

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

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

Mateus Amaral Baldo

Ribeirão Preto  
2015

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

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

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Mateus Amaral Baldo

Orientador: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes

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

Ribeirão Preto

2015

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

Baldo, Mateus Amaral.

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

130 p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Arantes, Eliane Candiani.

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

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Mateus Amaral Baldo

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

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

Área de Concentração: Toxicologia  
Orientadora: Eliane Candiani Arantes

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_



## RESUMO

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

Toxinas animais sempre foram estudadas ao longo dos tempos por apresentarem um arsenal químico de moléculas com diversas funções biológicas. Estudos podem conduzir essas moléculas para serem aplicadas na geração de agentes terapêuticos e/ou de ferramentas experimentais para a pesquisa básica e aplicada, justificando sua purificação e análise funcional. Considerando que estudos de venenos de sapos são relevantes, por serem estes considerados uma boa fonte de toxinas que atuam sobre diferentes sistemas biológicos, os objetivos deste trabalho foram identificar a fração Rs5 do veneno de *Rhinella schneideri* e caracterizar suas ações farmacológicas e/ou toxicológicas no sistema nervoso central. O veneno de *Rhinella schneideri* foi inicialmente submetido à diálise o que resultou na fração de baixa massa molecular, que foi liofilizada e submetida a uma cromatografia de fase reversa em sistema CLAE em coluna C18. Das 5 frações majoritárias obtidas nesta cromatografia apenas a Rs5 foi utilizada para caracterização de neuroproteção devido aos resultados prévios do grupo. A Rs5 (2 e 4 µg) se mostrou eficiente em proteger células neuronais quando submetidas à crises induzidas por pilocarpina. As frações Rs3, Rs4 e Rs5 e também a bufalina adquirida comercialmente (BAC) foram utilizadas para ensaios em transportadores de neurotransmissores dopamina (Rs5-IC<sub>50</sub>: 0,063 ± 0,014 µM), serotonina (Rs5-IC<sub>50</sub>: 0,090 ± 0,065 µM), norepinefrina (Rs5-IC<sub>50</sub>: 0,079 ± 0,097 µM), glutamato, GABA (Rs5-IC<sub>50</sub>: 0,010 ± 0,010 µM) e glicina (Rs5-IC<sub>50</sub>: 0,021 ± 0,015 µM), nos quais demonstraram ações inibitórias ou estimulantes na recaptação. A fração Rs3 foi submetida a ensaios de inibição de crises convulsivas induzidas por PTZ e se mostrou parcialmente eficaz, porém em todos os animais houve aumento do tempo de latência para o desenvolvimento de crises. Na tentativa de se caracterizar um alvo para neuroproteção, ensaios com mitocôndrias isoladas foram realizados. Os resultados mostraram que não ocorre interferência na função mitocondrial em

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

## ABSTRACT

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

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



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



# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

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

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

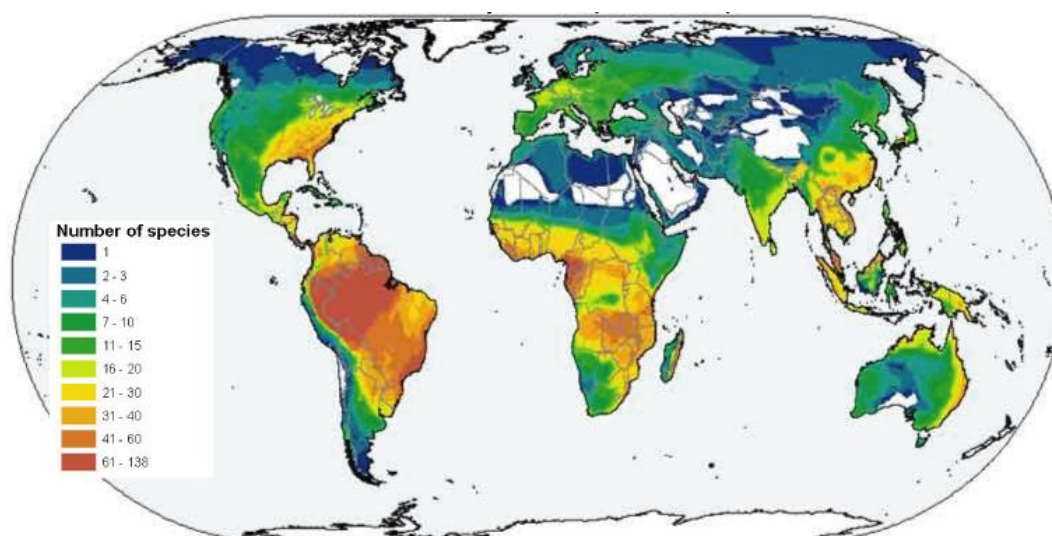
Grande parte do conhecimento sobre o arsenal químico encontrado na natureza advém do convívio com povos primitivos e indígenas, que sempre fizeram uso de substâncias tóxicas e farmacologicamente ativas, tanto para fins bélicos como medicamentosos. Este conhecimento etnofarmacológico trouxe grandes contribuições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

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

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

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

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



Source: Global Amphibian Assessment

**Figura 1.** Distribuição global das espécies de anfíbios.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

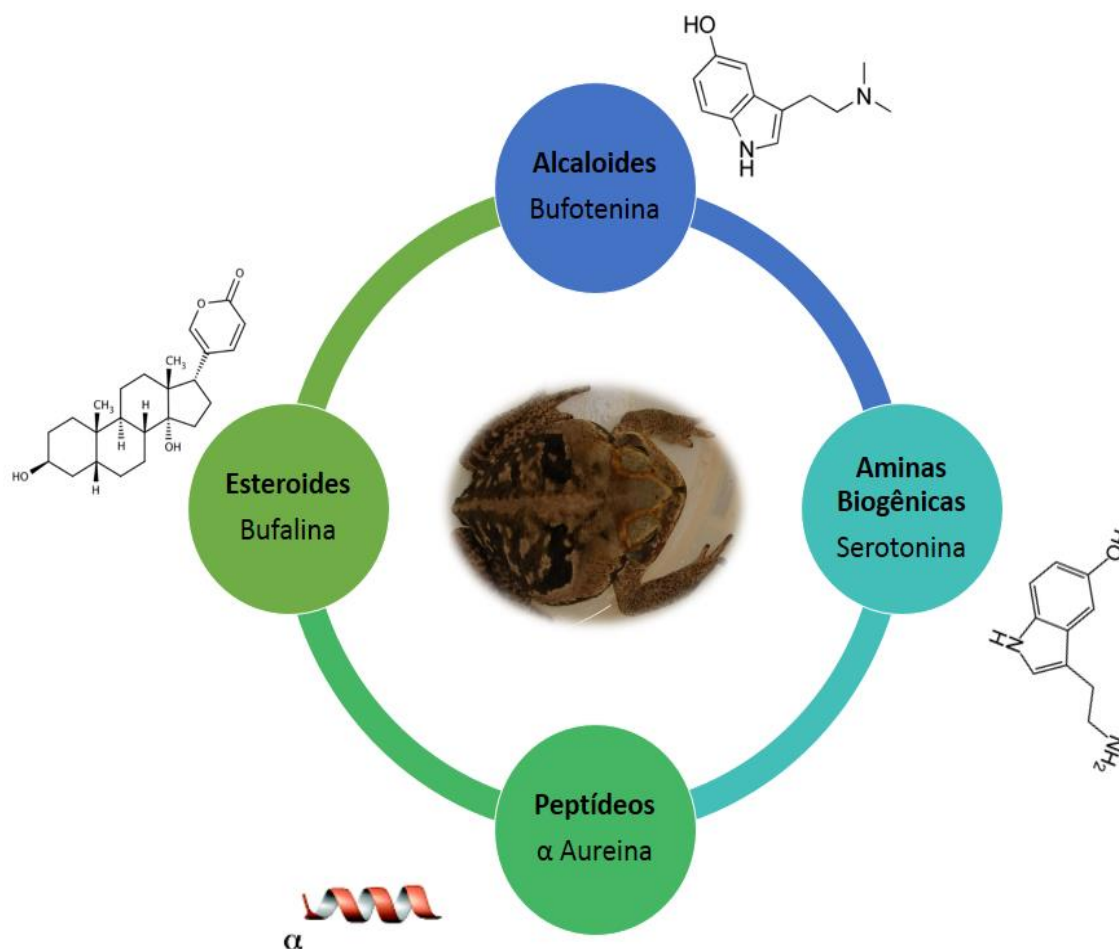
Bufadienólídeos e outras moléculas que apresentam estruturas derivadas ou muito semelhantes aos mesmos foram objetos de bioensaios, os quais demonstraram efeitos biológicos importantes, que estão relacionados à estrutura da molécula. Dentre esses ensaios estão os que avaliaram suas atividades antivirais (CUNHA-FILHO et al., 2010). Ensaios elaborados utilizando moléculas com



estruturas semelhantes aos bufadienólídeos, de origem vegetal, animal ou quimicamente modificadas, mostraram uma atividade muito relevante em células cancerígenas incluindo as de leucemia humana HL-60 e HCT-8 (NOGAWA et al., 2001; YE et al., 2005b; WU et al., 2006). As atividades anticancerígenas são amplamente estudadas devido ao relevante efeito que essa classe de moléculas produz em baixas concentrações, sendo observada a indução de apoptose em células tumorais (QI et al., 2011; FORNARI-BALDO et al., 2012).

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

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



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

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

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

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

Referência: Steyn e Heerden, 1998.

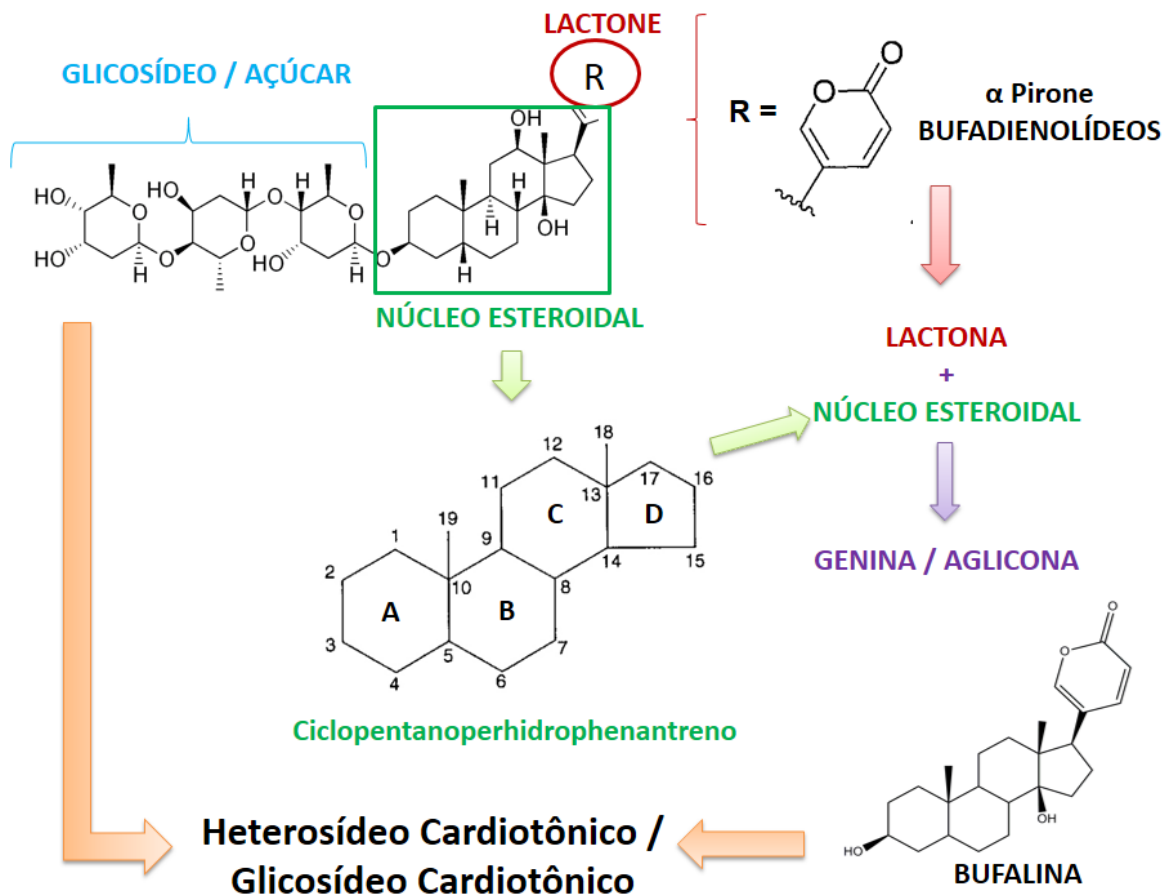
Uma das características do veneno de sapo é a sua resistência aos agentes físico-químicos mais enérgicos, que o difere de outros venenos de origem animal, tais como o das serpentes, escorpiões e aranhas, que são facilmente destruídos ou alterados por agentes externos. Este veneno resiste à luz, ao calor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

facilmente dependendo do solvente, principalmente em meio básico (LAMBERTON et al., 1985).

As soluções concentradas ou diluídas do veneno podem ser esterilizadas a 120°C em autoclave sem que sofram a mínima diminuição de atividade. O veneno em óleo de oliva resiste, sem modificação de atividade, à temperatura de ebulição de 160°C. Sob a influência da luz, as soluções aquosas escurecem lentamente, tomando uma coloração pardacenta, sem que, entretanto, haja modificação das suas propriedades tóxicas. A glicerina e a formalina não exercem influência alguma sobre a sua toxicidade (BRAZIL; VELLARD, 1926).

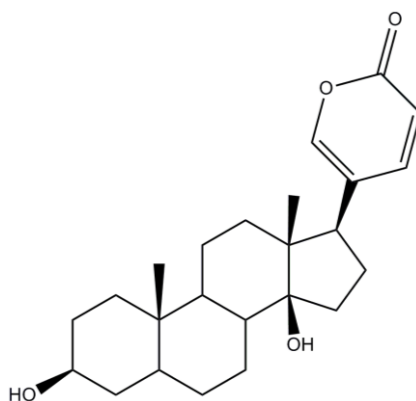
### 1.1. Estrutura das toxinas

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



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

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



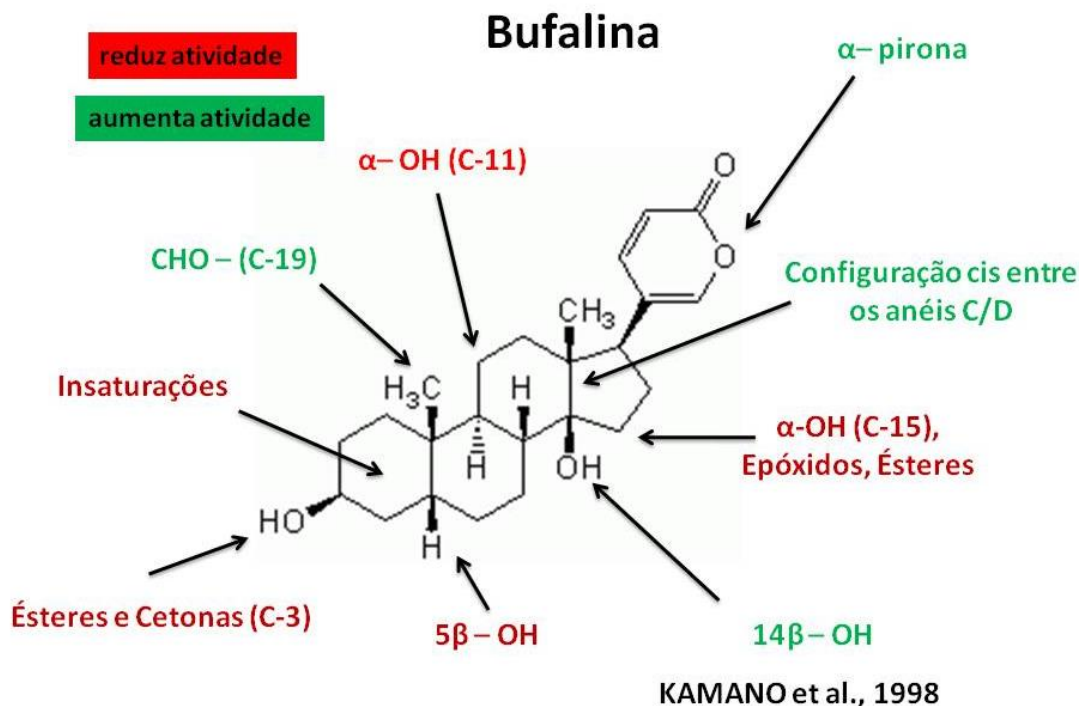
**Figura 5.** Molécula de bufalina

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

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

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

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



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

## 1.2. Envenenamento e ação de toxinas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Os glicosídeos cardíacos, especialmente a ouabaína, são considerados drogas inibidoras específicas da atividade Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPásica. Por este motivo, a técnica clássica de dosagem Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPásica utiliza a diferença entre a dosagem da atividade ATPásica total e da fração inibida pela ouabaína (IBRAHIM, 1997).

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

### **1.3. Epilepsia e Ansiedade**

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# *Conclusões*



## 5. CONCLUSÕES

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

# *Referências*

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SIBAROV, D. A. et al. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup> exchanger to prevent Ca<sup>2+</sup> overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 343, n. 3, p. 596-607, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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