se na molécula de Desacetilcinobufagina	49
Figura 22. Espectrometria de massas da Rs4 mostrando o pico com m/z 401 que resultou na provável identificação da molécula de Desacetilcinobufagina ..	50
Figura 23. Fórmula e estrutura molecular da Bufalina	51
Figura 24. Espectrometria de massas da Rs5 mostrando o pico com m/z 387 que resultou na provável identificação da molécula de Bufalina	52
Figura 25. Perfil de inibição da contração muscular ao se adicionar a subfração Rs3 do veneno de <i>Rhinella schneideri</i> , mostrando o rápido bloqueio ...	54
Figura 26. Perfil mostrando a resposta da preparação à subfração Rs4 do veneno de <i>Rhinella schneideri</i>	54
Figura 27: Perfis mostrando a comparação entre os efeitos das frações Rs3 (A) e Rs5 (B) respectivamente, em relação ao tempo de bloqueio total da contração da musculatura	54
Figura 28. Efeitos de concentrações crescentes da AMOSTRA A. (10^{-5} a $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) na captação de $[^3\text{H}]\text{-L-Glu}$	55
Figura 29. Gráfico das porcentagens de animais protegidos contra crises induzidas pelo PTZ após a injeção de diferentes concentrações da AMOSTRA A.....	56
Figura 30. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crises em animais não protegidos contra crises induzidas pelo PTZ após a injeção de diferentes concentrações de Amostra A	57
Figura 31. Gráfico das médias porcentagens de animais protegidos contra crises induzidas pelo NMDA após a injeção de diferentes concentrações de AMOSTRA A	58
Figura 32. Gráfico das médias porcentagens de animais protegidos contra crises induzidas pelo NMDA após a injeção de diferentes concentrações de Amostra A.....	59

Figura 33. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crises contra crises induzidas pelo PTZ após a injeção de diferentes concentrações da Rs3.....	60
Figura 34. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crises contra crises induzidas pelo PTZ após a injeção de diferentes concentrações de Rs4.....	60
Figura 35. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crises contra crises induzidas pelo NMDA após a injeção de diferentes concentrações de Rs3.....	61
Figura 36. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crises contra crises induzidas pelo NMDA após a injeção de diferentes concentrações de Rs4.....	62
Figura 37. Gráfico das porcentagens de proteção contra crises tônico-clônicas generalizadas induzidas pela administração da fração Rs5, 15 min antes do convulsivante PTZ.....	63
Figura 38. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crise em animais não protegidos contra crises induzidas por PTZ, após a injeção de diferentes concentrações de Rs5.....	64
Figura 39. Gráfico das porcentagens de proteção contra crise tônico-clônica generalizada induzidas pela administração da fração Rs5 15 min antes do convulsivante NMDA	66
Figura 40. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crise em animais não protegidos contra crises induzidas por NMDA, após a injeção de diferentes concentrações de Rs5.....	67
Figura 41. Análise da atividade geral dos animais tratados com salina (0,9%), diazepam (2mg/kg) e Rs5 2 μ g/ μ L no campo aberto	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Toxinas extraídas de glândulas da pele de sapos da Família Bufonidae	6
Tabela 2. Modificações de alguns substituintes a partir da molécula de bufalina, mostrando a variedade de compostos presente no veneno da classe Bufonidae	9
Tabela 3. Classificação de crises límbicas. Utilizada na avaliação de crises convulsivas induzidas por NMDA, segundo o índice de Racine (1972)	28
Tabela 4. Drogas utilizadas nos ensaios para a avaliação da ação anticonvulsivante da Rs5 e as respectivas concentrações e vias de administração	29
Tabela 5. Classificação de crises convulsivas segundo Lamberty & Klingaard (2000).....	30
Tabela 6. Classificação de comportamentos agrupados segundo Speller & Westby (1996).....	31
Tabela 7. Atividade da Na ⁺ K ⁺ -ATPase na presença e ausência de Rs3, Rs4 e Rs5.....	39
Tabela 8. Atividade da Na ⁺ K ⁺ -ATPase na presença e ausência de Rs3, Rs4 e Rs5.....	43
Tabela 9. Porcentagem de proteção contra crises induzidas por injeção i.p de PTZ (80mg/ kg)	63
Tabela 10. Porcentagem de proteção contra crises induzidas por injeção i.c.v. de NMDA (20 µg/µL)	65
Tabela 11. Estudo comparativo de proteção entre a fração Rs5 e a carbamazepina contra crises induzidas por injeção i.c.v de NMDA (20 µg/µL).....	65
Tabela 12. Comprometimento locomotor no teste Rotarod	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina tri fosfato
Ach	Acetilcolina
CBZ	Carbamazepina
CD	Dose convulsivante
CLAE – FR	Cromatografia líquida de alta eficiência – fase reversa
DMSO	Dimetilsulfóxido
ED	Dose efetiva
GABA	Ácido-γ-aminobutírico
IC	Concentração inibitória
i.c.v.	Intra crânio ventricular
i.p.	Intra peritoneal
NMDA	N-metil-D-aspartato
PTZ	Pentilenotetrazol
TFA	Ácido trifluor acético
VRs	Veneno de <i>Rhinella schneideri</i>

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. MATERIAL	20
3.1.1. Veneno.....	20
3.1.2. Drogas.....	20
3.1.3. Animais.....	21
3.1.4. Equipamentos	21
3.1.5. Reagentes	22
3.2. MÉTODOS	22
3.2.1. Filtração do veneno bruto.....	22
3.2.2. Fração do veneno permeada pelo filtro de 0,45 µm	22
3.2.3. Fração do veneno retida pelo filtro de 0,45 µm	23
3.2.4. Testes colorimétricos para identificação de heterosídeos cardiotônicos e alcalóides	23
3.2.5. Ensaios com a Na ⁺ K ⁺ -ATPase purificada.....	24
3.2.6. Ensaios com a Na ⁺ K ⁺ -ATPase inserida na membrana.....	24
3.2.7. Ensaios com Na ⁺ K ⁺ -ATPase purificada para verificação do tipo de inibição...24	
3.2.8. Cromatografia de fase reversa em sistema CLAE	25
3.2.9. Cromatografia alternativa de fase reversa em sistema CLAE	25
3.2.10. Varredura no espectrofotômetro.....	25
3.2.11. Separação de alcalóides	26
3.2.12. Preparação biventer cervicis de pintainho.....	27
3.2.13. Avaliação da ação do veneno e toxinas sobre o sistema nervoso	27

3.2.13.1. Cirurgia.....	27
3.2.13.2. Atividade anticonvulsivante em modelos de indução de crise aguda.....	28
3.2.13.3. Análise Estatística	29
3.2.14. Atividade anticonvulsivante em modelos de crise aguda envolvendo a fração isolada <i>Rs5</i>	29
3.2.14.1. Teste comparativo entre a fração isolada <i>Rs5</i> e a droga anticonvulsivante carbamazepina	30
3.2.14.2. Desempenho no Rotarod e determinação do índice terapêutico.....	30
3.2.14.3. Atividade locomotora espontânea e comportamento exploratório.....	31
3.2.14.4. Análise estatística.....	31
3.2.15. Avaliação da atividade da AMOSTRA A sobre recaptção do aminoácido excitatório L-Glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos Wistar.....	32
3.2.15.1. Preparação dos sinaptosomas de cérebro de rato.....	32
3.2.15.2. Ensaios de captação	32
3.2.16. Espectrometria de massas	33
4. RESULTADOS.....	35
4.1. PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS TOXINAS E AVALIAÇÃO DE SUA AÇÃO SOBRE A Na^+K^+ -ATPase.....	35
4.1.1. Fracionamento do veneno.....	35
4.1.2. Ensaios com a enzima Na^+K^+ -ATPase purificada	36
4.1.3. Ensaios com a Na^+K^+ -ATPase contida na membrana.....	37
4.1.4. Avaliação da inibição da Na^+K^+ -ATPase purificada pela AMOSTRA A.....	38
4.1.5. Varredura da AMOSTRA A em diferentes comprimentos de onda	39
4.1.6. Fracionamento da amostra de baixa massa molecular em CLAE.....	40
4.1.7. Cromatografia alternativa de fase reversa em sistema CLAE	41
4.1.8. Ação das subfrações <i>Rs3</i> , <i>Rs4</i> e <i>Rs5</i> sobre a atividade da enzima Na^+K^+ ATPase.....	42
4.1.9. Testes colorimétricos para a identificação de heterosídeos cardioativos e alcalóides	45
4.1.10. Separação de alcalóides	45
4.1.11. Espectrometria de massas	46
4.2. ATIVIDADE DAS FRAÇÕES <i>RS3</i> , <i>RS4</i> E <i>RS5</i> NA PREPARAÇÃO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO	53
4.3. AVALIAÇÃO DA AÇÃO NEUROTÓXICA E OU NEUROPROTETORA	55
4.3.1. Atividade sobre a recaptção do aminoácido excitatório L-Glutamato em sinaptossomas cérebro-corticais de ratos Wistar	55
4.3.2. Atividade anticonvulsivante em modelos de indução de crise aguda.....	56

4.3.2.1. Amostra A.....	56
4.3.2.2. Frações <i>Rs3</i> e <i>Rs4</i>	59
4.3.3. Fração <i>Rs5</i>	62
4.3.3.1. Atividade anticonvulsivante da Fração <i>Rs5</i> em modelo PTZ	62
4.3.3.2. Atividade anticonvulsivante da Fração <i>Rs5</i> em modelo NMDA.....	64
4.3.4. Comprometimento motor no <i>Rotarod</i>	67
4.3.5. Atividade locomotora espontânea e atividade exploratória	68
5. DISCUSSÃO	71
5.1. EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO VENENO	71
5.2. ATIVIDADE SOBRE A ENZIMA $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$	72
5.2.1. Atividade das 4 frações obtidas do veneno de <i>Rhinella schneideri</i>	72
5.2.2. Atividade da AMOSTRA A sobre a enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$	73
5.3. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES DE BAIXA MASSA MOLECULAR PRESENTES NA AMOSTRA A.....	74
5.3.1. Isolamento por CLAE	74
5.3.2. Caracterização estrutural por espectrometria de massas	74
5.4. ATIVIDADE DAS FRAÇÕES <i>RS3</i> , <i>RS4</i> E <i>RS5</i> SOBRE A ENZIMA $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ E SISTEMA NERVOSO.....	75
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As espécies ao longo de suas histórias evolutivas sofreram alterações que proporcionaram adaptação e sobrevivência diferenciadas. Neste sentido, pode-se comparar a natureza com um grande laboratório de experiências que promovem mecanismos de sobrevivência a estas espécies. Neste contexto, animais peçonhentos e venenosos têm sido particularmente favorecidos por um arsenal de compostos bioquímicos, os quais conferem a eles uma habilidade única 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).

Por muitos séculos as plantas foram consideradas a principal fonte de material para a produção de novos fármacos. Porém, esta longa e incansável busca por novos compostos acabou por se estender e abranger novas fontes além da vegetal. Uma destas é encontrada no reino animal, principalmente em venenos com ações farmacológicas intensas, com relevância médica e mesmo veterinária.

Toxinas animais são moléculas aplicáveis na geração de agentes terapêuticos e/ou de ferramentas experimentais para a pesquisa básica e aplicada, justificando sua purificação e análise funcional.

Uma das classes de animais mais estudada é a Amphibia, com 6638 espécies catalogadas, que se distribuem em três ordens, as quais são denominadas de Caudata, Gymnophiona e Anura (FROST, 2010). Conhecem-se atualmente no Brasil 877 espécies de anfíbios, dentre essas se encontram 849 anuros, que estão divididos em 19 famílias, apenas uma espécie de salamandra que se inclui dentro da ordem Caudata e 27 espécies de Cecílias que se enquadram dentro da ordem Gymnophionas e estão divididas em 2 famílias (SBH, 2010). Os anfíbios são encontrados principalmente em áreas tropicais e de climas úmidos.

Na ordem Anura incluem-se os sapos, rãs e as pererecas. Os sapos da família Bufonidae são os mais tóxicos, sendo que no Brasil são encontradas 66 espécies dentre elas a *Rhinella schneideri* (SAKATE; OLIVEIRA, 2000; SBH, 2010).

A espécie *Rhinella schneideri* (Fig. 1), anteriormente conhecida como *Chaunus schneideri* e ainda mais tardiamente como *Bufo paracnemis*, é uma espécie muito confundida com o *Bufo marinus*, mas possui características bem distintas do mesmo. Atinge um tamanho maior do que o do *B. marinus*, apresenta um dimorfismo sexual muito menos acentuado, tem um aspecto geral mais volumoso, sua cabeça é mais curta, suas glândulas parotóides menos salientes e, apesar de ter o mesmo comprimento, possui patas relativamente mais curtas. Sua cor geral é de um cinza-esverdeado, com algumas manchas escuras no dorso, que não formam um desenho como na espécie *B. marinus*. A face ventral é de um cinza esbranquiçado, salpicado 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, V.; VELLARD, 1926).

Figura 1. *Rhinella schneideri* (Fonte: Laboratório de Toxinas Animais)

Por ser uma classe de transição entre os meios aquático e terrestre, os anfíbios necessitaram de conjuntos morfofuncionais e comportamentais que evoluíram em uma adaptação principalmente de sua pele, para garantir sua nova forma de vida. Desde o período devoniano, quando estes surgiram, eles se encontram em constante adaptação e evolução em relação também aos novos predadores que o novo ambiente passou a apresentar. Glândulas de veneno

presente em peixes passaram a existir posteriormente nos anfíbios. (TOLEDO; JARED, 1995).

Estes vertebrados do grupo anura, ocupam amplos tipos de habitats 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 funções, desde a regulação das funções fisiológicas à proteção contra predadores ou microorganismos. 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 glândulas granulares (serosa ou venenosa), 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 parotóides (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-lo ou engoli-lo. Na *R. schneideri*, geralmente essas glândulas parotóides 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 parotóides, o veneno de sapo possui o aspecto de um líquido espesso, leitoso ou cremoso, de cor branca (*Bufo 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), o veneno de sapo ainda hoje é utilizado tradicionalmente por chineses em drogas como Chan Su (conhecida pelos japoneses por Senso) e Yixin Wan, no tratamento de doenças cardíacas, como expectorante, diurético 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). Na cidade de New York houve uma epidemia de envenenamento quando um medicamento afrodisíaco chinês, conhecido como Chan Su, 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. Na medicina tradicional chinesa, extratos de secreções de bufonídeos são utilizados como agentes cardiotônicos, diuréticos e antineoplásicos (ZHANG et al., 2005).

Bufadienolídeos e outras moléculas que apresentam estruturas derivadas ou muito semelhantes 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). A atividade destas moléculas não se restringe a estes tipos de ações. Ensaios elaborados com moléculas com estruturas semelhantes aos bufadienolídeos, tanto 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). Outra ação de interesse biotecnológico observada com componentes encontrados no veneno de sapo foi sobre os protozoários *Leishmania sp.* e *Trypanosoma cruzi*. Os parasitas apresentaram inibições de crescimento e até mesmo morte ao serem expostos a estas moléculas (TEMPONE et al., 2008).

Alguns tipos de bufadienolídeos isolados de glândulas da pele de sapo da família Bufonidae são apresentados na Tabela 1.

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

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

Referência: Steyn e Heerden, 1998.

Uma das características deste veneno 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. O veneno de sapos resiste à luz, ao calor, aos 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).

Estrutura de toxinas

As moléculas denominadas glicosídeos cardíacos (Fig. 2), 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 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$. A diferença entre os cardenolídeos e os bufadienolídeos está no substituinte do C-17 do núcleo perhidrofenantreno (Fig. 3), conhecido também como núcleo esteroidal, o qual no primeiro irá apresentar um anel lactônico contendo cinco átomos, denominado butenolideo, enquanto o segundo irá apresentar um anel lactônico contendo seis átomos, denominado de pentadienolideo (STEYN ; HEERDEN, 1998).

Figura 2. Esquema mostrando estrutura química e a diferença do anel lactônico entre cardenolídeos provenientes de plantas, contendo 5 átomos, e os bufadienolídeos obtidos de anfíbios, onde o anel lactônico apresenta 6 átomos. (Fonte: <http://www.utoronto.ca/acdclab/pubs/PM/18948999.pdf>)

Figura 3. Núcleo Perhidrofenantreno

Ao utilizar-se do núcleo perhidrofenantreno (Fig. 3) o metabolismo secundário de plantas e animais pode modificar alguns substituintes, conforme a necessidade, e obter diferentes moléculas (Fig. 4).

Figura 4. Substituições de radicais do núcleo perhidrofenantreno, que produzem várias moléculas, com ações tóxicas diferenciadas e características de venenos de plantas e anfíbios. (Fonte modificada: <http://www.people.vcu.edu/~urdesai/car.htm>)

As fontes animais de bufadienolídeos e das bufotoxinas estão presentes no corpo dos sapos do gênero *Rhinella*, sendo que estas moléculas não ocorrem somente na forma geneninas, 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-se a estrutura química da bufalina e alterando-se alguns substituintes, diferentes toxinas são geradas. Alguns destes compostos encontrados em venenos de animais da classe Bufonidae são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Modificações de alguns substituintes a partir da molécula de bufalina, mostrando a variedade de compostos presente no veneno da classe 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	-	-

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), considerando que eles somente liberam seu veneno quando se sentem ameaçados ou provocados.

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.

O envenenamento por toxinas de sapos manifesta-se primariamente por sintomas digitálicos-símile, efeitos cardioativos que resultam em bradicardia, diferentes graus de bloqueio atrio-ventricular, 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 citados: irritação da mucosa, vômito, salivação e muitas vezes diarreia. (KNOWLES, 1968; BEDFORD, 1974).

As toxinas dos anfíbios são bem estudadas, apesar dos raríssimos e incompletos trabalhos que encontramos sobre espécies brasileiras de sapo. Estas apresentam características 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 esteróides e compostos básicos. No primeiro estão os bufadienolídeos e as bufotoxinas, no segundo, aminas biogênicas e as bufoteninas. Os derivados esteróides são os responsáveis pelos efeitos cardiotoxícos, com ação digitálicos-símile, e os compostos básicos agem no sistema nervoso autônomo simpático e no sistema nervoso central (BICUDO, 2003). Bufadienolídeos já foram extraídos do veneno de *Rhinella schneideri* (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 em 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 Na^+K^+ -ATPase (KELLY; SMITH, 1996). Dentre os compostos presentes no veneno de sapos, as bufogeninas e bufotoxinas, derivadas do colesterol, tem propriedades que alteram o funcionamento normal do coração, aumentando a força do batimento cardíaco e diminuindo seu ritmo (CLARKE, 1996). Estes esteróides 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 *Leptodactylus*, provoca imediatamente violentas contrações do ventrículo (BRAZIL, V.; VELLARD, 1926).

Foram descritas substâncias extraídas das glândulas parotóides de *Bufo marinus* que contém fatores endógenos de digoxina-like 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 Na^+K^+ ATPásica. Por este motivo, a técnica clássica de dosagem Na^+K^+ ATPásica utiliza a diferença entre a dosagem da atividade ATPásica total e da fração inibida pela ouabaína (IBRAHIM, 1997).

Na^+K^+ -ATPase

As enzimas aparecem como importantes alvos para ação de toxinas animais. As proteínas de membranas são um potencial muito grande como alvos de drogas por serem, em sua maioria, transportadores e mediadores do interior e exterior celular. (YATIME et al., 2009).

Em sistemas vivos, a maioria das reações bioquímicas dá-se em vias metabólicas, que são sequências de reações em que o produto de uma reação é utilizado como reagente na reação seguinte. Diferentes enzimas catalisam diferentes passos de vias metabólicas, agindo de modo a não interromper o fluxo nessas vias. Cada enzima pode sofrer regulação da sua atividade, aumentando-a, diminuindo-a

ou mesmo interrompendo-a, modulando o fluxo da via metabólica em que se insere. (NELSON et al., 2004).

A membrana celular é a parte mais exposta da célula o que a torna um sítio receptor ideal para substâncias químicas, tais como toxinas, drogas e hormônios. É constituída basicamente de duas camadas de fosfolipídios, que têm incorporado intrinsecamente macromoléculas (lipoproteínas e glicoproteínas) de diferentes tamanhos e formas. Os agentes tóxicos podem reagir tanto com as proteínas ali presentes como com seus componentes lipídicos, alterando suas funções de transporte e assim a integridade da célula como um todo (YATIME et al., 2009). As proteínas de membrana são divididas em dois grupos: um que possui a maior parte de sua massa para fora do citoplasma (tipo I), e o outro que possui a maior parte de sua massa no interior do citoplasma (tipo II). Dentre as proteínas do tipo II muitas estão envolvidas em processos de transporte através da membrana e, dentre elas, está a Na^+K^+ -ATPase. (NELSON et al., 2004).

Dean (1941) foi quem primeiro descreveu a extrusão celular de íons sódio acompanhado do influxo de íons potássio e atribuiu este fenômeno à existência de uma “Bomba de Sódio” localizada na membrana celular. Skou, em 1957, descreveu a existência de uma enzima de membrana celular capaz de promover a hidrólise de ATP em presença de concentrações fisiológicas de sódio, potássio e magnésio, e a denominou Na^+K^+ -ATPase. Em seguida, diferentes grupos demonstraram a distribuição relativamente homogênea da Na^+K^+ -ATPase, como uma proteína constituinte de todas as células eucarióticas, nas diferentes espécies animais.

A Na^+K^+ -ATPase é um heterodímero composto de uma subunidade α (116 kD, 1000 aminoácidos) e uma subunidade β (55kD - 300 aminoácidos). É na subunidade α que se encontram os sítios de fosforilação e de fixação de cátions (Na^+ e K^+), ATP e glicosídeos cardíacos (IBRAHIM, 1997).

A inserção da enzima na membrana é orientada de modo que o sítio de fixação de ATP fique localizado do lado citoplasmático e o sítio de fixação dos digitálicos no lado extracelular. O modelo de funcionamento admitido para a Na^+K^+ -ATPase é o proposto por Albers, (ALBERS, 1967) onde a enzima existe sob dois estados conformacionais distintos, E1 e E2, que aparecem sucessiva e alternadamente no curso de seu ciclo reacional (Fig. 6). Do ponto de vista funcional, a Na^+K^+ -ATPase é uma bomba eletrogênica que promove a extrusão celular de íons

sódio contra a entrada de íons potássio (estequiometria 3Na⁺: 2K⁺: 1ATP) (IBRAHIM, 1997).

Figura 6. Representação esquemática da atividade da enzima Na⁺K⁺-ATPase responsável pela repolarização da célula, a qual utiliza 1 ATP para retirar do interior celular 3 átomos de Na⁺ e devolver ao interior celular 2 K⁺. (Fonte: <http://nanobiologynotes.blogspot.com>, modificado)

O transporte pela enzima Na⁺K⁺-ATPase funciona contra o gradiente de potencial eletroquímico, ou seja, há consumo de energia para ser realizado. No desempenho de suas funções, a atividade Na⁺K⁺-ATPásica consome mais de 60% do ATP produzido pelas células. A estabilidade destes sistemas enzimáticos é essencial na manutenção de uma variedade de funções fisiológicas e bioquímicas, incluindo o transporte ativo primário, a homeostase salina e osmorregulação, a integridade celular e de organelas, o potencial bioelétrico, a regulação do metabolismo mitocondrial e as contrações musculares (PHILLIPS et al., 1982).

A regulação da Na⁺K⁺-ATPase é particularmente crítica para o miocárdio, onde a enzima atua como um regulador indireto da contração. A bomba de sódio e potássio controla a concentração citoplasmática de Na⁺ no repouso, que determina a concentração de Ca²⁺ via trocador de Na⁺/Ca²⁺. Quando a Na⁺K⁺-ATPase é inibida, o trocador de Na⁺/Ca²⁺ remove o sódio intracelular acumulado, trocando-o por cálcio. Essa troca aumenta o cálcio sarcoplasmático e este é o mecanismo responsável pelo efeito inotrópico positivo dos glicosídeos cardíacos. A regulação da bomba de sódio e potássio nestes tecidos é, portanto, fundamental para determinar o 'set point' para a contração do músculo cardíaco. O mecanismo de aumento da força de

contração do coração via aumento do Na^+ celular, é considerado a base da terapia com digitálicos para insuficiência cardíaca. (THERIEN; BLOSTEIN, 2000).

A inibição da enzima Na^+K^+ -ATPase também resulta num aumento do potássio extracelular (CHI et al, 1998). Aproximadamente 95% do potássio existente no organismo estão situados no interior das células, assim, o acúmulo excessivo de potássio no líquido extracelular (hiperpotassemia) causará redução da condução elétrica e da potência da contração miocárdica, levando à parada cardíaca em assistolia. Esse efeito do potássio é o princípio fundamental da sua utilização nas soluções cardioplégicas (soluções para proteção miocárdica).

Certos esteróides derivados de plantas são inibidores potentes da bomba de sódio e potássio. A digitoxigenina e a ouabaína são membros desta classe de inibidores conhecidos como glicosídeos cardíacos, devido a seus profundos efeitos sobre o coração. A ouabaína é capaz de inibir especificamente a Na^+K^+ -ATPase, que também é o único receptor fisiológico conhecido da mesma. Trata-se de um cardiotônico que consta de um açúcar e um esteróide, unidos por uma ligação glicosídica. Sua especificidade pela Na^+K^+ -ATPase faz deste marcador uma importante ferramenta para o estudo da enzima, incluindo a investigação de interações com substâncias que interferem na atividade da Na^+K^+ -ATPase, já que a mesma liga-se à Na^+K^+ -ATPase apenas no estado E2, impedindo a volta ao estado E1 e inibindo assim sua função enzimática (SANTOS et al., 2002; VASIC et al. 2008).

Ação neurotóxica de venenos de sapos

Além das enzimas outros alvos biológicos são importantes por serem utilizados para desencadear reações sistêmicas. As toxinas animais conseguem atingir alvos essenciais à manutenção da vida tais como receptores e canais iônicos. Venenos exibem mais de um tipo de composto, com diferentes funções, sendo estes utilizados para defesa e caça.

Dessa maneira além de heterosídeos cardiotônicos o veneno de *Rhinella schneideri* apresenta em sua composição, alguns esteróides e certos tipos de alcalóides que estão relacionados com ação neurotóxica.

Alcalóides esteroidais também são de fundamental importância no estudo de substâncias provindas de sapos. Estes apresentam aminoácidos como seus precursores, principalmente os aromáticos. Um bom exemplo é a morfina, um

alcalóide 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 alcalóides encontrados nas secreções de sapos (BARRAVIERA, 1994).

Além desses também são encontrados diversos núcleos diferenciados de alcalóides com ações neurotóxicas por inibição de canais iônicos. Dentre eles podemos citar pirrolidínicos e piperidínicos (DALY et al., 2005).

Alcalóides (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 tais como colchicina, piperina, oxinas e alguns sais quaternários como o cloridrato de laurifólia (KUTCHAN, 1995; EVANS, 1996).

Os canais iônicos pertencem a uma superfamília de proteínas cujas estruturas assemelham-se a 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 atividade de 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 processos metabólicos (DENAC et al., 2000). Fluxos iônicos ocorrem quando da abertura de canais permeáveis aos íons 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).

Desta forma, 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).

Em alguns estudos, foi observado 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). Devido à presença de nitrogênio nessas moléculas de poliaminas, os alcalóides de sapos poderão apresentar ações semelhantes. 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 potenciais ferramentas 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).

Tendo em vista que o veneno de *Rhinella schneideri* constitui uma rica fonte de compostos com ações sobre importantes sistemas biológicos, este trabalho visa o isolamento e caracterização de compostos com ação sobre a Na^+K^+ -ATPase e/ou com ação anticonvulsivante ou neurotóxica.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Isolar e caracterizar componentes de baixo peso molecular presentes no veneno de *Rhinella schneideri* que apresentem ação sobre a Na^+K^+ -ATPase e/ou efeitos anticonvulsivante ou neurotóxicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os componentes de baixo peso molecular presentes no veneno de *Rhinella schneideri* através de diálise, e fracioná-lo por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna com resina de fase reversa C2C18 (CLAE-FR).
- Obter glicosídeos cardíacos e alcalóides presentes no veneno do sapo *Rhinella schneideri*.
- Avaliar a capacidade das toxinas isoladas de inibir a enzima Na^+K^+ -ATPase de rim de coelho.
- Caracterizar a latência e obter a curva dose-efeito das frações do veneno após a administração dos convulsivantes: PTZ - pentilenotetrazol (antagonista não-competitivo GABA_A), N-metil-D-aspartato - NMDA (agonista do receptor de glutamato NMDA), comparando-se aos efeitos anticonvulsivantes do diazepam, em ratos Wistar.
- Avaliar o mecanismo inibitório das frações do veneno junto à junção neuromuscular, identificando se a inibição é pré ou pós sináptica.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

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 7. 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 (antagonista não-competitivo GABA_A), NMDA (agonista do receptor de glutamato NMDA), diazepam (benzodiazepínico anticonvulsivante) adquirido da Sanofi-Synthelabo, Brasil.) e CBZ (carbamazepina, bloqueadora de canal para Na^+).

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 09.1.148.53.9)

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.

Também foram utilizados pintainhos da linhagem HY LINE W 36 de 4 a 8 dias, fornecidos pela granja Globo Aves e pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP, respectivamente. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em temperatura ambiente e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 horas sem luz). Os ensaios que utilizaram estes animais foram realizados na UNICAMP, submetidos e aprovados integralmente pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa/IB/UNICAMP), sob o protocolo nº (1027).

3.1.4. Equipamentos

- Balança Analítica Digital – *Ohaus*
- Balança Eletrônica Digital *BG-400* – *Gehaka*
- Centrífuga Eppendorf *5415R*
- Centrífuga *Sorvall Biofuge Primo R*
- Coletor de Frações conectado a duas Unidades Controladoras (Ótica e Ultravioleta – UV-1) e Registrador *REC 120*– *Pharmacia Biotech*
- Condutivímetro *CD-20* – *Digimed*
- Espectrofotômetro computadorizado *U-2001* – *Hitachi*
- Freezer -70°C – *Forma Scientific*

- Liofilizador *Flex-DryTM MP* – *FTS Systems*
- Membrana de Filtração *Millex* para seringa 0,45 e 0,22 μm - *Millipore®*
- Sistema de Cromatografia Líquida *ÄktaBasic UPC* equipado com duas bombas, detector ultravioleta (UV), detector de condutividade, coletor de frações, acoplado a um microcomputador – *GE*

3.1.5. Reagentes

- Adenosina 5'-trifosfato sal disódico – *Sigma*;
- Ouabaina Octahidratada – *Fluka*;
- Clorofórmio.- *Sigma*
- Adenosina 5'-trifosfato (ATP) Kit de ensaio de Bioluminescência - *Sigma*;
- Os demais reagentes e solventes utilizados foram todos de grau analítico.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Filtração do veneno bruto

Foi realizada uma filtração manual da suspensão de veneno em filtros com poros de 0,45 μm , devido à dificuldade de se trabalhar com a grande quantidade de muco presente na amostra. Foram suspensas 414 mg do veneno dessecado em 30 mL de água, sendo obtida uma suspensão mucosa de cor branca. Essa suspensão foi filtrada manualmente utilizando-se seringas de 10 mL e filtros Millipore de poros de 0,45 μm .

A filtração foi realizada separando-se a fração que permeava a membrana e ressuspensando-se com água destilada a fração retida, diluindo-a para facilitar o processo. Assim, duas frações foram obtidas e acondicionadas em frascos separados. O filtrado apresentou volume final de 15 mL, enquanto a fração retida pela membrana resultou em 60 mL.

3.2.2. Fração do veneno permeada pelo filtro de 0,45 μm

A fração do veneno que permeou o filtro de 0,45 μm foi submetida à diálise contra água. Utilizaram-se membranas Fisherbrand MWCO 6000-8000 contendo 15 mL da amostra. A diálise foi realizada em um béquero contendo 250 mL de água destilada. Foram realizadas quatro trocas de água, em períodos de seis em seis horas.

A fração que permeou a membrana de diálise, contendo os componentes de baixa massa molecular e denominada de AMOSTRA A, foi congelada e

posteriormente liofilizada. A fração retida pela membrana, contendo os componentes de alta massa molecular e denominada AMOSTRA B, foi também congelada e posteriormente liofilizada.

3.2.3. Fração do veneno retida pelo filtro de 0,45 μ m

Adicionaram-se 30 mL de metanol puro à mistura que não permeou o filtro de 0,45 μ m, deixando alguns minutos e misturando com um bastão de vidro. Após esta etapa foram adicionados 30 mL de clorofórmio puro. Logo, percebeu-se uma precipitação. Dividiu-se a amostra em tubos cônicos de 50 mL, levando-os para o agitador vortex e em seguida centrifugando-os a 1000 x g durante 10 minutos. Os três tubos ficaram semelhantes apresentando na parte inferior a fase clorofórmica de coloração amarelo claro, um anel mucoso de cor branca no meio dividindo a fase clorofórmica e a hidroalcoólica e uma fase hidroalcoólica na parte superior do tubo, apresentando uma coloração marrom avermelhada.

As fases hidroalcoólica e clorofórmica foram separadas, guardando-se também o anel mucoso em outro frasco. A fase clorofórmica foi seca em um béquer na capela de exaustão e o material obtido apresentava coloração marrom. A amostra foi armazenada à -20° C (AMOSTRA C).

A fase hidroalcoólica foi seca em rotavaporador e ressuspensa em 4 mL de água destilada e congelada à -20° C. Esse material apresentou uma coloração marrom intenso (AMOSTRA D).

3.2.4. Testes colorimétricos para identificação de heterosídeos cardiotônicos e alcalóides

A fração do veneno que permeou o filtro de 0,45 μ m foi submetida a ensaios colorimétricos para a identificação de heterosídeos cardiotônicos e alcalóides presentes na mesma. Pela reação qualitativa de Libermann-Burchard e Dragendorff, que consiste em precipitação de alcalóides devido a ácidos iodados presentes no meio reacional, confirmou-se a presença de alcalóides na amostra. A reação de Libermann-Burchard foi utilizada na identificação de esteróides. O ensaio consiste na adição de um pouco de anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado na solução clorofórmica. A formação de um anel castanho-avermelhado entre as fases indica a presença de esteróides na amostra (NATH et al., 1946).

3.2.5. Ensaios com a Na⁺K⁺-ATPase purificada

As amostras A, B, C e D foram submetidas ao ensaio com a Na⁺K⁺-ATPase. O experimento foi realizado com soluções contendo 1 mg da amostra em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Os experimentos foram realizados usando diferentes massas das amostras (5 µg, 50 µg e 100 µg) e a enzima Na⁺K⁺-ATPase purificada.

A Na⁺K⁺-ATPase foi isolada de rins de coelho e os ensaios de atividade enzimática foram realizados pela quantificação de fosfato liberado devido à atividade da enzima. Para estes ensaios a Na⁺K⁺-ATPase foi incubada com 5 mM de ATP e 10 mM de MgCl₂ por 30 minutos, à 30° C, na presença das frações descritas acima. A reação foi interrompida com 0,5 mL de TCA frio a 30% e a mistura centrifugada logo em seguida, a 4000 x g, antes da determinação do fosfato, como descrito por Santos et al. (2002).

Utilizando-se diferentes concentrações da AMOSTRA A e das toxinas Rs3, Rs4 e Rs5 foram também determinadas as IC_{50%} (concentração que causa 50% de inibição da Na⁺K⁺-ATPase) para as mesmas seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

3.2.6. Ensaios com a Na⁺K⁺-ATPase inserida na membrana

O experimento foi realizado com apenas as amostras A, B, C e D, em concentrações citadas no item 3.2.5. No entanto, a enzima não foi isolada e se apresentava inserida na membrana.

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados pela quantificação de fosfato liberado, como descrito por Santos et al. (2002).

3.2.7. Ensaios com Na⁺K⁺-ATPase purificada para verificação do tipo de inibição

Realizou-se o teste para determinar o tipo de inibição que a AMOSTRA A exerce sobre a enzima Na⁺K⁺-ATPase. Para classificar a inibição como reversível ou irreversível foi realizado um ensaio em que a atividade da Na⁺K⁺-ATPase foi determinada em duas amostras contendo enzima e inibidor, nas mesmas proporções, mas em diferentes concentrações (Tab. 7). O inibidor e enzima foram misturados e, após 5 min, foram adicionados ao meio reacional contendo o substrato em concentração saturante, seguindo-se a incubação por 25 min. A reação foi encerrada com 0,5 mL de TCA frio a 30% e a mistura centrifugada logo em seguida,

a 4000 x g, antes da determinação do fosfato, como descrito por Santos et al. (2002).

3.2.8. Cromatografia de fase reversa em sistema CLAE

Depois de realizados os experimentos com a Na^+K^+ -ATPase, verificou-se que a AMOSTRA A apresentou a inibição mais acentuada da atividade enzimática, quando comparada com as demais. Desta forma, escolheu-se esta fração para fazer a separação em CLAE utilizando-se uma coluna C2C18 de fase reversa. A coluna foi inicialmente equilibrada com Tampão A (solução aquosa de ácido trifluoracético, TFA, a 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 a 0,1 % + acetonitrila 80 %), em aproximadamente duas horas.

A cromatografia da Amostra A foi realizada utilizando o comprimento de onda de 214 nm, para a detecção dos constituintes da amostra, e resultou em vários picos de absorvância, sendo que os mais relevantes foram denominados de Rs1, Rs2, Rs3 Rs4 e Rs5. Seus efeitos sobre a Na^+K^+ -ATPase foram avaliados, como descrito anteriormente.

3.2.9. Cromatografia alternativa de fase reversa em sistema CLAE

Considerando-se a pequena quantidade de toxina obtida por cromatografia em relação ao tempo, decidiu-se pela alteração da mesma, visando um menor tempo para a obtenção das subfrações ativas. Para isso a coluna (C2C18) foi equilibrada e inicialmente eluída com uma mistura de 80% Tampão A (solução aquosa de TFA a 0,1%) e 20% de tampão B (solução aquosa de TFA a 0,1 % + acetonitrila 80 %). A vazão foi mantida em 0,8 mL/minuto. A amostra foi eluída com gradiente linear de acetonitrila chegando a 100% do Tampão B em trinta e seis minutos. Alguns cromatogramas também foram realizados em coluna C18, com resultados praticamente iguais.

3.2.10. Varredura no espectrofotômetro

Utilizou-se a AMOSTRA A para se fazer a varredura em diferentes comprimentos de onda, observando-se as regiões do espectro eletromagnético que apresentaram os maiores valores de absorbância.

3.2.11. Separação de alcalóides

Realizou-se uma extração clássica ácido/base (Fig. 8) do veneno bruto para a separação de alcalóides. A suspensão aquosa (2 mL) do veneno de *Rhinella schneideri* foi acidificada de 2 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 N. A mistura foi submetida à 3 extrações com 2 mL acetato de etila. A fração aquosa foi alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 9-10 e submetida à 4 extrações com 2 mL acetato de etila, gerando uma fração orgânica enriquecida em alcalóides. A fração foi desidratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada (VALENTE et al., 2006). Nessa separação os alcalóides de características básicas são transformados em sais com adição de solução ácida, logo após extrai-se o sal com solvente polar e adiciona-se uma base para que os alcalóides voltem à sua forma molecular. Realizada esta extração fez-se uma cromatografia com o material obtido, utilizando-se o mesmo procedimento cromatográfico realizado anteriormente para o fracionamento da AMOSTRA A.

Figura 8. Esquema demonstrando as etapas de separação de alcalóides envolvendo uma extração clássica ácido/base.

3.2.12. Preparação biventer cervicis de pintainho

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos foram anestesiados por via inalatória com halotano e, após o isolamento, o músculo biventer foi suspenso em uma cuba de 5 mL, contendo solução nutritiva de Krebs. A solução foi aerada de modo constante com carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂) e mantida a 37°C. O músculo foi submetido a uma tensão constante de 1 g e estimulado por meio de eletrodos bipolares posicionados na região entre o tendão e o músculo, com o objetivo de estabelecer estimulação de campo (6 V, 0,1 Hz, 2 ms) ou estimulação direta (20 V, 0,1 Hz, 0,2 ms), provenientes de estimulador (Grass S48).

As contrações musculares e as contraturas em resposta à adição exógena de KCL (20 mM) e ACh (110μM) foram registradas em um fiftógrafo (Gould RS 3400), por meio de um transdutor isométrico (Load Cell BG-10 GM) durante 120 minutos. O registro das contraturas para KCl e ACh foi realizado, na ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição da toxina) e ao final do ensaio (após 120 minutos de incubação com a toxina). Três a cinco lavagens foram efetuadas sempre após a adição de KCl ou de ACh.

Após um período de estabilização de 20 minutos, foram realizados os seguintes tratamentos: incubação com as frações de *Rhinella schneideri* (Rs3, Rs4, Rs5), na concentração de 10 μg/mL.

Os experimentos controles foram realizados com solução nutritiva de Krebs a 37°C, durante 120 minutos.

3.2.13. Avaliação da ação do veneno e toxinas sobre o sistema nervoso

3.2.13.1. Cirurgia

Antes da anestesia, os animais foram injetados com sulfato de atropina (0,5 mg/kg, por via 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: AP – 0.9 mm, ML - 1,6 mm, DV - 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.).

3.2.13.2. Atividade anticonvulsivante em modelos de indução de crise aguda

Após o descanso pós-cirúrgico, os animais (n=6 por grupo) foram levados para a sala de experimentação e injetados, por via i.c.v., com 1 µL de diferentes diluições da fração de baixa massa molecular (AMOSTRA A) do veneno e também as frações Rs3 e Rs4, após 15 min, cada grupo recebeu uma injeção de NMDA (0,17µg/µl, via i.c.v. 1µl) ou PTZ (85 mg/kg, via i.p. 0,1 mL). 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. 3).

Tabela 3. 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*.

3.2.13.3. 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.

3.2.14. Atividade anticonvulsivante em modelos de crise aguda envolvendo a fração isolada Rs5

Após os mesmos procedimentos pós-cirúrgicos citados no item 3.2.12.2. e comprovada ação anticonvulsivante da fração Rs5, decidiu-se fazer testes mais específicos com um maior número de diferentes concentrações da Rs5 e incluindo ensaios com a carbamazepina (CBZ), conforme indicado na Tabela 4.

Tabela 4. Drogas utilizadas nos ensaios para a avaliação da ação anticonvulsivante da Rs5 e as respectivas concentrações e vias de administração.

<i>Droga</i>	<i>Dose</i>	<i>Via de administração</i>
PTZ	80 mg/kg	via i.p
NMDA	20 µg/µL	via i.c.v, 1 µL
Rs5	Dose 1- 6 µg/µL;	via i.c.v, 1 µL
	Dose 2- 2 µg/µL;	via i.c.v, 1 µL
	Dose 3- 1,5 µg/µL;	via i.c.v, 1 µL
	Dose 4- 1 µg/µL;	via i.c.v, 1 µL
	Dose 5- 0,5 µg/µL;	via i.c.v, 1 µL
	Dose 6- 0,25 µg/µL;	via i.c.v, 1 µL
	Dose 7- 0,1 µg/µL;	via i.c.v, 1 µL
	Dose 8 - 0,05 µg/µL	via i.c.v, 1 µL
CBZ	Dose 1 - 20µg/µL	via i.c.v, 1 µL
	Dose 2 - 40µg/µL	via i.c.v, 1 µL
Associação CBZ	20 µg/µL	via i.c.v, 1 µL
+ RS5	0,05 µg/µL	via i.c.v, 1 µL

3.2.14.1. Teste comparativo entre a fração isolada Rs5 e a droga anticonvulsivante carbamazepina

Os animais foram divididos em grupos e cada grupo foi tratado previamente com salina, com a droga antiepiléptica carbamazepina (CBZ) em duas diferentes concentrações (20 ou 40 µg/µL), ou com a Rs5 isolada da fração de baixa massa molecular do veneno de *Rhinella schneideri*. Essas foram administradas em diferentes concentrações, 15 min antes da administração de PTZ (80 mg/Kg; i.p) ou NMDA (20 µg/µL; i.c.v).

Após esta etapa, os animais foram filmados por 60 min e, em seguida foram avaliadas as frequências de mortes, as ocorrências de crises e de suas latências, quando os ratos evoluíam para crises convulsivas. Para determinar as classes de crises, utilizou-se a classificação de “crises límbicas” segundo Lamberty & Klingaard (2000) para animais ensaiados no modelo com PTZ e com NMDA (Tab. 5).

Tabela 5. Classificação de crises convulsivas segundo Lamberty & Klingaard (2000).

Classe	Comportamento
0	Nenhuma resposta
1	Movimentos orofaciais
2	Ondas de contração pelo corpo
3	Mioclonia e elevação
4	Crises clônicas em todas as extremidades com giros para o lado
5	Crises tônico-clônicas em todas as extremidades com giros para trás

3.2.14.2. Desempenho no Rotarod e determinação do índice terapêutico

Para analisar possíveis comprometimentos motores decorrentes da administração da maior concentração de Rs5 os ratos foram ensaiados no *rotarod* (Ugo Basile, Itália), aparato que consiste em uma barra giratória (5 cm de diâmetro) movida por um motor (velocidade: 4 rpm). Um dia antes da execução do teste, os ratos foram treinados para manter o equilíbrio no *rotarod*. O treino consistiu em três tentativas subseqüentes de 1 minuto de duração cada uma. No dia do teste, os ratos foram novamente colocados no *rotarod* e, somente aqueles capazes de manter o equilíbrio no aparato foram selecionados para o procedimento experimental.

No teste, os ratos são colocados na barra giratória 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 minutos após o pré-tratamento. Depois são analisadas as latências e a frequência de queda da barra.

3.2.14.3. Atividade locomotora espontânea e comportamento exploratório

A atividade locomotora espontânea dos animais injetados com 2 µg/µL de Rs5 foi avaliada no campo aberto e comparada a dos animais injetados com diazepam e salina. O campo aberto consiste em uma arena circular (60x45cm) dividida em 12 quadrantes. Avaliou-se a atividade geral dos animais através do tempo gasto na execução de comportamentos agrupados em quatro classes (Tab. 6), de acordo com Speller & Westby (1996). Para a análise dos comportamentos foi utilizado o programa X-plot rat (CARDENAS et al., 2001).

Tabela 6. Classificação de comportamentos agrupados segundo Speller & Westby (1996).

<i>Comportamento</i>	<i>Sigla</i>	<i>Atividade</i>
Exploratório	EX	cheirar, caminhar, esquadrinhar e ficar ereto
Autolimpeza	AUTL	Atividades de limpeza de partes do corpo
Ereto	ER	Animal fica sobre as patas traseiras, apoiado ou não nas paredes da arena
Inatividade	IN	Parado

3.2.14.4. Análise estatística

Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, para distribuições normais, como análise da latência e da atividade locomotora sendo seguido do pós-teste Student Newman Keuls. Nestes testes foi considerada a diferença significativa quando o *p* foi menor ou igual a 0,5.

Para análise da significância dos experimentos de indução de crises foram utilizadas as frequências de animais que não apresentaram crises, sendo estas submetidas ao teste de Qui-quadrado.

3.2.15. Avaliação da atividade da AMOSTRA A sobre recaptação do aminoácido excitatório L-Glutamato em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos Wistar.

3.2.15.1. Preparação dos sinaptosomas de cérebro de rato

Foram utilizados os córtices cerebrais de ratos Wistar machos peso (200-250 g) que foram removidos rapidamente e homogeneizados em gelo com 0,32 M de sacarose utilizando-se equipamento do tipo Potter-Elvehjem Labo Stirrer LS-50 Yamato. A amostra foi centrifugada por 10 min a 1.700 x g (4 °C) e o sobrenadante centrifugado por 20 min a 21.200 x g (4 °C). O sedimento foi ressuspensão em tampão Krebs-fosfato (em mM: 124 NaCl; 5 KCl, 1,2 KH₂PO₄; 0,75 CaCl₂, 1,2 MgSO₄; 20 Na₂HPO₄; 10 glicose; pH 7,4), e utilizados no ensaio de captação de L-Glu. O teor de proteína foi determinado por Lowry et al. (1951), modificado por Hartree (1972). Sinaptosomas foram ressuspensos em tampão Krebs-fosfato e pré-incubados por 5 min a 37°C (de [³H]-Glutamato) na ausência ou na presença de 7 concentrações crescentes da AMOSTRA A. Os ensaios de recaptação foram iniciados por adição de [³H]-glutamato (10 nM, a concentração final, 1 mCi/mmol) (Amersham Biosciences, E.U.A.) às suspensões sinaptosomais (100 mg de proteína/mL), e incubado por 3 minutos a 37°C (Pizzo et al., 2004). O volume final de cada tubo foi de 500 µL. Todas as reações foram interrompidas por centrifugação (3000 x g, 3 min a 4 °C). Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados duas vezes com água destilada gelada, homogeneizados em 10% de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugados (3.000 x g, 3 min, a 4 °C). Alíquotas do sobrenadante foram transferidos para frascos de cintilação contendo 5 mL de coquetel de cintilação biodegradável ScintiVerse (Fisher Scientific, E.U.A.). Sua radioatividade foi quantificada em contador de cintilação (LS-6800, Beckman Coulter, E.U.A.), com uma eficiência de contagem de 50% para ³H.

3.2.15.2. Ensaio de captação

Os sinaptosomas foram ressuspensos em tampão Krebs-fosfato e pré-incubados por 5 min a 37°C na presença ou ausência de diferentes concentrações da AMOSTRA A. O experimento de captação foi iniciado pela adição de L-[³H]-glutamato (36 nM, concentração final) à suspensão de sinaptosomas (100 µg de proteína/ mL) e incubados por 3 minutos à 37°C. A reação foi finalizada por centrifugação a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante foram transferidas para tubos de

cintilação, contendo 5 mL de líquido de cintilação biodegradável miscível em água (ScintiVerse, Fisher Scientific, EUA), e suas radioatividades foram quantificadas por um espectrofotômetro de cintilação líquida (Beckman, modelo LS-6800) com 2% de erro e eficiência de contagem para ^3H de 50%.

3.2.16. Espectrometria de massas

As subfrações Rs3, Rs4 e Rs5 tiveram suas estruturas analisadas por espectrometria de massas empregando um sistema triplo-quadrupolo, Quattro LC (Micromass, Manchester, US) equipado com uma interface electrospray (ESI). As subfrações foram dissolvidas em acetonitrila:água (1:1, v/v) e submetidas 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).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS TOXINAS E AVALIAÇÃO DE SUA AÇÃO SOBRE A Na^+K^+ -ATPase

4.1.1. Fracionamento do veneno

O fracionamento inicial do veneno foi realizado por filtração e solubilização dos compostos em solventes de diferentes polaridades, sendo obtidas quatro amostras, como apresentado na Figura 9.

Figura 9. Esquema de fracionamento do veneno de *Rhinella schneideri* utilizado para a obtenção das Amostras A, B, C e D.

4.1.2. Ensaios com a enzima Na^+K^+ -ATPase purificada

Os ensaios enzimáticos com a Na^+K^+ -ATPase foram realizados em colaboração com o Professor Dr. Pietro Ciancaglini do laboratório de Bioquímica da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo campus Ribeirão Preto.

As frações A, B, C e D foram submetidas a ensaios para avaliar sua ação sobre a enzima Na^+K^+ -ATPase. Os resultados obtidos a partir dessas amostras mostraram que a fração de baixa massa molecular, ou seja, AMOSTRA A, causou uma grande inibição da atividade da Na^+K^+ -ATPase, quando comparada ao controle, que também foi realizado com concentrações semelhantes de DMSO (utilizado para solubilizar as amostras). A fração de alta massa molecular, que não permeou a membrana durante a diálise (AMOSTRA B), assim como a AMOSTRA C, apresentaram efeitos inibitórios menos relevantes. A AMOSTRA D não mostrou inibição da Na^+K^+ -ATPase. A Figura 10 mostra a inibição da enzima induzida pelas amostras.

Figura 10. Atividade da Na^+K^+ -ATPase purificada na presença das amostras A, B, C e D em diferentes concentrações (5, 50 e 100 μg). As leituras de absorbância foram realizadas em 355 nm e são diretamente proporcionais à quantidade de fosfato inorgânico liberado, que é proporcional à quebra de ATP pela Na^+K^+ -ATPase. Os dados estão expressos como média $\pm$ SE de um experimento realizado em triplicata.

4.1.3. Ensaios com a Na^+K^+ -ATPase contida na membrana

O ensaio com a Na^+K^+ -ATPase presente na membrana foi realizado com as AMOSTRAS A, B, C e D, pesando-se 1 mg de cada fração e solubilizando-se em 1 mL de DMSO (Fig. 11). Foram avaliadas 3 diferentes massas das amostras, 5 μg , 50 μg e 100 μg , e o controle foi realizado com a enzima na presença da mesma quantidade de DMSO utilizado nos ensaios com as amostras.

Estes resultados confirmam a capacidade das AMOSTRAS A, B e C em inibirem a atividade da Na^+K^+ -ATPase, mesmo quando esta se encontra inserida na membrana. Observa-se neste ensaio que a amostra D também induziu uma pequena inibição da enzima.

Figura 11. Atividade da Na^+K^+ -ATPase inserida na membrana na presença das amostras A, B, C e D em diferentes concentrações. As leituras de absorbância foram realizadas em 355 nm e são diretamente proporcionais à atividade da enzima Na^+K^+ -ATPase. Os dados estão expressos como média $\pm$ SE de um experimento realizado em triplicata.

4.1.4. Avaliação da inibição da Na^+K^+ -ATPase purificada pela AMOSTRA A

O ensaio foi realizado com a enzima Na^+K^+ -ATPase isolada da membrana na presença da fração de baixa massa molecular (AMOSTRA A) em diferentes concentrações, para determinar a concentração inibitória 50% da fração. O efeito mostrou ser dose dependente e a $\text{IC}_{50\%}$ determinada foi de 107,5 μg (Fig.12). Esta fração contém os bufadienolídeos, considerados como principais responsáveis pela ação inibidora da enzima.

Figura 12. Inibição da enzima Na^+K^+ -ATPase por diferentes concentrações da AMOSTRA A do veneno de *Rhinella schneideri*.

Para classificar a inibição como reversível ou irreversível foi realizado um ensaio em que a atividade da Na^+K^+ -ATPase foi determinada em duas amostras contendo enzima e inibidor, nas mesmas proporções, mas em diferentes concentrações (Tab. 7). Os resultados obtidos mostram que o valor de absorbância obtido com a maior concentração de enzima e AMOSTRA A foi o dobro do obtido com a menor concentração. Este resultado indica que a inibição é irreversível, visto que o substrato não foi capaz de liberar a enzima do inibidor.

Tabela 7. Inibição da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ por diferentes concentrações de AMOSTRA A para identificação do tipo de inibição.

<i>Amostra</i>	<i>Soluções</i>	<i>Abs 355 nm</i>
Branco	20 μL Amostra A (sem Enzima)	0,025
Controle DMSO	30 μL Enzima + 20 μL DMSO	0,195
Controle positivo (100%)	30 μL Enzima	0,212
AMOSTRA A	30 μL Enzima + 20 μL Amostra A	0,118
AMOSTRA A diluída	15 μL Enzima + 10 μL Amostra A + 25 μL Tampão	0,064

As leituras de absorvância foram realizadas em 355 nm e são diretamente proporcionais à atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$.

4.1.5. Varredura da AMOSTRA A em diferentes comprimentos de onda

Fez-se uma varredura em diferentes comprimentos de onda da AMOSTRA A, que se mostrou muito ativa nos testes de inibição da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, para se determinar o melhor comprimento de onda para detectar os componentes da fração durante seu fracionamento em sistema CLAE (Fig. 13).

A varredura foi feita desde 190 nm até 600 nm, na qual se detectou altas absorvâncias nos comprimentos de onda entre 250 nm e 350 nm, com máximo em 295 nm. Estes resultados indicam que o comprimento de onda de 280 nm pode ser usado para acompanhar a eluição dos componentes da AMOSTRA A durante a cromatografia. Em comprimentos de onda menores que 250 nm também foi observado um pico muito grande de absorvância, mas nesta região do espectro inúmeras substâncias absorvem, inclusive os tampões utilizados nas cromatografias, tornando esta região pouco adequada para monitorar a eluição dos componentes da amostra durante o processo de purificação.

Figura 13. Varredura da AMOSTRA A de baixa massa molecular em diferentes comprimentos de onda, entre 190 nm e 600 nm.

4.1.6. Fracionamento da amostra de baixa massa molecular em CLAE

A AMOSTRA A, de baixa massa molecular, foi submetida à cromatografia em sistema CLAE com coluna de fase reversa C2C18, na qual a separação foi realizada com o aumento do gradiente de concentração de acetonitrila (Tampão B, 80% de acetonitrila e TFA 0,1%). Foram obtidas várias subfrações, das quais as 4 majoritárias foram denominadas por ordem de eluição como *Rs1*, *Rs2*, *Rs3*, *Rs4* (Fig. 14). Estas subfrações foram posteriormente submetidas a testes de inibição com a enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$.

Figura 14. Perfil cromatográfico da AMOSTRA A de baixa massa molecular em coluna de fase reversa C2C18. A coluna 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 duas horas.

4.1.7. Cromatografia alternativa de fase reversa em sistema CLAE

Foi feita uma alteração do método cromatográfico utilizado para purificar os componentes ativos presentes na AMOSTRA A, visando a obtenção de toxinas purificadas em menor tempo (Fig. 15). O acúmulo de frações purificadas para os ensaios biológicos foi uma etapa que requereu muitas horas de trabalho.

Ao realizar-se esse novo perfil mudou-se também o comprimento de onda utilizado para a detecção das frações. Devido à maior sensibilidade deste novo comprimento de onda, foi possível identificar uma nova subfração (RS 5), a qual também se mostrou ativa.

Figura 15. Perfil cromatográfico da AMOSTRA A de baixa massa molecular em coluna de fase reversa C2C18. A coluna C2/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.

4.1.8. Ação das subfrações *Rs3*, *Rs4* e *Rs5* sobre a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$.

As subfrações foram submetidas a ensaios com $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e os resultados obtidos confirmam que as 3 amostras são capazes de inibir a atividade da enzima, de forma dose dependente, como evidenciado pelos baixos valores de absorbância em 355 nm, que são diretamente proporcionais à produção de fosfato inorgânico (Tab. 8). Estes ensaios, realizados com diferentes concentrações das amostras, foram utilizados para a determinação da $\text{IC}_{50\%}$ de cada amostra. Para isso foram utilizados os dados de absorbância e as correspondentes porcentagens de inibição. Os valores obtidos de $\text{IC}_{50\%}$ para a *Rs3*, *Rs4* e *Rs5* podem ser observados na Figura 16.

Tabela 8. Atividade da Na^+K^+ -ATPase na presença e ausência de *Rs3*, *Rs4* e *Rs5*.

FRAÇÕES	Absorbância em 355 nm						
	0	1 µg	5 µg	10 µg	20 µg	50 µg	100 µg
<i>Rs3</i>	0,462 ± 42,0	0,396 ± 24	0,365 ± 28,7	0,341 ± 24,1	0,259 ± 19,7	0,216 ± 23,2	0,228 ± 30,1
<i>Rs4</i>	0,462 ± 42,0	0,363 ± 49,8	0,389 ± 51,1	0,399 ± 41,5	0,201 ± 25,5	0,258 ± 62	-
<i>Rs5</i>	0,484 ± 33,5	0,446 ± 14,2	0,431 ± 9,5	0,361 ± 9,2	0,331 ± 42,7	0,276 ± 10,5	0,242 ± 4,5

Os dados representam a média ± o desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.

Figura 16. Inibição da enzima Na⁺K⁺-ATPase por diferentes concentrações da (A) Rs3, (B) Rs4 e (C) Rs5. Os dados representam a média ± o desvio padrão de um ensaio realizado em triplicata.

4.1.9. Testes colorimétricos para a identificação de heterosídeos cardioativos e alcalóides

Realizaram-se duas reações de caráter qualitativo para a identificação de heterosídeos cardiotivos e alcalóides. Uma delas visa à identificação de anéis esteroidais (características de heterosídeos cardiotivos) e a outra, alcalóides. As reações são denominadas Libermann-Burchard e Dragendorff, respectivamente. Na primeira ocorreu o aparecimento de um anel na cor castanho-avermelhado formado pela adição de ácido sulfúrico, devido à presença de heterosídeos na amostra, como pode ser visualizado na Figura 17. Na segunda reação ocorreu precipitação de alcalóides, devido a sua interação com ácidos iodados, presentes no reagente de Dragendorff. Estes resultados indicam, portanto, a presença de heterosídeos cardioativos e alcalóides no veneno de *Rhinella schneideri*.

Figura 17. Tubo de ensaio contendo a solução com o veneno bruto de *Rhinella schneideri* onde ocorreu a reação de Libermann-Burchard. Observa-se entre a fase clorofórmica e a parte superior contendo os reagentes um anel na coloração castanho-avermelhado, o que indica a presença de anéis esteroidais característico de heterosídeos cardioativos.

4.1.10. Separação de alcalóides

Foi realizada extração clássica ácido/base do veneno bruto dialisado de *Rhinella schneideri* (AMOSTRA A), utilizando-se HCl, NH₄OH e acetato de etila, para

o fracionamento do veneno, resultando em uma mistura contendo os alcalóides da amostra, parcialmente purificados por este tipo de procedimento.

Os alcalóides são substâncias básicas e quando submetidos a um ácido forte sofrem uma ionização sendo, dessa maneira, solúveis em solventes polares. Após a extração dos compostos apolares da amostra com acetato de etila, a fase aquosa, contendo os compostos ionizados, foi adicionada de NH_4OH . Com isso, os alcalóides voltaram à forma molecular e foram extraídos com clorofórmio. Em seguida a amostra foi seca e submetida à cromatografia em CLAE-FR, sendo obtidos 4 picos de absorbância majoritários.

Figura 18. Perfil cromatográfico da AMOSTRA A, após extração ácido/base, em coluna de fase reversa C2C18 para identificação de alcalóides. A coluna C2/C18 foi inicialmente equilibrada e eluída 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 duas horas.

4.1.11. Espectrometria de massas

As subfrações Rs3, Rs4 e Rs5 tiveram suas massas moleculares determinadas por espectrometria de massas, empregando um sistema triplo-quadrupolo, Quattro LC (Micromass, Manchester, US) equipado com uma interface electrospray (ESI). Os resultados obtidos mostraram, em ordem decrescente de

massa, um componente com m/z 403 (Figs. 19 e 20), outro com m/z 401 (Figs. 21 e 22) e o último com m/z 387 (Figs. 23 e 24), correspondentes ao índice de protonação $[M+H]^+$ e às subfrações Rs3, Rs4 e Rs5, respectivamente.

A molécula Rs3 apresentou massa molecular de 403 Da e, pela análise de literatura (TEMPONE et al., 2008), deve corresponder à telocinobufagina. A fórmula e estrutura molecular da mesma são apresentadas na Figura 19.

$C_{24}H_{34}O_5$ -(3beta,5beta)-3,5,14-trihidroxibufa-20,22-dienolideo

Figura 19. Fórmula e estrutura molecular da Telocinobufagina

ACN:H₂O (50:50)

MATHEUS ASTERISCO VRS 5 MS SCAN ESI POS 1 (0.027) Sm (Mn, 5x1.00)

Scan ES+
1.27e7

Figura 20. Espectro de massas da Rs3 mostrando o pico com m/z 403, que resultou na provável identificação da molécula de Telocinobufagina.

A molécula obtida por cromatografia da AMOSTRA A e denominada Rs4 apresentou em sua análise por espectrometria de massas um pico com m/z 401, que provavelmente corresponde à molécula de desacetilcinobufagina ($C_{24}H_{32}O_5$), ou seja, uma estrutura proveniente da desacetilação da cinobufagina (YE et al., 2006). Nota-se nesta molécula a ausência da hidroxila no carbono 14 (Fig. 21), que é muito importante para sua atividade e será discutida posteriormente. Esta amostra não está pura e apresenta outro componente com m/z 423.

Figura 21. Moléculas de cinobufagina sofrendo desacetilação e transformando-se na molécula de Desacetilcinobufagina.

Figura 22. Espectro de massas da Rs4 mostrando o pico com m/z 401 que resultou na provável identificação da molécula de Desacetilcinobufagenina.

Finalmente, a molécula correspondente ao pico Rs5 da cromatografia mostrou em sua espectrometria de massa um pico com m/z de 387. Este dado indica que a Rs5 corresponde, provavelmente, à molécula de bufalina (STEYN e HEERDEN, 2006; YE et al., 2006). A fórmula e estrutura molecular da mesma são apresentadas na Figura 23.

$C_{24}H_{34}O_4$ - (3beta,5beta)-3,14-dihidroxibufa-20,22-dienolideo

Figura 23. Fórmula e estrutura molecular da Bufalina

ACN:H2O (50:50)

MATHEUS ASTERISCO VRS 7 MS SCAN ESI POS 1 (0.027) Sm (Mn, 5x1.00)

Scan ES+
1.36e7

Figura 24. Espectro de massas da Rs5 mostrando o pico com m/z 387 que resultou na provável identificação da molécula de Bufalina.

4.2. ATIVIDADE DAS FRAÇÕES RS3, RS4 E RS5 NA PREPARAÇÃO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO

Os ensaios envolvendo atividade das frações em preparação biventer cervicis de pintainhos foram realizados em colaboração com a Dra. Léa Rodrigues Simione, do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Na preparação biventer cervicis de pintainho, após adição das frações Rs3 e Rs5 observou-se um progressivo bloqueio neuromuscular irreversível, enquanto a subfração Rs4 não induziu nenhum efeito significativo (Figs. 25, 26 e 27). Os resultados mostram que na concentração de 10 µg/mL, as subfrações ativas promoveram um bloqueio neuromuscular completo em curto período de tempo. Em um segundo momento observou-se também que o tipo de inibição se mostrou irreversível após lavagens.

Os tempos observados para as frações produzirem o efeito de inibição foram diferentes, ou seja, a fração Rs3 apresentou uma inibição muito mais rápida que a fração Rs5.

Também foi constatado que, após a inibição total da contração da musculatura pela Rs3, a administração de acetilcolina diretamente no banho não teve seu efeito contrátil alterado, sugerindo que o tipo de inibição induzido pela toxina é pré-sináptico.

Figura 25. Perfil de inibição da contração muscular ao se adicionar a subfração Rs3 do veneno de *Rhinella schneideri*, mostrando o rápido bloqueio. A Figura ainda mostra a resposta da preparação à administração de acetilcolina e logo após o KCl.

Figura 26. Perfil mostrando a resposta da preparação à subfração Rs4 do veneno de *Rhinella schneideri*.

Figura 27. Perfis mostrando a comparação entre os efeitos das frações Rs3 (A) e Rs5 (B) respectivamente, em relação ao tempo de bloqueio total da contração da musculatura. Observa-se também na figura a resposta à administração de acetilcolina e KCl na presença das toxinas.

4.3. AVALIAÇÃO DA AÇÃO NEUROTÓXICA E OU NEUROPROTETORA

Os ensaios da avaliação da ação neurotóxica e ou neuroprotetora foram realizados em colaboração com o Professor Dr. Wagner Ferreira dos Santos do laboratório de Psicobiologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo campus Ribeirão Preto.

4.3.1. Atividade sobre a recaptação do aminoácido excitatório L-Glutamato em sinaptossomas cérebro-corticais de ratos Wistar

A AMOSTRA A, que contém os bufadienolídeos, induz um aumento da recaptação do aminoácido L-glutamato em sinaptossomas cérebro-corticais de ratos Wistar. Esse aumento da recaptação foi observado principalmente nas menores concentrações testadas (10^{-5} a 10^{-2}) e pode indicar uma possível ação neuroprotetora da amostra (Figura 28). No entanto, observa-se que em concentrações maiores este efeito é revertido, chegando a valores iguais aos do controle na maior concentração (10 $\mu\text{g/mL}$). Este efeito inesperado pode ser consequência da presença de componentes com ações antagônicas presentes na AMOSTRA A.

Figura 28. Efeitos de concentrações crescentes da AMOSTRA A. (10^{-5} a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) na captação de $[^3\text{H}]\text{-L-Glu}$. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM de três experimentos realizados em triplicata. A significância estatística foi determinada pelo teste *post hoc* de *Newman Keuls* (* $p < 0,001$) em relação ao controle.

4.3.2. Atividade anticonvulsivante em modelos de indução de crise aguda

4.3.2.1. Amostra A

O pré-tratamento com diferentes concentrações da AMOSTRA A do veneno de *Rhinella schneideri* inibiu crises tônico-clônicas induzidas pela injeção sistêmica de PTZ de maneira dependente de dose. Neste sentido, a análise da frequência de animais protegidos contra crises convulsivas induzidas pelo PTZ foi significativamente menor em animais tratados com a AMOSTRA A nas doses 2, 3 e 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($\chi^2= 10.26, 4; p=0,0362$) (Fig. 29).

Figura 29. Gráfico das porcentagens de animais protegidos contra crises induzidas pelo **PTZ** após a injeção de diferentes concentrações da AMOSTRA A. As frequências de animais protegidos foram analisadas utilizando-se o teste de qui-quadrado, seguido do teste de Fischer, considerando-se $p<0.05$. ** $p<0.01$.

A análise da média das latências para o desencadeamento de crises em animais não protegidos, revelou que os animais tratados com a AMOSTRA A nas concentrações de 2 e 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram crises convulsivas com latência maior que os animais do grupo controle [$F(4,5)=7,741; p=0,0032$]. Em contraste, animais tratados com a dose de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, que protegeu 75% dos animais contra crises, não apresentaram latências para crises estatisticamente diferentes dos animais do grupo controle (Fig. 30).

Figura 30. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crises em animais não protegidos contra crises induzidas pelo **PTZ** após a injeção de diferentes concentrações de AMOSTRA A. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.01$. Os números entre parênteses acima das colunas representam o número de animais utilizados.

Os experimentos nos quais foi utilizado NMDA demonstraram que os animais tratados com diferentes concentrações da AMOSTRA A não apresentaram crises tônico-clônicas induzidas pela injeção por via i.c.v. de NMDA. Nestes experimentos, a análise da frequência de animais protegidos contra crises convulsivas induzidas pelo NMDA foi significativamente menor em animais tratados com AMOSTRA A nas doses 0,5; 1 e 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($\chi^2 = 15.67$, 5; $p = 0,0079$) (Figura 31).

Figura 31. Gráfico das médias porcentagens de animais protegidos contra crises induzidas pelo **NMDA** após a injeção de diferentes concentrações de AMOSTRA A. Dados analisados utilizando-se o teste de qui-quadrado seguido do teste de Fischer, considerando-se (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.01$.

Em contraste com os experimentos de indução de crises pela injeção de PTZ, a análise da média das latências para o desencadeamento de crises em animais injetados por via i.c.v. com NMDA e não protegidos, revelou que apenas os animais tratados com AMOSTRA A na concentração de 0,5 µg/µL apresentaram crises convulsivas com latência maior que os animais do grupo controle, bem como animais tratados com outras concentrações do veneno [$F(4,5) = 7,741$; $p = 0,0032$] (Figura 32).

Figura 32. Gráfico das médias percentagens de animais protegidos contra crises induzidas pelo NMDA após a injeção de diferentes concentrações de AMOSTRA A. Dados foram analisados utilizando-se teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey considerando-se (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.01$. Os números entre parênteses acima das colunas representam o número de animais utilizados.

4.3.2.2. Frações Rs3 e Rs4

Os ensaios realizados com as frações Rs3 e Rs4 indicaram que estas não bloquearam os efeitos dos convulsivantes químicos em nenhuma das doses administradas. No entanto, o pré-tratamento dos animais com estas frações aumentou significativamente a latência para o desencadeamento das crises.

O pré-tratamento com a Rs3 induziu aumento da latência para o desencadeamento das crises induzidas por PTZ apenas quando administrada a menor dose da fração [$F(4,18) = 21,56$ $p < 0.0001$]. Neste caso, foram detectadas diferenças estatísticas entre as médias das latências para crise após o tratamento com a menor dose em relação às demais doses ($p < 0,001$) (Fig. 33). No caso do pré-tratamento com a Rs4, foi observado um aumento da latência para o desencadeamento das crises induzidas por PTZ apenas quando administrada a menor dose da fração [$F(3,16) = 4,771$ $p < 0,0187$] (Fig. 34).

Figura 33. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crises contra crises induzidas pelo PTZ após a injeção de diferentes concentrações da Rs3. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando (***) $p < 0,0001$. Os números entre parênteses acima das colunas representam o número de animais utilizados.

Figura 34. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crises contra crises induzidas pelo PTZ após a injeção de diferentes concentrações de Rs4. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. Os números entre parênteses acima das colunas representam o número de animais utilizados.

Dados semelhantes foram observados no caso das crises induzidas por NMDA após o pré-tratamento com a Rs3, a qual induziu um aumento da latência para as crises na menor dose da fração [$F(3,14)= 5,495$ $p< 0,0149$] (Fig. 35).

Figura 35. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crises contra crises induzidas pelo NMDA após a injeção de diferentes concentrações de Rs3. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando (*) $p<0,05$. Os números entre parênteses acima das colunas representam o número de animais utilizados.

Para o pré-tratamento com a Rs4, as três doses testadas (1, 2 e 4 µg/µL) induziram aumento na latência para o desencadeamento das crises induzidas por NMDA [$F(3,16)=15,06$ $p=0,0002$] (Fig. 36).

Figura 36. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crises contra crises induzidas pelo NMDA após a injeção de diferentes concentrações de Rs4. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando (**) $p < 0,001$ e (***) $p < 0,0001$. Os números entre parênteses acima das colunas representam o número de animais utilizados.

4.3.3. Fração Rs5

4.3.3.1. Atividade anticonvulsivante da Fração Rs 5 em modelo PTZ

Os testes demonstram que a fração Rs5 apresenta efeito anticonvulsivante contra crises induzidas por PTZ. A concentração de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ protegeu 100% dos animais contra crises tônico-clônicas, enquanto as concentrações de 0,5; 1 e 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ bloquearam as crises em 40, 60 e 84% dos animais, respectivamente ($\chi^2 = 18,05$; 5, $p = 0,0029$) (Tab. 9). A partir dessas doses foi elaborado um gráfico representativo das porcentagens de proteção contra crise, onde os dados foram analisados através de regressão não linear do tipo dose-resposta sigmoidal para cálculo da DE_{50} (Fig. 37). No gráfico de dose-resposta foi observado que a dose efetiva em 50% dos animais é de 0,42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($r^2 = 0,0856$).

Tabela 9. Porcentagem de proteção contra crises induzidas por injeção i.p de PTZ (80mg/ kg).

<i>Tratamento</i>	<i>% de proteção/ nº total de animais</i>
Salina (0,9%; i.c.v)	0 (0/6)
Rs 5 (0,25 µg/µL; i.c.v)	0 (0/4)
Rs 5 (0,5 µg/µL; i.c.v)	40 (2/5)
Rs 5 (1 µg/µL; i.c.v)	60 (3/5)
Rs 5 (1,5 µg/µL; i.c.v)	84 (5/6)
Rs 5 (2 µg/µL; i.c.v)	100 (5/5)

Figura 37. Gráfico das porcentagens de proteção contra crises tônico-clônicas generalizadas induzidas pela administração da fração Rs5, 15 min antes do convulsivante PTZ. Dados foram analisados através de regressão não linear do tipo dose-resposta sigmoideal para cálculo da DE₅₀.

A concentração de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ não se apresentou eficaz no bloqueio das crises tônico-clônicas (Tab. 9). Todavia, esta dose foi capaz de aumentar a média das latências para crise, assim como as concentrações de 0,5; 1 e 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Apesar de terem aumentado a média das latências, nenhuma dose promoveu um aumento de latência estatisticamente significativo ($p = 0,0842$). Devido ao baixo número de ratos que desenvolveram crises tônico-clônicas nas doses de 1 e 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, não foram observadas alterações significativas (Fig. 38).

Figura 38. Gráfico das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crise em animais não protegidos contra crises induzidas por PTZ, após a injeção de diferentes concentrações de Rs5. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido de pós-teste *Student Newman Keuls*. Os números entre parênteses acima das colunas representam o número de animais utilizados.

4.3.3.2. Atividade anticonvulsivante da Fração Rs 5 em modelo NMDA

No ensaio convulsivante com NMDA foram administrados como tratamento salina (controle) e Rs5 nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1 e 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tab. 10). Além disso, a Carbamazepina foi utilizada como controle positivo de ação anticonvulsivante (Tab. 11), nas doses de 20 e 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, injetadas via i.c.v., assim como a associação da dose de carbamazepina que protegeu 50% (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dos animais com a dose fração da Rs5 que protegeu 50% dos animais (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Tabela 10. Porcentagem de proteção contra crises induzidas por injeção i.c.v. de NMDA (20 µg/µL).

<i>Tratamento</i>	<i>% de proteção/ n° total de animais</i>
Salina (0,9%; i.c.v)	0 (0/6)
Rs 5 (0,05 µg/µL; i.c.v)	50 (4/8)
Rs 5 (0,1 µg/µL; i.c.v)	57 (4/7)
Rs 5 (0,5 µg/µL; i.c.v)	67 (4/6)
Rs 5 (1 µg/µL; i.c.v)	83 (5/6)
Rs 5 (2 µg/µL; i.c.v)	100 (5/5)

Tabela 11. Estudo comparativo de proteção entre a fração Rs5 e a carbamazepina contra crises induzidas por injeção i.c.v de NMDA (20 µg/µL).

<i>Tratamento</i>	<i>% de proteção/ n° total de animais</i>
CBZ (20 µg/µL; i.c.v)	50 (2/4)
CBZ (40 µg/µL; i.c.v)	100 (5/5)
CBZ + Rs5 (20 µg/µL; 0,05 µg/µL; i.c.v)	100 (5/5)

Os testes demonstram que a fração Rs5 também apresenta efeito anticonvulsivante contra crises induzidas por NMDA. Na concentração de 2 µg/µL protegeu 100% dos animais contra crises tônico-clônicas, enquanto as concentrações de 0,05; 0,1 0,5e 1 µg/µL bloquearam as crises em 50, 57, 67 e 84% dos animais, respectivamente (Tab. 10) ($\chi^2 = 29.49,8$; $p = 0,006$). Também para NMDA, a partir dessas doses, foi elaborado um gráfico representativo das porcentagens de proteção contra crise, onde os dados foram analisados através de regressão não linear do tipo dose-resposta sigmoidal para cálculo da DE₅₀ (Fig. 39). No gráfico de dose-resposta foi observado que a dose efetiva em 50% dos animais é de 0,05 µg/µL ($r^2 = 0,95$).

Figura 39. Gráfico das porcentagens de proteção contra crise tônico-clônica generalizada induzidas pela administração da fração Rs5 15 min antes do convulsivante NMDA. Os dados foram analisados através de regressão não linear do tipo dose-resposta sigmoidal para cálculo da DE_{50} .

Foram também analisadas as médias das latências para o desencadeamento de crises em animais não protegidos.

A análise estatística revelou que os animais tratados com carbamazepina 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ não apresentaram diferença estatística quanto a latências para início das crises tônico-clônicas, quando comparadas com o grupo controle. Por outro lado, os animais tratados com as diferentes concentrações de Rs5 apresentaram um aumento estatisticamente significativo nas latências para início das crises tônico-clônicas. Este aumento foi dependente da dose utilizada. [$F(6,16) = 8,180$; $p = 0,0004$] (Fig. 40).

Figura 40. Gráfico representativo das médias $\pm$ EPM das latências para o desencadeamento de crise em animais não protegidos contra crises induzidas por NMDA, após a injeção de diferentes concentrações de Rs5. Dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguido de pós-teste *Student Newman Keuls*. Os números entre parênteses acima das colunas representam o número de animais utilizados.

4.3.4. Comprometimento motor no *Rotarod*

Foram calculadas as freqüências de queda no *Rotarod* (barra giratória) após o pré-tratamento com a fração Rs5, nas concentrações de 2 µg/µL e 6 µg/µL (Tab. 12). Nenhum animal caiu do aparato com os pré-tratamentos, indicando que estas concentrações não causaram comprometimento locomotor. Esse resultado é interessante uma vez que a dose efetiva (2 µg/µL), assim como uma dose três vezes maior que a efetiva (6 µg/µL), não provocaram ataxia nos animais.

Tabela 12. Comprometimento locomotor no teste Rotarod.

<i>Tratamento</i>	<i>Freqüência de queda</i>	<i>n</i>
Rs5 (2 µg/µL; i.c.v)	0%	5
Rs5 (6 µg/µL; i.c.v)	0%	2

4.3.5. Atividade locomotora espontânea e atividade exploratória

Foi avaliada no experimento de Campo Aberto a atividade geral dos animais pelo tempo gasto na execução de comportamentos de autolimpeza, exploração, elevação e inatividade, nos diferentes tratamentos (Fig. 41).

No comportamento de autolimpeza não foi obtida diferença estatística entre os grupos, mas foi observada uma ligeira diminuição no tempo gasto com essas atividades nos animais tratados com diazepam, em relação ao grupo salina, resultado semelhante àquele apresentado pelos animais tratados com Rs5 [$F_{(2,14)} = 1,266$; $p < 0,05$].

Ao analisar o comportamento de exploração também não se nota diferença estatística entre os grupos tratados com Diazepam ou Rs5, em relação ao grupo salina [$F_{(2,14)} = 1,220$; $p < 0,05$]. Já em relação ao tempo de inatividade observa-se o mesmo comportamento tanto para o Diazepam quanto para o tratamento com a Rs5 [$F_{(2,14)} = 3,684$; $p < 0,05$].

Com relação ao comportamento de elevação, os animais que foram injetados com a fração apresentam comportamento muito próximo ao dos animais injetados com salina, ainda que os primeiros tenham executado elevações na arena por tempos maiores [$F_{(2,14)} = 1,515$; $p < 0,05$].

Figura 41. Análise da atividade geral dos animais tratados com salina (0,9%), diazepam (2mg/kg) e Rs5 2µg/µL no campo aberto. As médias foram submetidas a análise ANOVA de uma via seguida pelo teste *Student Newman-Keuls*.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO VENENO

No presente trabalho foram realizados o isolamento e a caracterização funcional de toxinas do veneno de *Rhinela schneideri*. 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). Na medicina chinesa, extratos de secreções de bufonídeos são utilizados como agentes cardiotônicos, diuréticos, anodínicos e antineoplásicos (ZHANG et al., 2005).

O veneno bruto foi extraído pela compressão das glândulas parotóides (Fig. 7) 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. Os procedimentos iniciais de fracionamento foram realizados a fim de separar o muco dos componentes tóxicos de interesse, desta forma, foram obtidas 4 frações do veneno (Fig. 9). Para este fracionamento foram utilizados métodos físicos, como a separação por uma membrana de diálise, e químico, como a extração por solventes de diferentes polaridades. Nos métodos físicos obtiveram-se frações de baixa massa molecular que permearam a membrana e frações de alta massa molecular que não permearam. Substâncias descritas na literatura como bufadienolídeos apresentam um esqueleto molecular esteroidal, portanto, devem ser encontrados na fração de baixa massa molecular, que foi denominada de AMOSTRA A. Por outro lado, a fração retida pela membrana é, provavelmente, composta por proteínas e outras moléculas de alta massa molecular e foi denominada de AMOSTRA B.

A diálise não é totalmente efetiva na separação dos componentes de baixa massa molecular, porque 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. Espera, portanto que um mesmo composto seja encontrado em mais de uma amostra, mas em diferentes proporções. Por isso, foi também

realizada uma extração envolvendo solventes de diferentes polaridades. A diferença no coeficiente de partição dos diferentes componentes do veneno retidos pelo filtro de 0,45 μm , em solventes polares e apolares, permitiu a obtenção de duas frações adicionais, que foram denominadas de AMOSTRA C e AMOSTRA D. Considerando que estes processos são apenas parcialmente efetivos na separação de diferentes compostos, era fundamental identificar qual amostra apresentava maior proporção dos componentes tóxicos, com ação sobre a enzima Na^+K^+ -ATPase, responsáveis pelos efeitos cardiotoxicos do veneno.

5.2. ATIVIDADE SOBRE A ENZIMA Na^+K^+ -ATPase

5.2.1. Atividade das 4 frações obtidas do veneno de *Rhinella schneideri*

A Na^+K^+ -ATPase, ou bomba de Na^+/K^+ é uma enzima localizada na membrana plasmática de grande parte das células eucarióticas e transporta os íons Na^+ e K^+ contra seus gradientes eletroquímicos, apresentando um papel vital para a homeostasia celular. Além da função de transporte iônico, diversos trabalhos recentes indicam que a enzima também apresenta outras funções como de suporte (*scaffolding*) e de sinalização, via interações proteína-proteína. De forma surpreendente, a função sinalizadora é estimulada pela interação com os glicosídeos cardiotônicos, classicamente conhecidos como inibidores da atividade da bomba de Na^+/K^+ (VERSIC, et al. 2008).

A ação dos inibidores da bomba de Na^+/K^+ na regulação da pressão arterial e na gênese da hipertensão é sugerida pelos dados que mostram que, sob condições de expansão do volume plasmático, pelo aumento da carga de sal, e em algumas formas de hipertensão humana e animal, as concentrações plasmáticas dos fatores endógenos “digitalis-like” (EDLF) aumentam e podem contribuir para a vasoconstrição (PAMNANI et al., 1981; GOTO et al., 1992; HAMLYN et al., 1992).

Pela importância que a enzima Na^+K^+ -ATPase apresenta em diferentes processos biológicos e pela conhecida ação sobre ela de moléculas do tipo heterosídeos cardioativos, decidiu-se avaliar quais frações do veneno seriam capazes de inibir sua atividade enzimática.

Além do conhecido efeito sobre a Na^+K^+ -ATPase, é também documentado que diferentes componentes de venenos de sapos apresentam atividades

antineoplásicas e ações sobre o sistema nervoso central (STEYN; HEERDEN, 1998).

Os resultados obtidos no presente trabalho (Fig.10 e Fig. 11) mostraram que a AMOSTRA A apresentou efeito inibitório relevante sobre as duas situações em que a Na^+K^+ -ATPase se encontrava (inserida ou não na membrana). Foram observadas inibições significativas também pelas AMOSTRAS C e D, porém seus efeitos foram menos intensos e, provavelmente, devidos às mesmas toxinas presentes na AMOSTRA A, mas em menores proporções. Com base nestas considerações, os estudos subsequentes foram todos realizados com os componentes presentes na AMOSTRA A, rica em compostos de baixa massa molecular e com forte ação inibitória da Na^+K^+ -ATPase.

5.2.2. Atividade da AMOSTRA A sobre a enzima Na^+K^+ -ATPase

Por ter demonstrado um maior potencial inibitório sobre a enzima Na^+K^+ -ATPase, escolheu-se a AMOSTRA A para a realização de ensaios mais criteriosos. Esses ensaios poderiam confirmar a suposição inicial de que nesta fração se encontravam os bufadienolídeos responsáveis pela ação cardiotóxica do veneno.

Os resultados obtidos mostraram que, quando exposta a diferentes concentrações da AMOSTRA A, a enzima Na^+K^+ -ATPase teve sua atividade inibida de maneira dose dependente. A $\text{IC}_{50\%}$ da AMOSTRA A obtida foi de 107,5 μg , nas condições de ensaio (Fig.12). Estes resultados são importantes para a caracterização da ação farmacológica e toxicológica da amostra.

Realizou-se também um ensaio que indica que a atividade inibitória da AMOSTRA A sobre a enzima é do tipo irreversível. Neste ensaio a enzima e o inibidor (AMOSTRA A) foram previamente misturado, para permitir a interação dos mesmos. O ensaio foi realizado com duas concentrações diferentes desta mistura, sendo uma a metade da outra. Os dados obtidos mostram que a enzima teve sua capacidade em realizar a hidrólise de ATP reduzida quando estas misturas foram adicionadas ao meio reacional. A atividade foi proporcional às suas concentrações, indicando que o inibidor não se desligou da enzima, o que é indicativo de inibição irreversível.

Os estudos realizados evidenciaram a ação do veneno de *Rhinella schneideri* na inibição da enzima Na^+K^+ -ATPase, mostrando a importância em se conhecer

suas propriedades, tanto para usá-lo como fonte de princípios ativos de novos medicamentos como para otimizar o tratamento de possíveis intoxicações.

5.3. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES DE BAIXA MASSA MOLECULAR PRESENTES NA AMOSTRA A

5.3.1. Isolamento por CLAE

O veneno de *Rhinella schneideri* (AMOSTRA A) foi submetido a cromatografia líquida de alta eficiência e mostrou o aparecimento de diversas frações (Fig.14). Essas frações se apresentavam em baixíssimas quantidades a cada processo cromatográfico. Em virtude da longa duração e a baixa quantidade de material obtido, decidiu-se modificar a metodologia priorizando os picos intermediários que se enquadravam nas características físico químicas de solubilidade dos bufadienolídeos. Com a nova metodologia de análise cromatográfica (Fig. 15), foram obtidas três frações majoritárias que poderiam ser responsáveis por ações farmacológicas e ou toxicológicas importantes do veneno de *Rhinella schneideri*. Essas frações foram denominadas Rs3, Rs4 e Rs5.

5.3.2. Caracterização estrutural por espectrometria de massas

Visto que a AMOSTRA A apresentou relevante atuação inibitória sobre a enzima Na^+K^+ -ATPase e sua análise cromatográfica revelou diferentes frações, decidiu-se caracterizá-las por espectrometria de massas e comparar as massas moleculares obtidas com dados de literatura. Adicionalmente, este ensaio foi também importante para verificar a pureza das frações obtidas. Até o momento não foi possível realizar a ressonância magnética nuclear para caracterização da estrutura molecular das toxinas, devido à dificuldade em se obter as quantidades necessárias de frações. Isso faz com que apresentemos apenas sugestões para as estruturas dos componentes isolados. No entanto, a probabilidade de que as estruturas propostas correspondam realmente às toxinas isoladas é muito alta.

Uma configuração estrutural muito importante para a atividade das moléculas cardioativas, é a orientação C-14 β , sendo que um elemento muito importante, porém não fundamental, é a presença de uma hidroxila terciária nesta posição. Um bom exemplo é a 14-epidigitoxigenina, que é inativa, comparada com a 14-desóxi-digitoxigenina (14 β -H), que é ativa. O mais importante é a verificação dos derivados

que apresentam grupamentos epóxi, pois são inativos, e estes podem ser representados por 8,14- β,β . A introdução de grupamentos funcionais oxigenados tendem a diminuir a atividade inotrópica positiva na maioria das moléculas (SIMÕES et al. 1999).

As conformações estruturais desempenham um papel fundamental na determinação da atividade de bufadienolídeos. A importância dos substituintes nos C-14 e C-15 foram estudadas por Shigei et al. (1973), que mostraram que a hidroxila C-14- β é indispensável para a atividade cardiotônica. (STEYN; HEERDEN, 1998).

Os dados da espectrometria de massas, associados aos de literatura (Fig. 20, Fig. 22 e Fig. 24), mostraram que as três moléculas, denominadas de Rs3, Rs4 e Rs5, podem ser identificadas como Telocinobufagina (Fig. 19), Desacetilcinobufagina (Fig. 21) e Bufalina (Fig. 23), respectivamente.

A grande afinidade da molécula de bufadienolídeos por seus alvos, pode ser devida às interações de seu anel esteroidal e do anel lactônico, ligado ao C-17, ao sítio receptor na enzima Na^+K^+ -ATPase. Para se obter uma atividade máxima dos bufadienolídeos, a orientação dos anéis A/B/C/D que compoem o núcleo esteroidal devem aparecer na forma *cis/trans/cis*. A atividade, quando A e B aparecem em configuração *trans*, tende a enfraquecer e diminuir cerca de dez vezes a ação da molécula. (SIMÕES et al. 1999).

Após o conhecimento da estrutura molecular, dados preliminares de mecanismos de ação podem ser discutidos com maior segurança, visto que a estrutura molecular está diretamente relacionada com as interações aos sítios ativos.

5.4. ATIVIDADE DAS FRAÇÕES RS3, RS4 E RS5 SOBRE A ENZIMA Na^+K^+ -ATPase E SISTEMA NERVOSO

Os resultados obtidos demonstraram ações de inibição da enzima Na^+K^+ -ATPase e supressão de crises tônico-clônicas generalizadas induzidas por PTZ e NMDA. Foi também observada atividade excitatória do Sistema Nervoso Central, pois algumas amostras causaram uma diminuição do tempo de latência para crises tônico-clônicas, de maneira dependente de dose.

A subfração Rs3, que provavelmente corresponde à Telocinobufagina, demonstrou alta efetividade na inibição da enzima Na^+K^+ -ATPase, mostrando um $\text{IC}_{50\%}$ (Fig. 16) muito menor que o da AMOSTRA A. A estrutura molecular da

Telocinobufagina mostra uma hidroxila em C-14 β , que deve ser relevante para sua alta afinidade para alvos como a enzima Na⁺K⁺-ATPase.

A fração Rs4, que possui dois componentes majoritários e que um deles é, provavelmente a Desacetilcinobufagina, demonstrou dados contraditórios, visto que, em baixas concentrações produziu uma ação inibitória fraca da enzima Na⁺K⁺-ATPase, não dependente de concentração. Porém, ao se aumentar a dose para 20 μ g, produziu uma forte inibição atividade enzimática, mas que não manteve a proporção quando a dose foi aumentada para 50 μ g (Fig. 16). Dois fatores são de extrema importância para análise e discussão desses resultados. Primeiramente a espectrometria de massas mostrou uma outra molécula presente em alta proporção na Rs4, tornando esta fração impura. A análise da massa molecular dessa outra substância não revelou identidade com nenhum outro bufadienolídeo já descrito. Este componente adicional da amostra pode apresentar ação diferente, ou mesmo antagônica a dos bufadienolídeos. Outro dado a ser considerado para explicar a ação desta fração sobre a atividade da Na⁺K⁺-ATPase é a ausência da hidroxila posicionada em C-14 β na molécula de Desacetilcinobufagina, que apesar de não ser essencial à atividade inibitória, pode alterar ou diminuir a afinidade da mesma pela enzima.

Por fim a fração Rs5, com massa molecular idêntica à da Bufalina, demonstrou um grande potencial farmacêutico, ao apresentar ações inibitórias sobre a enzima Na⁺,K⁺-ATPase e protetora no Sistema Nervoso Central.

Para ação inibitória da enzima Na⁺K⁺-ATPase, esta fração apresentou um IC_{50%} semelhante ao da AMOSTRA A, mas ao se comparar à Telocinobufagina é duas vezes menos ativa (Fig. 16). Relacionando as estruturas moleculares, percebe-se uma hidroxila a menos na Bufalina, fato que pode determinar a menor ação dessa molécula.

Em se tratando de sistema nervoso central, a AMOSTRA A demonstrou previamente uma ação neuroprotetora quando injetada por via i.c.v. em baixas concentrações, inibindo crises convulsivas induzidas por PTZ e NMDA (Fig. 29 e 30). Todavia, ao aumentar a dose da amostra, percebeu-se uma redução da porcentagem de animais protegidos e, ainda, uma diminuição no tempo de latência para início das crises (Fig. 31 e 32). Com este resultado percebeu-se que as diferentes toxinas presentes na AMOSTRA A diferem entre si, em relação ao efeito induzido no sistema nervoso central (SNC). Algumas apresentando efeitos

depressores e outros efeitos excitatórios do SNC. Dependendo da concentração da amostra, um ou outro efeito torna-se preponderante.

Ao se realizar os mesmos ensaios com as frações isoladas, atribuiu-se a ação protetora (efeito depressor) à Bufalina, a qual em baixas concentrações apresentou um índice de proteção muito relevante contra crises induzidas por PTZ e NMDA (Fig. 37 e Fig. 39). Mesmo em doses que não suprimiam crises tônico-clônicas, foi capaz de aumentar o tempo de latência para início das mesmas (Figs. 38 e 40).

Já as frações Rs3 e Rs4 apresentaram atividades proconvulsivantes, visto que diminuem o período de latência para início das crises induzidas por PTZ e NMDA (Figs. 33, 34, 35 e 36).

O termo epilepsia designa qualquer tipo de doença caracterizada pela ocorrência de crises espontâneas e recorrentes, causadas por descargas paroxismais dos neurônios cerebrais, afetando cerca de 50 milhões de pessoas no mundo (TIERNEY et al., 1996; LÖSCHER, 1998). Acredita-se que disfunções no balanço químico de neurotransmissores podem ser a principal causa tanto do desenvolvimento quanto da manutenção de atividade elétrica epileptiforme.

Tendo em vista que a AMOSTRA A aumenta a recaptação do aminoácido excitatório L-Glutamato em sinaptossomas cérebro-corticais de ratos Wistar (Fig. 28), pode-se relacionar esta ação ao efeito neuroprotetor observado nos ensaios de crise epilética.

O glutamato presente em excesso na fenda sináptica resulta em uma superestimulação dos seus receptores, que eleva o influxo de Ca^{2+} , 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 e SCHOUSBOE, 1997; DANBOLT, 2001), uma vez que excesso de glutamato na fenda sináptica resulta, quase sempre, em morte neuronal (LENT, 2004).

Observando a ação clássica dos bufadienolídeos na inibição da enzima Na^+K^+ -ATPase e considerando que as mesmas são essenciais para a funcionalidade das células do sistema nervoso central, as quais estão em constante processo de

despolarização e repolarização, é certo que estas toxinas terão ações importantes sobre este sistema.

A inibição da Na^+K^+ -ATPase da porção cérebro-cortical pelos cardenolídeos de estrutura semelhante à digoxina, oleandrina e seus derivados, como, por exemplo, a oleadrogenina, confirmam sua ação tóxica no sistema nervoso central (VERSIC, et al. 2008).

A concentração extracelular de glutamato é controlada por uma família de proteínas carreadoras sódio-dependentes, os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), que são divididos em 5 subtipos estruturalmente distintos (EAATs 1-5). Tais transportadores são denominados transportadores de alta afinidade e são dirigidos por um gradiente de sódio e potássio. (DONBOLT, 2001) A captação realizada por esses transportadores é o principal mecanismo de finalização da neurotransmissão excitatória (MOUSSA et al., 2007).

Outro mecanismo de captação do glutamato, realizado por transportadores de baixa afinidade, também pode ser observado, porém ainda é pouco estudado. Diferentemente dos de alta afinidade, esse tipo de transporte é independente de sódio (DONBOLT, 2001).

Observou-se que venenos animais não apresentam apenas um componente ou apenas uma via de atuação. Eles são capaz de interagir com enzimas, proteínas ou qualquer outro alvo existente no organismo. Assim, foram realizados outros ensaios, selecionados com base nos efeitos observados em intoxicações com sapos e que poderiam ajudar no esclarecimento dos mecanismos de ação das toxinas do veneno. Este conhecimento pode ser relevante para melhorar a terapia do envenenamento.

O veneno de *Rhinella schneideri* pode ser considerado uma fonte promissora de novas toxinas com ação sobre o sistema nervoso, pois além de anticonvulsivante, demonstrou uma forte ação inibitória da junção neuromuscular.

Conforme dados não publicados pelo grupo de pesquisa da Dra. Léa Rodrigues Simione, do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, estudos com uma mistura de compostos de baixa massa molecular do veneno de *Rhinella schneideri* causaram inibição irreversível na junção neuromuscular.

Os resultados obtidos neste trabalho com as toxinas isoladas indicam que as toxinas responsáveis por esses efeitos são as frações Rs3 e Rs5, as quais demonstraram alto índice de inibição em baixas concentrações (Fig. 25, 26 e 27).

No mesmo experimento pode ser observado que o efeito induzido pela adição de acetilcolina não foi alterado na presença das toxinas, indicando uma inibição pré-sináptica. O efeito induzido pela adição de KCl também não foi alterado, demonstrando que as preparações mantiveram a capacidade contrátil quando submetidas a estímulos pós sináptico. Após a lavagem, a preparação foi novamente submetida a estímulos elétricos e percebeu-se a ausência de contrações musculares, sugerindo que a inibição, além de total, é irreversível.

As frações Rs3 e Rs5 induziram efeito bloqueador neuromuscular irreversível em concentrações de 10 µg/mL, atuando em sítios pré-sinápticos. Várias hipóteses podem ser sugeridas para explicar esta ação das toxinas na junção neuromuscular. Uma delas é o possível bloqueio pré-sináptico de canais para Na^+ ou Ca^{2+} , impedindo a despolarização do terminal sináptico e, conseqüentemente, a liberação de neurotransmissores. No entanto, considerando que estas toxinas são capazes de inibir a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$, é provável que seus efeitos na junção neuromuscular estejam relacionados com redução da capacidade de repolarização do terminal sináptico.

Os ensaios realizados com as toxinas Rs3 e Rs5, que evidenciam a inibição da junção neuromuscular, mostram também que a amplitude das contrações musculares aumentou em um primeiro instante. Este efeito também pode ser explicado pelo bloqueio da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$, pois os cardenolídeos aumentam o potencial ionotrópico da musculatura. O aumento da força contrátil da musculatura se deve à maior despolarização da membrana causada pela inibição do processo de repolarização, em consequência do bloqueio da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$. Outro fator a ser analisado é a ação irreversível das frações na junção neuromuscular, que leva a uma inibição total da contração da musculatura. Fato relacionado à ausência de um mecanismo repolarizador. Em um primeiro momento a despolarização leva ao aumento da contração, mas a ineficiência na repolarização da membrana, torna a célula incapaz de uma nova contração, que caracteriza o bloqueio neuromuscular observado.

Outro ponto importante para a análise deste efeito é a relação entre estrutura e atividade da fração Rs4, da qual um dos componentes majoritários foi identificado

como a desacetilcinobufagina. Como esta molécula não apresenta uma hidroxila em C-14 β e sim um grupamento epóxi, fica reduzida ou inviabilizada a sua ação inibidora sobre a Na⁺K⁺-ATPase, característica de bufadienolideos e cardenolideos. Como esta fração também foi ensaiada na preparação da junção neuromuscular e não apresentou nenhum efeito, pode-se inferir que o mecanismo do bloqueio neuromuscular, apresentado pelas toxinas Rs3 e Rs5, está realmente relacionado a inibição da enzima Na⁺K⁺-ATPase.

A Na⁺K⁺-ATPase é uma proteína abundante em células do sistema nervoso central e a avaliação de sua atividade pode ajudar na elucidação de atividades neurotóxicas (VASIC et al. 2008).

Este trabalho avaliou também a ação da AMOSTRA A na recaptação do glutamato, visto que este neurotransmissor está relacionado com inúmeras neuropatologias. Sendo assim, é de considerável interesse a identificação de agentes bloqueadores de receptores glutamatérgicos, particularmente o de NMDA, devido a seu efeito anticonvulsivante e possível proteção contra isquemia cerebral (ELDEFRAWI et al., 1988).

Estudos com toxinas isoladas de diferentes venenos animais têm mostrado que os mesmos são ricos em componentes que, por diferentes mecanismos, interferem com a liberação e recapção de neurotransmissores. Neurotoxinas escorpiônicas, por aumentarem a permeabilidade da membrana ao sódio, são capazes de induzir ou inibir a liberação e a captação de neurotransmissores de diferentes preparações (NICOLATO *et al.*, 2002). Alguns trabalhos demonstraram que a toxina TsTX, classificada como α -toxina, evoca a liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de cérebros de ratos (FLETCHER et al., 1996).

A ação das toxinas isoladas no sistema nervoso central foi avaliada por experimentos realizados com a indução de crises convulsivas por PTZ e NMDA. O PTZ atua como um estimulador do cérebro através da inibição da função do GABA, o maior neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC). O bloqueio do receptor de GABA_A ocorre no sítio da picrotoxina, conseqüentemente propagando e mantendo a atividade convulsiva (MORTAZAVI et al., 2005).

Os resultados deste estudo demonstraram que a fração Rs5 nas maiores concentrações apresentou efeito anticonvulsivante nos animais submetidos à crise induzida por injeção i.p de PTZ. Também se observou que as menores concentrações da Rs5 apresentaram um efeito interessante na latência de crise com

o antagonista gabaérgico – há um retardo no início das crises tônico-clônicas quando é microinjetada a Rs5.

Com relação ao grupo diazepam observou-se uma proteção de 100% dos animais nesse modelo convulsivante. Isso está de acordo com dados da literatura uma vez que os compostos como os Benzodiazepínicos que suprimem crises induzidas por PTZ aumentam a mediação de receptores gabaérgicos (HOLMES, 2007).

Os resultados foram ainda mais interessantes com relação às crises induzidas pela microinjeção de NMDA. Foi demonstrado que a Rs5 possui uma eficácia em proteger os animais de crise tônico-clônica.

Ao analisar eventuais efeitos colaterais causados pelo tratamento de Rs5 observa-se que não houve alterações nos modelos neuroetológicos, e comparado a outros estudos com AEDs demonstrou-se que a Rs5 possui grande potencialidade terapêutica. No teste de *rotarod* com a maior dose de Rs5 e com uma dose três vezes maior não foi observada ataxia nos animais.

Já no teste de *openfield* foi observado que com o tratamento com a Rs5, os animais exibem comportamentos similares aos animais injetados apenas com salina, não havendo grandes alterações na exploração ou em outras atividades.

Foram também calculadas as frequências de queda no *Rotarod* (barra giratória) após o pré-tratamento com a fração Rs5 nas concentrações de 2 µg/µL e 6 µg/µL. Nenhum animal caiu do aparato com os pré-tratamentos, indicando que estas concentrações não causaram comprometimento locomotor. Esse resultado é interessante uma vez que a dose efetiva (2 µg/µL) assim como uma dose três vezes maior que a efetiva (6 µg/µL) não provocam ataxia nos animais.

Esses resultados sugerem fortemente que a Rs5 possui um potencial anticonvulsivante, podendo vir a ser uma interessante ferramenta no estudo e prospecção de novas drogas anticonvulsivantes.

Neste trabalho foram isoladas as toxinas Rs3 e Rs5 com ação bloqueadora da enzima Na⁺K⁺ATPase, que foram também capazes de bloquear a junção neuromuscular. Adicionalmente, a Rs5 mostrou uma ação anticonvulsivante muito importante e com elevado potencial para o desenvolvimento de novas drogas, visto não causar comprometimento locomotor. Estes resultados são inéditos e abrem perspectivas para o desenvolvimento de novas pesquisas, visando a caracterização do mecanismo neuroprotetor da Rs5.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Fração contendo componentes de baixa massa molecular do veneno de *Rhinella schneideri* (AMOSTRA A):

- Induz efeitos inibitórios irreversíveis sobre a enzima Na^+K^+ -ATPase isolada ou inserida na membrana, em ensaios *in vitro*.
- Aumenta o tempo de latência em crises convulsivas induzidas por PTZ e NMDA.
- Em baixas concentrações aumenta a recaptação do aminoácido L-glutamato em preparações sinaptosomais.

Compostos isolados do veneno de *Rhinella schneideri*:

- Dados de espectroscopia de massa indicam que Rs3 e Rs5 correspondem às moléculas de Telocinobufagina e Bufalina, respectivamente. Indicam também que a fração Rs4 contém a Desacetilcinobufagina.
- Verificou-se que as frações Rs3, Rs4 e Rs5 são responsáveis pelos efeitos inibitórios da enzima Na^+K^+ -ATPase, observados para a AMOSTRA A.
- Rs3 é mais efetiva que as demais frações na inibição da enzima Na^+K^+ -ATPase.
- Rs3 e Rs5 induziram bloqueio neuromuscular irreversível em baixas concentrações, sobre a resposta a estímulos elétricos indiretos em preparação biventer cervics de pintainho (*in vitro*). A administração de acetilcolina ao banho, após a adição das toxinas, não teve seu efeito contrátil alterado, sugerindo que o bloqueio neuromuscular induzido pelas mesmas é pré-sináptico.
- Rs5 se mostrou mais eficaz que as demais na proteção contra crises convulsivas induzidas por PTZ e NMDA e não causou comprometimento locomotor nos animais.
- Rs5 inibiu crises convulsivas ao ser adicionada em associação com dose não protetora de carbamazepina, mostrando ação sinérgica com este anticonvulsivante.

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.; GARRAFFO, H.M. Alkaloids from Amphibian Skin: A Tabulation of Over Eight-Hundred Compounds. **J. Nat. Prod.**, v.68, 1556-1575, 2005.

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 Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, 362(6):453-79, 2000.

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

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

FROST; DARREL, R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 (8 April, 2010). **Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History>**, New York, USA. 2010.

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

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.; LYMAN GROVER, 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.; 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.

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

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.

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.

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

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.

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.

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

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

LAMBERTON, J.A.; MORTON, T.C. **Aust. J. Chem.**, 38, 1025, 1985.

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

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

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.

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

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.

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.

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.

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

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.

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

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

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.

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.

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)

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.

SBH. 2010. Brazilian amphibians – List of species. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Captured on 08 de julho de 2010.

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.

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.

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

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.

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

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.

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.

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.

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

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.

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.

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

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.

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.

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, 2006.

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.

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.