

**SANDRO ROSTELATO FERREIRA**

**EFEITOS DO VENENO DE *Rhinella schneideri* SOBRE A  
JUNÇÃO NEUROMUSCULAR**

**ORIENTAÇÃO: PROFA. DRA. LÉA RODRIGUES SIMIONI**

**CAMPINAS**

**2012**



**UNICAMP**

---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Ciências Médicas**

**EFEITOS DO VENENO DE *Rhinella schneideri* SOBRE A**  
**JUNÇÃO NEUROMUSCULAR**

**SANDRO ROSTELATO FERREIRA**

*Tese de doutorado apresentada à Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Sob orientação da Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni*

**CAMPINAS**

**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

F413e      Ferreira, Sandro Rostelato, 1982-  
              Efeitos do veneno de *Rhinella schneideri* sobre a  
              junção neuromuscular / Sandro Rostelato Ferreira --  
              Campinas, SP : [s.n.], 2012.

              Orientador : Léa Rodrigues Simioni  
              Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
              Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

              1. Junção Neuromuscular. 2. Eletrofisiologia. 3.  
              Microscopia Eletrônica de Transmissão. I. Simioni, Léa  
              Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas.  
              Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Effects of *Rhinella schneideri* poison on neuromuscular junction

**Palavras-chave em inglês:**

Neuromuscular Junction

Electrophysiology

Transmission Electron Microscopy

**Titulação:** Doutor em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Léa Rodrigues Simioni [Orientador]

Yoko Oshima Franco

José Carlos Cogo

Angélica de Fátima de Assunção Braga

Sérgio Marangoni

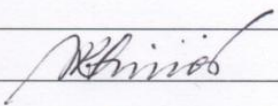
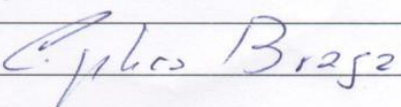
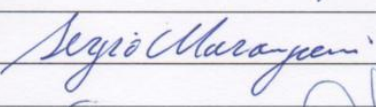
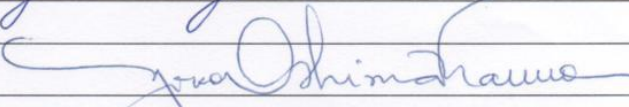

**Data da defesa:** 15-02-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

## Banca Examinadora de Tese de Doutorado

SANDRO ROSTELATO FERREIRA

Orientadora: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:	
Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni	
Profa. Dra. Angelica de Fatima de Assuncao Braga	
Prof. Dr. Sergio Marangoni	
Profa. Dra. Yoko Oshima Franco	
Prof. Dr. José Carlos Cogo	

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/02/2012

## Dedico...

---

### **A Deus**

Pela vida e capacidade de buscar os meus sonhos.

### **Meus pais, Osmar e Nair**

Eterna gratidão pelo privilégio de tê-los como meus pais. Pelo desejo que fôssemos onde nunca puderam ir, pela oportunidade e apoio em todas as fases da minha vida. Amo vocês.

### **Meu irmão Samuel**

Pelo apoio e carinho desde sempre.

### ***Aos professores***

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni, não há palavras para expressar tamanha gratidão por tudo o que tem me feito e proporcionado. Não somente pela oportunidade de concluir o meu doutoramento, mas também pelos ensinamentos de vida, por cada dia vivido no laboratório que sempre me trouxeram um grande aprendizado e por ter me apoiado e batalhado para que a conquista do meu doutorado sanduíche no exterior fosse concretizada. Serei eternamente grato!

Profa. Dra. Yoko Oshima Franco, minha eterna orientadora e amiga, que devo minha gratidão por ter me mostrado os primeiros passos da vida acadêmica, e através disso, posso afirmar que fui 'envenenado' pela ciência. Muito obrigado, de coração!

Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo, amigo e colaborador, que me apresentou uma nova ferramenta de trabalho e pudemos obter resultados de grande interesse, e também pelos bons conselhos a mim dispensados.

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling, pela amizade e valiosa contribuição em todas as etapas desse projeto que envolveram histologia e microscopia eletrônica; também pelas risadas e companhia nos congressos nacionais e internacionais.

Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela enorme contribuição em nossos trabalhos, que com certeza, tiveram o seu valor aumentado após a sua participação. Tenho muita admiração pela sua dedicação e amor à ciência.

Profa. Dra. Charlotte Ledbetter Ownby, grande amiga e orientadora, que me recebeu como uma mãe no período em que estive em Stillwater, me dando a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e aprender a manusear o microscópio eletrônico de transmissão, e também pelos bons momentos descontraídos que tive ao seu lado. Um período de muito aprendizado e amizade que ficará para sempre em minha mente e coração. Thank you very much indeed!

Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado, difícil explicar tamanha admiração por tanta inteligência em uma única pessoa. Muito obrigado por tudo o que aprendi ao seu lado.

Profa. Dra. Angélica de Fátima Assunção Braga, sempre alegre e disposta a compartilhar seus conhecimentos e até mesmo uma boa conversa.

Prof. Dr. Edson Antunes, pela atenção e excelente coordenação do curso. Pude aprender muito ao seu lado, durante o período como representante discente. Obrigado pela oportunidade!

Profa. Dra. Albetiza Lobo de Araújo, quanta alegria em uma única pessoa, e quanto ensinamento de vida. Profa Albetiza é sinônimo de ‘alto astral’ para o departamento.

Profa. Dra. Elen Cristina Teizem Landucci, uma excelente companhia e amizade no departamento e nos congressos.

## ***Aos amigos***

Eterno amigo Gildo, por tamanha sabedoria e paciência para nos ensinar todos os dias. Não apenas nos experimentos, mas também nos ensinamentos de vida. Muito obrigado por tudo, amigo!

Priscila Randazzo, a Prica, que sempre está alegre e disposta para trabalhar, nem que seja apenas para uma saudável conversa, até porque ela sempre cobra por atenção quando está no laboratório. Admiro muito a tua dedicação, amizade e vontade de vencer na vida.

Valdemir, sempre disposto a dispensar um bom conselho de amigo, e às vezes até mesmo de pai. Por torcer e apoiar para que toda essa etapa fosse concluída. Muito obrigado!

Saraguaci, eterna Sarinha, quanta alegria dispensada aos amigos e pela torcida de nos ver bem e realizado.

Mário Oshima, eterno amigo corintiano, quanto pude aprender com a tua companhia, aprendizado este que vai desde o surfista até o excelente profissional. Te admiro muito. Valeu Mário!

Delkia, amiga que chegou para ficar. Difícil expressar tamanha importância que representa para mim. Muito obrigado pela amizade e confiança.

Thalita, a eterna Thalitex, que sempre está alegre e disposta para trabalhar, passear e contagiar os amigos. Quanta admiração por essa guria.

Lourdes, excelente profissional, mãe, avó e acima de tudo, minha amiga. Tenho uma admiração enorme por ti. Obrigado por tudo!

Thomaz, grande amigo e colaborador, que sempre está animado para uma boa conversa e também para o trabalho. Te admiro muito, cara.



Rafael Stuani, amigo que chegou e conquistou a todos; que excelente profissional. Obrigado pela boa convivência e amizade.

Rita Collaço, a Ritita, sempre alegre e disposta para o trabalho. Te admiro, guria.

Lineu Baldissera Jr, pela amizade, convivência e confiança que se formou e estabeleceu nesse período, que com certeza, durará para sempre. Que Deus te abençoe sempre!

Lorenzo Pissinatti, pela boa amizade e companheirismo em todo esse período. É bom tê-lo como amigo!

Rafael Battaglini, pela amizade e apoio em tudo. Que amigo! Grazie, fratellino!

Aos amigos que tem uma importância enorme na minha vida, e que eu tenho o privilégio de chamá-los de Meus Amigos: Fábio Leandro Rossi, Natália Biagi, Vinícius Wolf, Junko Tsukamoto, Maria Isabel Faria, Flávio Buratti e Renata Leandro. Agradeço a Deus pela existência de vocês.

Aos demais amigos, antigos e mais recentes, Dimas, Thiago, Mariana Cintra, Karina Fontana, Catarina, Marta Leonardo, prof Stephen Chaw, Aracélio Colares, André Rennó, Mariana Pitocco, Delano, Adriana, Raquel, Rafael Sutti, Igor, Mari B, Kiara, Sueli, Rafael Neves, Norma, Fabiana, Alessandra Stroka e Leandro (seja bem vindo), pela amizade, pelas boas risadas e cafezinhos ao longo desse período.

Aos amigos de Stillwater, Romulo Lollato, Andres Patrignani, Rosymar Coutinho, Gabriela Berto, Fernando Segato, Giulia, Mariela, Alexandre, Zeina,

Virgínia e Skyler, espero não ter me esquecido de ninguém, pois vocês fizeram meus dias bem melhores em Stillwater.

Aos funcionários sr. Miguel, José Ilton, Adilson, Aguinaldo, Toninho, Denise, Alessandra, Fran, Elaine, Rosana e Karine, pela ajuda e prestação de serviços.

Terry Colberg e Lisa Whitworth, pelo apoio técnico para microscopia eletrônica, pelos vários hambúrgueres juntos e pela boa companhia nos dias frios de Stillwater.

À Unicamp e à Oklahoma State University (OSU) pela oportunidade de desenvolvimento científico e pessoal.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e doutorado sanduíche, FAPESP e FAEPEX/Unicamp pelo auxílio financeiro fornecido ao laboratório.

*“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”*

*Galileu Galilei*

## Sumário

	<i>Pág.</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	23
1.1. Animais venenosos	24
1.2. Envenenamento causado por sapos	26
1.3. A espécie <i>Rhinella schneideri</i>	29
<b>2. OBJETIVOS</b>	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	34
3.1. Animais	35
3.2. Material	35
3.3. Extração metanólica	35
3.4. Preparação biventer cervicis de pintainho	36
3.5. Preparação nervo frênico diafragma de camundongo	36
3.6. Protocolos farmacológicos	37
3.7. Estudo eletrofisiológico	38
3.7.1. Registro do potencial de membrana em repouso	39
3.7.2. Potencial de placa terminal em miniatura (PPTM)	39
3.7.3. Registro do potencial de placa terminal	40
3.7.3.1. Técnica cut muscle	40
3.7.4. Medida do conteúdo quântico	40
3.8. Estudo bioquímico	41
3.8.1. Dosagem de creatinoquinase	41
3.9. Análise morfológica	42

3.10. Microscopia eletrônica de transmissão.....	42
3.11. Fracionamento do veneno.....	43
3.11.1. Preparo do veneno.....	43
3.11.2. Cromatografia em HPLC de coluna fase reversa.....	44
3.11.3. Espectrometria de massa MALDI-TOF.....	44
3.12. Análise estatística.....	44
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.1. Estudo miográfico - Preparação biventer cervicis de pintainho.....	46
4.2. Estudo das respostas contraturantes à ACh e KCl.....	48
4.3. Estudo farmacológico do extrato metanólico do veneno de <i>R. schneideri</i> sobre preparações neuromusculares de ave.....	49
4.4. Baixa temperatura.....	51
4.5. Estudo morfológico.....	52
4.5.1. Microscopia óptica.....	52
4.6. Medida da atividade creatinoquinase.....	52
4.7. Estudo miográfico - Preparação nervo frênico diafragma de camundongo.....	53
4.8. Resposta da preparação nervo frênico diafragma de camundongo ao estímulo tetanizante.....	54
4.9. Estudo eletrofisiológico.....	55
4.9.1. Potencial de membrana em repouso.....	55
4.9.2. Potencial de placa terminal em miniatura (PPTM).....	56
4.9.3. Conteúdo quântico.....	58

4.10. Microscopia eletrônica de transmissão.....	59
4.11. Estudo bioquímico.....	62
4.11.1. Purificação do extrato metanólico do veneno de <i>Rhinella</i> <i>schneideri</i> .....	62
4.11.2. Atividade neuromuscular das frações ativas.....	63
4.11.3. Espectrometria de massa das frações 20 e 22.....	65
4.12. Atividade neuromuscular fração 20.....	66
4.12.1. Atividade neuromuscular da preparação de biventer cervicis de pintainho.....	66
4.12.2. Efeito da F20 sobre a medida do conteúdo quântico.....	67
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>88</b>

---

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1:</b> Medida do conteúdo quântico em preparações incubadas com o extrato metanólico (50 µg/mL).....	58
<b>Tabela 2:</b> Efeito do extrato metanólico (50 µg/mL) no terminal nervoso.....	61
<b>Tabela 3:</b> Efeito da fração 20 (15 µg/mL) sobre a medida do conteúdo quântico.....	68

	Pág.
<b>Figura 1:</b> Glândula parotóide.....	25
<b>Figura 2:</b> <i>Rhinella schneideri</i> .....	30
<b>Figura 3:</b> Resposta neuromuscular - Preparação BC de pintainho sob estimulação elétrica indireta.....	47
<b>Figura 4:</b> Representação gráfica do efeito do extrato do veneno de <i>R. schneideri</i> sobre a preparação BC de pintainho sob exposição exógena de ACh e KCl.....	48
<b>Figura 5:</b> Representação gráfica da resposta neuromuscular da preparação BC de pintainho sob estimulação elétrica indireta e submetida a vários tratamentos.....	49
<b>Figura 6:</b> Registro miográfico da preparação BC de pintainho sob estimulação elétrica indireta.....	50
<b>Figura 7:</b> Representação gráfica da resposta contrátil do músculo BC de pintainho sob estimulação elétrica indireta, tratado com o extrato metanólico a 22° C.....	51
<b>Figura 8:</b> Corte histológico de preparações BC incubada com solução de Krebs (A, controle) ou extrato metanólico (B, 10 µg/mL) .....	52
<b>Figura 9:</b> Medida da liberação de creatinoquinase em preparações BC incubadas com o extrato metanólico (10 µg/mL) .....	53
<b>Figura 10:</b> Representação gráfica e miografia representativa da preparação NFD de camundongo sob estimulação elétrica indireta.....	54
<b>Figura 11:</b> Efeitos do extrato metanólico do veneno de <i>R. schneideri</i> e neostigmina sobre preparações nervo frênico diafragma de camundongos sob estimulação tetanizante.....	55



<b>Figura 12:</b> Efeito do extrato metanólico sobre o potencial de membrana em repouso da preparação nervo frênico diafragma.....	56
<b>Figura 13:</b> Alterações na frequência e amplitude do potencial de placa terminal em miniautra (MEPPs) em preparações nervo frênico diafragma de camundongo incubadas com o extrato metanólico.....	57
<b>Figura 14:</b> Alterações no valor do conteúdo quântico (potencial de placa terminal) de preparações nervo frênico diafragma tratadas com extrato metanólico.....	59
<b>Figura 15:</b> Micrografia do botão sináptico da junção neuromuscular de diafragma de camundongo.....	60
<b>Figura 16:</b> Atividade do extrato metanólico após 60 min de incubação.....	61
<b>Figura 17:</b> Cromatografia de fase reversa para a separação das frações ativas do extrato metanólico do veneno de <i>Rhinella schneideri</i> .....	62
<b>Figura 18:</b> Registro miográfico de preparações biventer cervicis de pintainho estimuladas indiretamente.....	64
<b>Figura 19:</b> Determinação da massa das frações 20 (A) e 22 (B) por espectrometria de massa MALDI-TOF. ....	65
<b>Figura 20:</b> Resposta neuromuscular da preparação BC de pintainho sob estimulação elétrica indireta.....	67
<b>Figura 21:</b> Alterações no valor do conteúdo quântico (potencial de placa terminal) de preparações nervo frênico diafragma incubadas com a fração 20.....	68

## ***RESUMO***

---

*Rhinella schneideri*, conhecido previamente como *Bufo paracnemis*, é um sapo comum em muitas regiões do Brasil. O veneno destas espécies exerce importante efeito cardiovascular em humanos e animais, mas pouco se sabe sobre sua atividade neuromuscular. Neste trabalho, nós avaliamos a neurotoxicidade do veneno de *R. schneideri* em preparações neuromusculares de pintainho e camundongo. Através da compressão manual das glândulas parótidas localizadas atrás dos olhos, coletou-se a secreção e então realizada a extração com metanol. O extrato metanólico foi liofilizado e testado em preparações biológicas. Preparações biventer cervicis (BC) de pintainho e nervo frênico diafragma (NFD) de camundongo foram utilizadas para o registro miográfico através de estimulação elétrica indireta para medidas eletrofisiológicas, análise morfológica e microscopia eletrônica de transmissão. Frações ativas do extrato metanólico foram obtidas submetendo-se à coluna de fase reversa Luna PFP (250 x 4,6 mm). O extrato metanólico (50 µg/ml) causou somente facilitação da neurotransmissão em preparações NFD. Ao contrário, causou bloqueio neuromuscular significativo em preparações BC que foram concentração-dependente (3, 10 and 30 µg/ml; a 37° C) com tempo para 50% de bloqueio, média ± erro padrão: 84±10, 51±3 e 12±0,8 min com 3, 10 e 30 µg/ml, respectivamente; n=6-8 cada, precedido por facilitação da neurotransmissão. Não houve inibição significativa das respostas contraturantes à ACh (110 µM) ou KCl (20 mM) após bloqueio completo em qualquer concentração testada. Em preparações BC incubadas com o extrato metanólico (10 µg/ml) a 22° C por 70 min não observou-se qualquer alteração das respostas musculares (117±3%; n=5), mas quando a temperatura do banho foi elevada a 37° C, 50% de bloqueio ocorreu após 92±3 min (n=5; p<0.05). A incubação de preparações BC curarizadas (d-Tc, 1 µg/ml) com o extrato metanólico (10 µg/ml) resultou em completo e irreversível bloqueio enquanto que as preparações tratadas somente com curare mostraram a reversão completa da resposta contrátil após várias lavagens. Não houve aumento significativo nos níveis de liberação de creatinoquinase (90±21 vs. 80±15 U/l, antes e após 120 min de incubação com o extrato, respectivamente, n=5) além da ausência de alterações na morfologia das fibras musculares ou na porcentagem de danos na fibra (2.4±0.9 vs. 2.3±0.5 %, antes e após 120 min de incubação com o extrato, respectivamente, n=5). O extrato metanólico (50 µg/ml) aumentou a resposta contrátil mas não alterou o potencial de membrana em repouso (-81±1 mV e -78±1 mV para controle e preparação tratada após 60 min). Registros eletrofisiológicos mostraram que houve um aumento progressivo na frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) de 34±3,5 (controle) para 88±15 (após

60 min de incubação com o extrato); houve também um aumento nos valores do conteúdo quântico, de  $128 \pm 13$  (controle) para  $272 \pm 34$  e  $171 \pm 11$  após 5 min e 60 min, respectivamente, em preparações tratadas com o extrato metanólico. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou que o volume ocupado pelas vesículas sinápticas foi significativamente reduzida ( $32 \pm 5\%$ ;  $p < 0.05$ ) após 5 min mas este efeito foi reversível após 60 min de incubação para as preparações tratadas com  $50 \mu\text{g/ml}$  do extrato metanólico. Não houve dano estrutural distinguível na membrana do terminal nervoso e nas mitocôndrias das preparações tratadas com o extrato, quando comparada com as preparações controle. O pré-tratamento das preparações NFD com ouabaína ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), um inibidor da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, por 5 min antes da incubação com o extrato, preveniu o aumento do conteúdo quântico comparado com preparações controle ( $118 \pm 18$ ,  $117 \pm 18$  e  $154 \pm 33$  para preparações controle-ouabaína e tratadas com ouabaína e incubadas com o extrato por 5 min e 60 min, respectivamente). A cromatografia por HPLC do extrato metanólico resultou em 24 frações, das quais 4 (frações 20, 21, 22 e 24) causaram bloqueio neuromuscular em preparações BC. A fração 20 ( $3 \mu\text{g/ml}$ ) foi escolhida por ser 3 vezes mais potente que as demais e causou bloqueio neuromuscular significativo ( $p < 0.05$ ; tempo para 50% de bloqueio:  $43 \pm 4$  min;  $n=4$ ) precedido por facilitação em preparações BC a  $37^\circ \text{C}$ . A fração 20 não inibiu as respostas contraturantes à ACh ( $110 \mu\text{M}$ ) ou KCl ( $20 \text{ mM}$ ) após completo bloqueio neuromuscular em preparações BC. Em preparações NFD, a fração ( $15 \mu\text{g/ml}$ ) aumentou significativamente os valores do conteúdo quântico de  $117 \pm 18$  (controle) para  $236 \pm 44$  após 5 min de incubação ( $n=4$ ;  $p < 0.05$ ). Estes resultados indicam que o extrato metanólico do veneno de *R. schneideri* é capaz de interferir com a neurotransmissão por ativar e/ou bloquear a liberação da acetilcolina nos sítios pré-sinápticos, provavelmente envolvendo a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, sem causar qualquer dano à musculatura.

**Palavras chave:** *Rhinella schneideri*, preparações neuromusculares, microscopia eletrônica de transmissão, bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

## ***ABSTRACT***

---

*Rhinella schneideri*, previously known as *Bufo paracnemis*, is a common toad in many regions of Brazil. The venom of this species exerts important cardiovascular effects in humans and animals, but little is known of its neuromuscular activity. In this work, we examined the neurotoxicity of *R. schneideri* venom in chick and mouse neuromuscular preparations. Venom was collected by manual compression of the large parotid glands behind the eyes and then extracted with methanol. The extract was lyophilized prior to testing in biological preparations. Chick biventer cervicis (BC) and mouse phrenic nerve-diaphragm (PND) preparations were mounted for conventional twitch-tension recording in response to indirect stimulation, for electrophysiological measurements, morphological analysis and transmission electronic microscope. Also, an active fraction of this methanolic extract obtained by reverse phase HPLC on a Luna PFP (250 x 4.6 mm) column. The methanolic extract (50 µg/ml) caused facilitation but no neuromuscular blockade in PND preparations. In contrast, significant ( $p<0.05$ ) concentration-dependent (3, 10 and 30 µg/ml) neuromuscular blockade (time for 50% blockade, mean±S.E.M.: 84±10, 51±3 and 12±0.8 min with 3, 10 and 30 µg/ml, respectively;  $n=6-8$  each) preceded by facilitation was seen in BC preparations at 37°C. There was no inhibition of contractures to exogenous ACh (110 µM) or KCl (20 mM) after complete blockade by any of the concentrations tested. Incubation of BC preparations with methanolic extract (10 µg/ml) at 22°C for 70 min did not affect neuromuscular transmission (117±3%;  $n=5$ ), but when the bath temperature was increased to 37°C, 50% blockade occurred within 92±3 min ( $n=5$ ;  $p<0.05$ ). Incubation of curarized (d-Tc, 1 µg/ml) BC preparations with methanolic extract (10 µg/ml) resulted in complete, irreversible blockade whereas preparations treated with curare alone showed complete reversion in the twitch-tension after washing. There was no significant increase in creatine kinase levels (90±21 vs. 80±15 U/l, before and after a 120 min incubation with extract, respectively;  $n=5$ ) and no significant alterations in muscle fiber morphology or in the percentage of damaged fibers (2.4±0.9 vs. 2.3±0.5 % before and after a 120 min incubation with extract, respectively;  $n=5$ ). The methanolic extract (50 µg/ml) increased the twitch-tension but did not alter the membrane resting potential (-81±1 mV and -78±1 mV for control and poison-treated preparations after 60 min). Electrophysiological measurements showed that there was a progressive increase in the frequency of miniature end-plate potentials (MEPPs) from 34±3.5 (control) to 88±15 (after a 60 min incubation with extract); there was also an increase in the end-plate potentials (based on the quantal content) from 128±13 (control) to 272±34 and 171±11 after 5 min and 60 min, respectively, in extract-treated preparations. TEM showed that the fractional volume occupied by

synaptic vesicles was significantly reduced ( $32\pm5\%$ ;  $p<0.05$ ) after a 5 min but this effect was reversible after 60 min of incubation to 50  $\mu\text{g/ml}$  of methanolic extract. There was no structural damage to the membrane of the terminal boutons and the mitochondria of extract-treated preparations were indistinguishable from those of control preparations. Pretreatment of the preparations with ouabain (1  $\mu\text{g/ml}$ ), a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump inhibitor, for 5 min prior to incubation with methanolic extract prevented the increase in quantal content compared to preparations without extract ( $118\pm18$ ,  $117\pm18$  and  $154\pm33$  for ouabain-treated controls and ouabain-treated preparations incubated with venom for 5 min and 60 min, respectively). HPLC of the methanolic extract resulted in 24 fractions, of which four (fractions 20, 21, 22 and 24) produced blockade in BC preparations. Fraction 20 (3  $\mu\text{g/mL}$ ) was chosen because was the most potent of the four fractions and caused significant ( $p<0.05$ ) neuromuscular blockade (time for 50% blockade:  $43\pm4$  min;  $n=4$ ;  $\text{mean}\pm\text{SEM}$ ) preceded by facilitation in BC preparations at  $37^\circ\text{C}$ . Fraction 20 did not inhibit contractures to exogenous ACh (110  $\mu\text{M}$ ) or KCl (20 mM) after complete neuromuscular blockade in BC preparations. In PND preparations, fraction 20 (15  $\mu\text{g/mL}$ ) significantly increased the quantal content value from  $117\pm18$  (control) to  $236\pm44$  after 5 min ( $n=4$ ;  $p<0.05$ ). These results indicate that the methanolic extract of *R. schneideri* is capable to interfere with the neurotransmission by activating and/or blocking the pre-synaptic acetylcholine release by an activity involving the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump, without damaging the muscle membrane.

Keywords: *Rhinella schneideri*, neuromuscular preparations, transmission electron microscope,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump.

## *INTRODUÇÃO*



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Animais venenosos*

Alguns seres vivos produzem substâncias tóxicas conhecidas como biotoxinas. Em geral, esses animais causam a intoxicação da presa para alimentação ou como forma de defesa quando se sentem ameaçados.

O sapo é animal venenoso, dito não peçonhento, por não dispor de aparelho inoculador de veneno para intoxicar sua presa. Os sapos exibem glândulas secretoras de veneno na superfície do corpo e em determinados pontos formam nítidas elevações. Os principais aglomerados destas glândulas são denominados parotóides, situados na região dorsal, logo atrás da cabeça, onde constituem formações muito salientes; há outro grupo menos desenvolvido de glândulas ao nível das tíbias das patas posteriores.

As glândulas parotóides (Fig. 1) são compostas por uma grande concentração de glândulas granulares responsáveis pela produção e estocagem de veneno (Chen e Chen, 1933; Bedford, 1974; Oehme et al., 1980; Duellman e Trueb, 1986; Miranda, 1990). Estas secreções podem proteger contra os predadores, sendo consideradas como o mecanismo de defesa destes animais (Monti e Cardello, 1994).

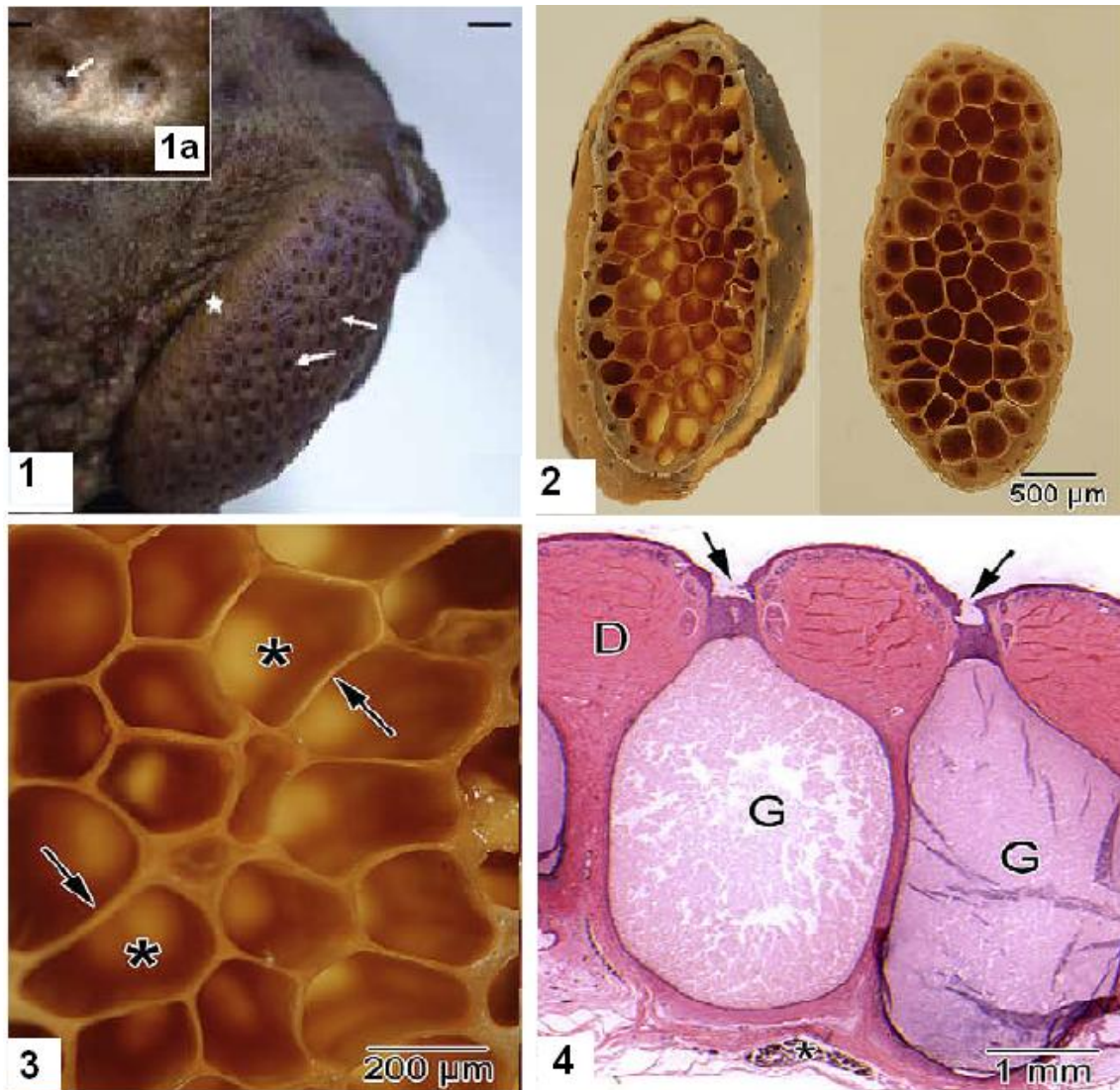


Figura 1: Glândula parotóide. 1- Visão macroscópica da região cefálica mostrando uma das glândulas parotóides. 1a- Micrografia esteoscópica com detalhes da glândula. 2- Glândula parotóide seccionada no plano frontal. 3- Alta magnitude do alvéolo mostrando a parede (setas) e fundo (asteriscos) de cada glândula. 4- Secção longitudinal da glândula parotóide, G- a seta indica os poros, D- derme (parafina; HE). Figuras extraídas de Jared et al (2009) e Almeida et al (2007).

Como os sapos são incapazes de projetar o veneno sobre os seus inimigos, segue-se que, na prática, não oferecem perigo, quer para o homem, quer para

outros animais, sendo mesmo preciosos auxiliares do homem no combate a insetos nocivos. Ao contrário dos venenos ofídicos que só atuam quando penetram nos tecidos, o veneno dos batráquios, atua por simples deposição sobre as mucosas determinando sintomas imediatos, os quais para várias espécies animais são gravíssimos ou mesmo mortais.

O veneno de sapo é principalmente cardiotoxico e determina envenenamento similar aquele causado por digitálicos (Chen e Kovarikova, 1967; Knowles, 1968; Bedford, 1974; Palumbo et al., 1975; Russel, 1979; Oehme et al., 1980; Toledo, 1984; Zelnik, 1964; Brownlee, 1990).

Os sapos estão distribuídos ao redor do mundo, mas são encontrados principalmente em áreas úmidas e climas tropicais (Duellman e Trueb, 1986; Monti e Cardello, 1994). No Brasil, as espécies mais comumente encontradas são *Bufo haunus marinus*, *B. typhonius*, *B. crucifer*, *B. ictericus*, *B. granulosus*, *B. ocellatus*, *B. rufus* e *B. schneideri* (Ceil, 1972). Entretanto, não são todas as espécies que causam morte por envenenar os animais (Bedford, 1974).

Veneno de anfíbios é uma importante fonte de informação para a biofarmacologia, e o conhecimento desses venenos pode contribuir para a síntese de substâncias quimicamente ativas com possível uso em seres humanos (Monti e Cardello, 1994).

### **1.2. Envenenamento causado por sapos**

Os cães são as vítimas mais freqüentes de intoxicação causada pelo veneno produzido pelos sapos das espécies *Rhinella marinus* e *Rhinella vulgaris*, responsáveis pela quase totalidade dos acidentes.

No caso de cães e gatos o envenenamento ocorre quando o animal tenta abocanhar, para brincar ou ingerir o sapo, ou quando faz limpeza das patas após ter brincado com o animal. O veneno é absorvido pela mucosa do trato gastrointestinal (Knowles, 1968; Miranda, 1990; Monti e Cardello, 1994). O veneno de sapo é principalmente cardiotoxico e causa envenenamento similar aqueles causados por digitálicos (Chen e Kovarikova, 1967; Knowles, 1968; Bedford, 1974; Palumbo, Perry, Read, 1975; Russel, 1979; Oehme et al., 1980; Toledo, 1984; Zelnik, 1984; Brownlee, 1990). Assim, animais envenenados mostram um resultado falso positivo em testes que avaliam a concentração plasmática de digoxina (Lin, et al., 1989).

O conhecimento da toxicidade do veneno de sapo vem do passado quando o veneno era usado por diferentes pessoas e com vários objetivos. Mulheres romanas usavam as secreções de sapo para envenenar seus maridos (Chen e Kovarikova, 1967). No Hawaii, em 1935, uma criança morreu após ter ingerido um sapo morto por seu pai, numa plantação de cana de açúcar (Palumbo et al., 1975). Índios da América do Sul, principalmente da região Amazônica, usavam veneno de anuros da família *Dendrobatidae* e espécies de *C. blombergi* na ponta de suas setas para caça e luta (Chen e Kovarikova, 1967; Bedford, 1974; Mensah-Dwumah e Daly, 1978; Russel, 1979; Toledo, 1984). No Japão, chamado de 'Senso', e na China 'Chan su', o veneno seco era usado como expectorante, anti-hemorragico, diurético e estimulante cardíaco (Chen e Chen, 1933; Chen e Kovarikova, 1967; Zelnik et al., 1964). Ainda o 'Chan su' e 'Love Stone', um afrodisíaco tópico, são feitos a partir do veneno de sapo que contém esteróides cardioativos. No entanto, há vários relatos de pessoas que ingeriram esse tipo de

substância e mostraram os efeitos típicos do envenenamento por sapo, e em alguns casos, geraram a morte do indivíduo envenenado (Brubacher et al., 1996; Gowda et al., 2003). Estes relatos mostram que o envenenamento por sapo pode também constituir-se como um problema para a humanidade.

A composição química do veneno de sapo é muito complexa, varia dependendo da espécie (Chen e Chen, 1933) e não é bem definida (Zelnik, 1965). As substâncias que estão presentes no veneno podem ser divididas basicamente em dois grupos: compostos básicos, como aminas biogênicas, e derivados esteróides.

**Aminas biogênicas:** incluem adrenalina, noradrenalina, além de bufoteninas, dihidrobufoteninas e bufotioninas, responsáveis pelos efeitos alucinógenos no sistema nervoso central.

**Derivados esteróides:** incluem colesterol, ergosterol, bufotoxinas e bufadienolídeos. As bufodienolídeos e bufotoxinas são responsáveis pela ação digitalis-like (Balarz et al., 1986; Duellman e Trueb, 1986; Brownlee et al., 1990). Elas inibem a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nas células cardíacas, aumentando a concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  e, conseqüentemente, inibem a extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$ . Assim, o  $\text{Ca}^{2+}$  tem sua concentração aumentada, provocando um aumento na contração cardíaca e uma redução na frequência dos batimentos cardíacos por uma ação vagal (Hoffman e Lefkowitz, 1991).

Sinais de envenenamento por sapos podem ocorrer quase imediatamente após a intoxicação e podem estar restritos à irritação local ou causar sinais sistêmicos. Este envenenamento pode ou não causar morte do animal intoxicado

após 15 minutos a partir do início dos sintomas (Knowles, 1968; Micuda, 1968; Otani et al., 1969; Oheme et al., 1980).

### **1.3. A espécie *Rhinella schneideri***

Esta espécie foi descrita primeiramente como *Bufo schneideri* (Werner, 1894), mas por muito tempo foi chamada de *Bufo paracnemis* (Lutz, 1925), e recentemente, denominado *Rhinella schneideri* (Frost, 2009) (Figura 2). É um sapo grande nativo da América do Sul, mais especificamente da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (Bastos et al., 2003; Cochran, 1955)

É conhecido popularmente como ‘sapo boi’ e esse nome se deve ao coaxar característico, que lembra o mugido de um boi.

#### **Classificação científica:**

- Reino: Animalia
- Filo: Chordata
- Classe: Amphibia
- Ordem: Anura
- Família: Bufonidae
- Gênero: *Rhinella*
- Espécie: ***Rhinella schneideri***

O *Rhinella schneideri* pertence a um grupo que congrega animais de grande porte possuindo membros curtos e coloração que varia de castanho-claro a escuro. Possui pele áspera especialmente na região dorsal que é bastante rugosa devido à presença das glândulas cutâneas (Cochran, 1955). Os adultos desta espécie são andarilhos, e forageiam sob postes de iluminação, podendo ser encontrados a quilômetros de distância de corpos d’água. Durante o dia abrigam-

se sob pedras e troncos de madeira, montes de tijolos, ou mesmo no interior de calhas, canaletas, etc. Alimentam-se de insetos, minhocas, pequenos roedores e não é considerada uma espécie ameaçada de extinção.

Em 1966, Riet estudou o veneno de *R. schneideri*, administrando em ratos, por via i.p., de 2 – 5 mg e observou movimentos descoordenados, convulsões e paralisia, primeiro da respiração seguida do coração. Basicamente o trabalho de Riet (1966) foi o único trabalho encontrado na literatura que foi utilizado o veneno de *R. schneideri* e em que foram relatados todos os demais efeitos como aqueles mencionados, além dos já conhecidos sobre o sistema cardiovascular.



Figura 2: *Rhinella schneideri*

O interesse em se trabalhar com novos venenos deve estar além do entendimento da fisiopatologia do envenenamento. Os venenos animais são ricas fontes de compostos bioativos, que podem, e devem ser usados em ensaios de farmacologia e toxicologia.

Veneno de anfíbios tem demonstrado a existência de uma infinidade de novas substâncias, muitas delas com efeitos farmacológicos muito interessantes que poderiam ser usados em seres humanos.

No presente projeto, o objetivo foi de verificar a capacidade do veneno em atuar sobre a transmissão na sinapse neuromuscular, também se buscou identificar as frações responsáveis pelos efeitos farmacológicos exibidos. Além do mais, é o pioneiro em mostrar a atividade do veneno de *Rhinella schneideri* sobre a transmissão neuromuscular.



## ***OBJETIVOS***

## 2. OBJETIVOS

### ***Gerais***

Estudar os efeitos farmacológicos do veneno de *Rhinella schneideri* e de suas frações ativas sobre a junção neuromuscular.

### ***Específicos***

- Estudar o efeito do veneno de *R. schneideri* sobre a transmissão neuromuscular
- Analisar o efeito do veneno na morfologia ultraestrutural das terminações nervosas
- Encontrar a fração ativa responsável pelos efeitos sobre a junção neuromuscular

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, pesando de 25 a 30 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp, e pintainhos de 3 a 8 dias, fornecidos pela Granja Globo Aves (Mogi Mirim/SP). Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 horas sem luz). O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal (COBEA) e aprovado sob o protocolo nº 1552-1 (CEEA/Unicamp).

#### **3.2. Material**

Veneno bruto de *Rhinella schneideri*, gentilmente cedido pelo prof. Dr. Cháriston André Dal Belo – UNIPAMPA-RS. Kit para a dosagem de creatinoquinase (CK-NAC Bioclin), drogas para determinação de mecanismo de ação e coluna para a purificação da toxina foram adquiridos através do auxílio financeiro da Fapesp (Processo no. 2008/54050-0).

#### **3.3. Extração metanólica**

O veneno de *R. schneideri* é insolúvel em solventes orgânicos, portanto, há a necessidade de se fazer uma extração metanólica do veneno bruto.

Foram utilizados 2 g do veneno bruto e adicionados em 50 mL de metanol. Após repouso da mistura por 3 dias, o extrato metanólico foi submetido à evaporação do metanol utilizando Speed vacuum. O extrato obtido, na forma de pó,

está pronto para ser dissolvido em solução nutritiva e testado em preparações biológicas.

#### **3.4. Preparação biventer cervicis de pintainho (BC)**

Os animais foram sacrificados sob anestesia utilizando isoflurano. A preparação foi isolada e montada de acordo com o método descrito por Ginsborg e Warriner (1960), em uma cuba com capacidade para 5 mL contendo solução de Krebs. A solução foi aerada de modo constante com carbogênio (mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e mantida a 37°C.

O músculo foi submetido à tensão de 0,5 g/cm e estimulado por meio de eletrodos bipolares posicionados na região entre o tendão e o músculo com o objetivo de estabelecer uma estimulação de campo.

Estímulos supramaxiais (de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração) provenientes do estimulador Grass 48 foram aplicados ao músculo e as contrações musculares resultantes de estímulos elétricos máximos e as contraturas em resposta à adição exógena de KCl (20 mM) e ACh (110 µM), antes e depois do experimento, registradas em fisiógrafo Gould 3400 por meio de um transdutor isométrico Load Cell BG 10 GM, (120 min). Após um período de estabilização de 20 minutos, os protocolos experimentais eram iniciados.

#### **3.5. Preparação Nervo Frênico-diafragma de camundongo (NFD)**

Camundongos machos pesando de 25 a 30 g foram anestesiados por via inalatória com isoflurano e posteriormente exsanguinados. Após a dissecação foram retirados os hemidiafragmas esquerdo e direito e isolados os nervos frênicos

correspondentes (Bülbring, 1946); as preparações foram mantidas em solução nutritiva de Tyrode com abastecimento constante de carbogênio (mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>; pH 7,5) e a 37°C. Cada segmento do hemidiafragma foi fixado em uma cuba com capacidade para 5 mL, a qual é preenchida com solução nutritiva abastecida de carbogênio. O músculo diafragma foi mantido sob tensão constante de 5 g/cm. O nervo frênico foi sobreposto a um eletrodo de platina que se mantém em contato com a superfície da solução nutritiva. O transdutor isométrico (BG-50 gramas) fica acoplado a um fisiógrafo (Gould RS 3400). A preparação, então, foi estimulada indiretamente, através do nervo frênico (estimulador Grass S48), usando-se estímulos suprimais e frequência de 0,1 Hz com duração de 0,2 ms. Após o registro em condições-controle e a verificação do perfeito estado da preparação, os protocolos experimentais eram iniciados.

Para os grupos de estimulação tetanizante (70 Hz), os experimentos foram divididos em dois grupos. No primeiro grupo adicionou-se a neostigmina (1 µg/mL), e no segundo, o extrato metanólico de *R. schneideri* (50 µg/mL). As contrações tetânicas foram observadas num intervalo de 15 min, a cada estimulação.

### **3.6. Protocolos farmacológicos**

Foram adicionadas neostigmina (10 µg/ml) e 3,4-diaminopiridina (10 µg/ml) após o bloqueio total do extrato metanólico, em preparações BC, e pré-tratamento de Ca<sup>2+</sup> (3,6 mM) e 3,4-diaminopiridina (10 µg/ml), em seguida, a adição do extrato. d-Tc (1 µg/ml) foi utilizada na preparação BC de pintainho, na determinação do mecanismo de ação em preparação de ave. Na preparação nervo frênico diafragma de camundongo foram utilizadas neostigmina (10 µg/ml) e ouabaína (1 µg/ml) na

intenção de descrever o mecanismo de ação do extrato metanólico, em preparação de mamífero. Os protocolos farmacológicos utilizados deram suporte para o estudo do mecanismo de ação do extrato metanólico do veneno de *R. schneideri*, sobre a junção neuromuscular.

### **3.7. Estudo eletrofisiológico**

A preparação hemidiafragma de camundongo com sua face torácica voltada para cima, fixada horizontalmente por meio de alfinetes, em cuba revestida de resina e silicone, preenchida com 2 mL de solução nutritiva de Tyrode (composição descrita) e aerada com carbogênio (mistura de 95 % O<sub>2</sub> e 5 % CO<sub>2</sub>) a 28 °C, foi usada para o registro de parâmetros eletrofisiológicos; a cuba foi colocada na platina do microscópio estereoscópio (Wild M7 S - Switzerland) com capacidade para aumentos até 40 vezes.

Utilizando a técnica convencional de registro com microeletrodo (Fatt e Katz, 1951), os microeletrodos de vidro foram preparados através do Vertical Pipete Puller (modelo 700D - David Kopf Instruments) e preenchidos com KCl 3 M, com uma resistência entre 10 – 25 MΩ. Os microeletrodos foram introduzidos intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio de micromanipulador (Leitz) para as medidas dos potenciais de membrana em repouso (PM), potencial de placa terminal em miniatura (PPTM) e de potencial de placa terminal (PPT). Os biopotenciais foram obtidos por meio de um amplificador de sinais (Getting Microelectrode Amplifier, MA, USA) e observados em osciloscópio Tektronix. Os registros foram armazenados em um microcomputador (Microtec, São

Paulo, SP) carregado com um software para aquisição de dados (AqDados, Lynx, São Paulo, SP). O computador munido de uma placa conversora A/D foi capaz de digitalizar os biopotenciais e gravá-los para posterior análise.

### ***3.7.1. Registro do potencial de membrana em repouso***

Para a medida do potencial de membrana das fibras musculares, os microeletrodos foram inseridos intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio do microscópio, fazendo a medida do deslocamento vertical sofrido pelo feixe de raios catódicos no osciloscópio, no momento da inserção. Além disso, o potencial de membrana foi monitorado digitalmente por intermédio do software já descrito. O mesmo procedimento foi repetido por cinco vezes em diferentes fibras em um período de tempo. O estudo dos efeitos induzido pelo extrato metanólico sobre o potencial de repouso da fibra muscular foi efetuado nos tempos t0 (controle), t15, t30, t60, t90 e t120 min.

### ***3.7.2. Potencial de placa terminal em miniatura (PPTM)***

Os potenciais de placa terminal em miniatura foram captados através da inserção do microeletrodo nas fibras musculares, na região da placa motora. Em cada tempo três placas motoras foram empaladas em período de 1 min e posteriormente calculou-se a média do número de potenciais registrados. Os PsPTM foram captados e observados em osciloscópio. Os potenciais de placa terminal em miniatura foram então registrados e analisados em computador carregado com o software já descrito. Os parâmetros-controle foram definidos antes



da adição do extrato metanólico e os PsPTM foram registrados nos tempos t0, t5, t15, t30 e t60 min.

### **3.7.3. Registro do potencial de placa terminal**

#### **3.7.3.1. Técnica cut muscle**

A técnica *cut muscle* proposta primeiramente por Barstad (1962) e modificada para camundongo por Banker et al. (1983) foi utilizada para evitar a deflagração de potenciais de ação, quando o nervo motor é estimulado para gerar o potencial de placa terminal. Essa técnica consiste em cortar periféricamente, em toda a sua extensão, as fibras musculares da preparação hemidifragma de camundongo com seu respectivo nervo frênico (descrita no item 3.5). Este procedimento causa queda do potencial de membrana celular (em torno de -40 mV), com inativação inicial dos canais de sódio, o que impede a deflagração do potencial de ação e conseqüentemente paralisia muscular, assegurando assim, o registro de PPT isentos de potencial de ação (Prior et al., 1993).

Os registros dos potenciais de placa terminal (PsPT) foram feitos em resposta à estimulação elétrica (supramaximal). Para tal, utilizou-se a estimulação elétrica indireta por meio de eletrodo de platina posicionado de modo a sugar o coto distal do nervo frênico (10 - 15 V, 0,2 ms, 1 Hz).

#### **3.7.4. Medida do conteúdo quântico**

O conteúdo quântico de uma resposta sináptica corresponde ao número de vesículas efetivas liberadas (“unidades quânticas”) cuja somatória dá origem ao

PPT. No presente trabalho, o “tamanho quântico” foi a estimativa do valor unitário. Assim, uma vez obtido numa dada célula esse tamanho quântico, o conteúdo quântico do PPT correspondeu ao quociente entre a sua amplitude e o tamanho quântico.

Os cálculos relativos ao conteúdo quântico foram realizados após a correção dos PsPT para a somatória não-linear de quanta, de acordo com a fórmula de Elmqvist e Quastel (1965):

$$\mathbf{PPT'} = (\mathbf{PPT}) \times (\mathbf{PM/PM-PPT})$$

Onde:

**PPT'**= PPT corrigido

**PPT**= PPT observado

**PM**= potencial de membrana

Concentrações de 50 µg/mL do extrato metanólico foram testadas e monitoradas nos tempos de 5, 15, 30 e 60 min.

### ***3.8. Estudo bioquímico***

#### ***3.8.1. Atividade da liberação de creatinoquinase***

Para avaliar a atividade miotóxica deste veneno, foram coletadas alíquotas de 0,100 mL da solução contendo as preparações de musculatura esquelética, no período basal e ao final de cada experimento, para posterior análise da medida da atividade enzimática de creatinoquinase. A liberação de CK foi analisada através do

método enzimático para creatinoquinase, utilizando-se o kit de CK-NAC BIOCLIN (Quibasa Química Básica Ltda).

Os resultados de CK foram expressos em U/L. Uma unidade de CK corresponde à fosforilação de 1 nmol de creatina/min a 37°C.

### **3.9. Análise morfológica**

Ao final dos experimentos, após a exposição aos tratamentos, as preparações de BC de pintainho, foram retiradas e fixadas em formaldeído 10%, por 24 horas. A fixação foi seguida pela desidratação e inclusão em parafina. A confecção das lâminas histológicas foi seguida pela obtenção de secções de 7 µm de cada experimento, através do micrótomo, em seguida, montadas e coradas com hematoxilina:eosina (H.E.) para observação em microscópio óptico. Após análise quantitativa do material histológico, foi processada a documentação dos resultados obtidos, através do microscópio Olympus BX51, com a utilização do programa Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc.) para o registro de imagens.

### **3.10. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Fragmentos das preparações nervo frênico diafragma de camundongo dos grupos controle e tratado foram fixados em Karnovsky (glutaraldeído 2.5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0.1 M ) (pH 7.4), “overnight”. O material foi lavado em solução salina 0.9% glicosada (0.15 M ), 3 banhos de 15 min cada, em seguida pós-fixado em tetróxido de ósmio 2%, por 2 h, e novamente lavado em

salina glicosada, 3 banhos de 15 min cada, e por fim, pós-fixado com acetato de uranila 1%, por 24 h, e lavado com água destilada, 3 banhos de 10 min cada. A desidratação do material iniciou-se em etanol 30%, 50%, 70% (3 vezes de 10 min cada), e posteriormente em acetona 70%, 90% e 3 banhos em acetona 100%, por 30 min cada concentração.

O material foi embebido em acetona:Epon-Araldite (2:1; 1:1 e 1:2), por 1 h para cada concentração, e em resina Epon-Araldite 100%, “overnight” em rotor, e incluído em Epon-Araldite 100%, sendo mantido a 60°C, por 72 h, para polimerização.

Os cortes semifinos para determinar a região de junção neuromuscular foram coletados em lâminas de vidro, corados com Azul de Toluidina e observados em microscópio óptico.

Os cortes ultrafinos obtidos em ultramicrotomo e contrastados com acetato de uranila 2% (30 min) e citrato de chumbo (20 min), foram observados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 2100) operado a 120 kV.

A quantificação foi realizada através da contagem de todas as vesículas sinápticas presentes nos botões terminais, e feita a comparação entre controle e tratados.

### **3.11. Fracionamento do veneno**

#### **3.11.1. Preparo do veneno**

O veneno de *R. schneideri* foi dissolvido em 40 µL de bicarbonato de amônio completando-se o volume para 100 µL com ácido trifluoroacético (ATF) 0,1% e

centrifugado (14000 g, 3 min, 4° C) para remover o material insolúvel. O sobrenadante claro foi usado para cromatografia.

### **3.11.2. Cromatografia em HPLC de coluna fase reversa**

Foi utilizada a coluna Phenomenex Luna PFP (250 x 4.6 mm) com fase móvel de solução aquosa de ácido trifluoracético 0.1% + acetonitrila (ACN) 10% e eluente ACN 90% + 0.1% TFA. 1 mg de veneno de *R. schneideri* foi aplicado à coluna pré-equilibrada e o material foi eluído com um gradiente linear (0-65%). Em todos os ensaios, o perfil de eluição foi monitorado a 214 e 280 nm. As frações foram coletadas manualmente, liofilizadas e testadas em preparações neuromusculares de pintainho e camundongo.

### **3.11.3. Espectrometria de massa MALDI-TOF**

A massa molecular das frações foi determinada em um espectrômetro de massa tipo Ettan MALDI-TOF/Pro (Amershan Biosciences, Suécia), usando-se o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinamico como matriz.

### **3.12. Análise estatística**

Cada experimento foi repetido de três a oito vezes e os resultados foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão. Para análise estatística foram usados os testes ANOVA, para medidas repetidas, e o valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

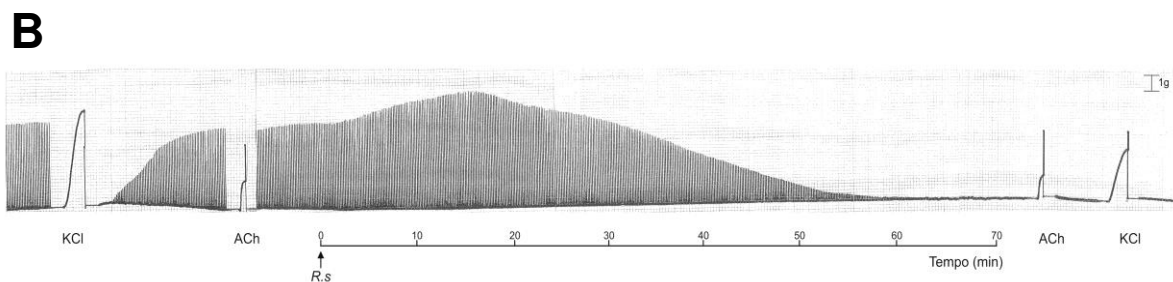
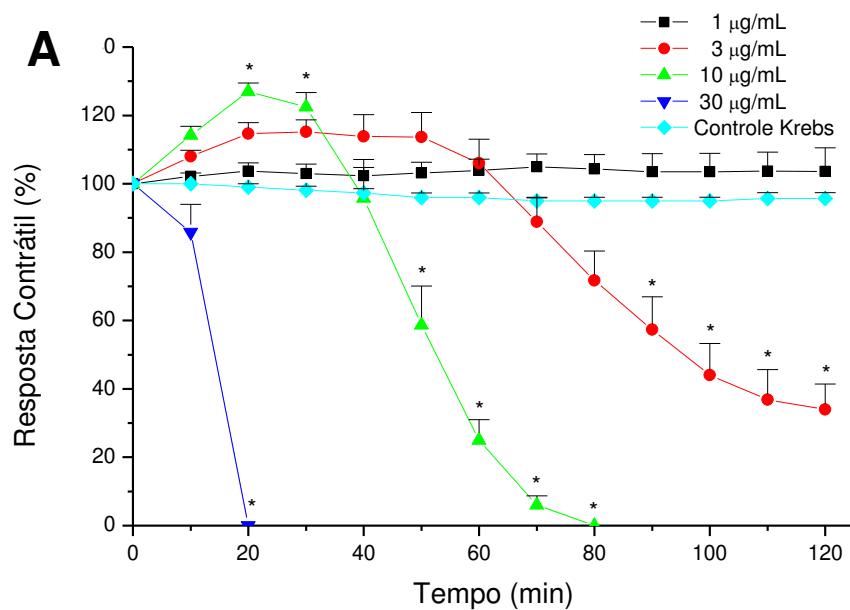
## ***RESULTADOS***

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudo miográfico - Preparação biventer cervicis de pintainho

O extrato metanólico do veneno de *Rhinella schneideri* produziu um bloqueio neuromuscular dependente da concentração utilizada (1, 3, 10 e 30 µg/mL) em preparação isolada de biventer cervicis de pintainho. O tempo para produzir 50% de bloqueio neuromuscular foi inversamente proporcional à concentração, ou seja,  $12 \pm 0,8$  min (30 µg/mL),  $51 \pm 3$  min (10 µg/mL) e  $84 \pm 10$  min (3 µg/mL) (Figura 3A).

Nas concentrações de 3 e 10 µg/mL o extrato produziu um efeito facilitador antes do bloqueio neuromuscular; pelo fato de o extrato ter mostrado ambos os efeitos facilitador e bloqueador na concentração de 10 µg/mL (Figura 3B), elegeu-se esta concentração para o estudo sobre a junção neuromuscular em preparação de ave.

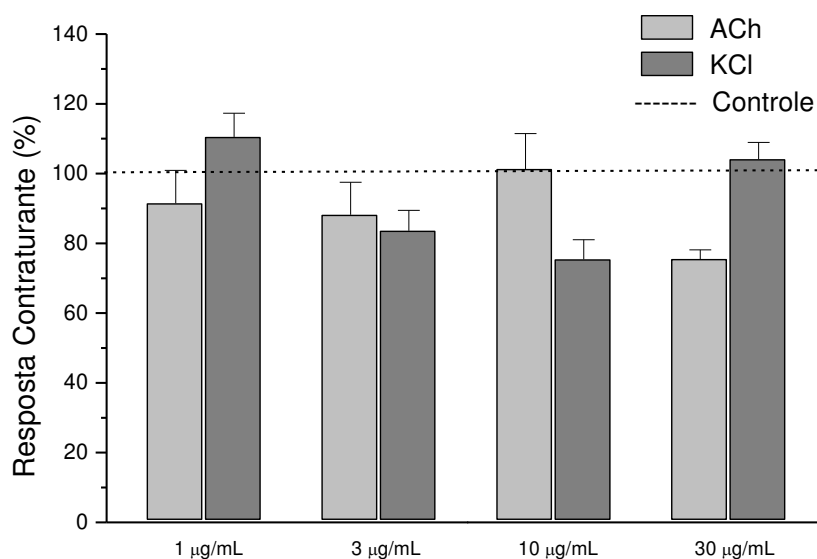


**Figura 3:** Resposta neuromuscular - Preparação BC de pintainho sob estimulação elétrica indireta. (A) tratamento com solução de Krebs e curva concentração-resposta do extrato metanólico do veneno de *R. schneideri* nas concentrações 1, 3, 10 e 30 µg/mL. Os pontos representam  $\pm$  erro-padrão do número de experimentos ( $n=6$ ),  $p < 0,05$ . (B) perfil miográfico representativo (10 µg/mL). Note a presença de contratura em resposta à adição de ACh e KCl na vigência do bloqueio neuromuscular completo.



#### 4.2. Respostas contraturantes à ACh e ao KCl

O extrato metanólico produziu bloqueio neuromuscular total na preparação biventer cervicis de pintainho sob estimulação elétrica indireta, sem alterar significativamente as respostas contraturantes à ACh (110  $\mu$ M) e ao KCl (20 mM) (n=6) (Fig. 4).

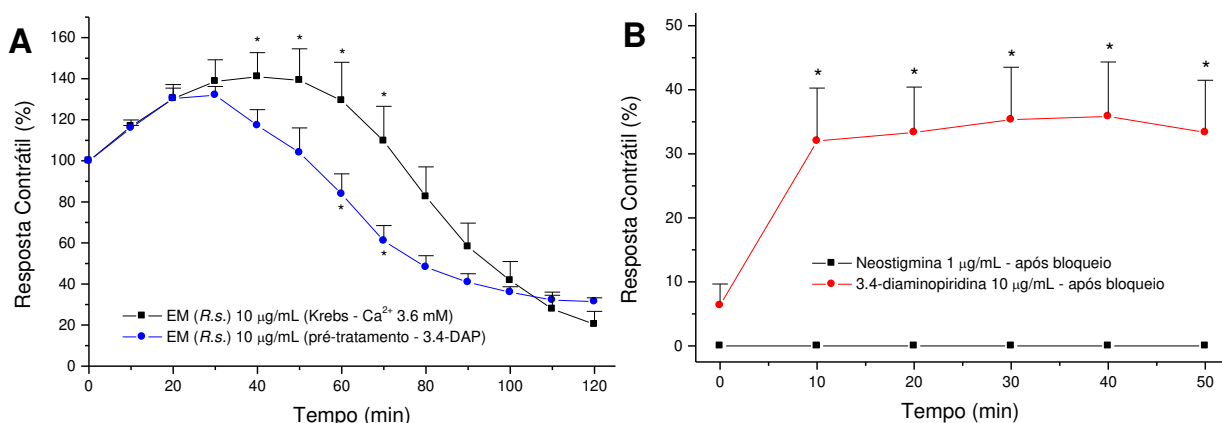


**Figura 4:** Representação do efeito do extrato metanólico do veneno de *R. schneideri* sobre a preparação BC de pintainho sob exposição exógena de ACh e KCl. Observe a ausência de efeitos estatisticamente significativos nas quatro concentrações ensaiadas. Os histogramas correspondem às médias das respostas contraturantes do músculo BC frente à adição de ACh e KCl. As barras representam a média  $\pm$  erro-padrão do número de experimentos. (n=6),  $p > 0,05$ .

#### 4.3. Estudo farmacológico do veneno de *R. schneideri* em preparação neuromuscular de ave

A preparação BC quando pré-tratada com 3,4-diaminopiridina (10 µg/mL) ou  $\text{Ca}^{2+}$  (3,6 mM) apresentou um nível de bloqueio mais lento, sem chegar a bloqueio neuromuscular total. Obtendo 50% de bloqueio em  $76 \pm 9$  min e  $94 \pm 7$  min, respectivamente (Fig. 5A), ao contrário de preparações incubadas somente com o extrato metanólico (10 µg/mL) que foi de  $51 \pm 3$  min.

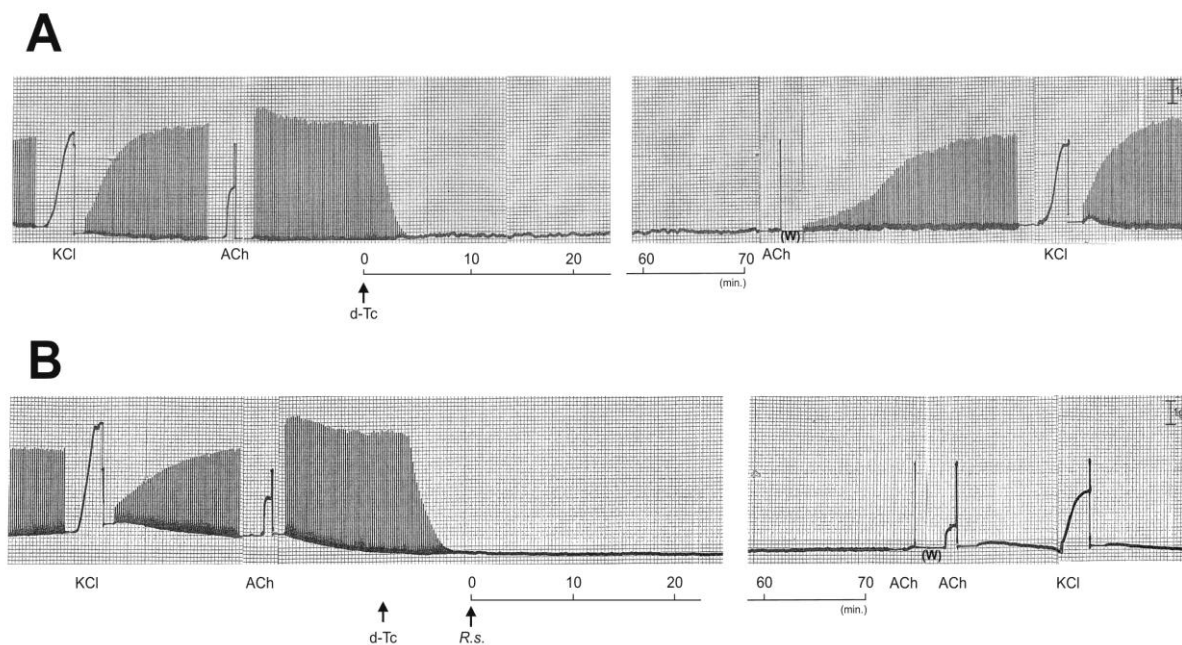
Em outro protocolo, na vigência de bloqueio total induzido pelo extrato metanólico (10 µg/mL), adicionou-se a neostigmina (1 µg/mL) sem que fosse observado qualquer reversão do bloqueio neuromuscular; porém, quando adicionou-se 3,4 diaminopiridina (10 µg/mL) foi observado um retorno de mais de 30% na resposta contrátil (Fig. 5B); ou seja, a adição da 3,4-DAP após bloqueio neuromuscular completo foi capaz de causar uma reversão parcial do bloqueio induzido pelo extrato, em preparação BC.



**Figura 5:** Representação gráfica da resposta neuromuscular da preparação BC de pintainho sob estimulação elétrica indireta e submetida a vários tratamentos. (A) solução de Krebs com o dobro da concentração fisiológica de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  3,6 mM) e pré-tratamento

com 3,4-DAP (10  $\mu\text{g/mL}$ ) antes da adição do extrato metanólico (10  $\mu\text{g/mL}$ ). (B) Adição de neostigmina (1  $\mu\text{g/mL}$ ) e 3,4-DAP (10  $\mu\text{g/mL}$ ) após bloqueio total induzido pelo extrato metanólico. Os pontos representam  $\pm$  erro-padrão do número de experimentos. ( $n=4-5$ ),  $p < 0,05$ .

A preparação de BC foi pré-incubada com d-Tc (1  $\mu\text{g/mL}$ ), para promover o bloqueio dos receptores nicotínicos ps-sinápticos, e a lavagem da preparação exibiu a reversão completa do bloqueio (Fig. 6A). Em contraste, preparaes pré-tratadas com d-Tc e incubadas com o extrato metanólico por 70 min (10  $\mu\text{g/mL}$ ), não apresentaram a reversão da resposta contrátil; após sucessivas lavagens da preparação a resposta contraturante  ACh foi observada (Fig. 6B).

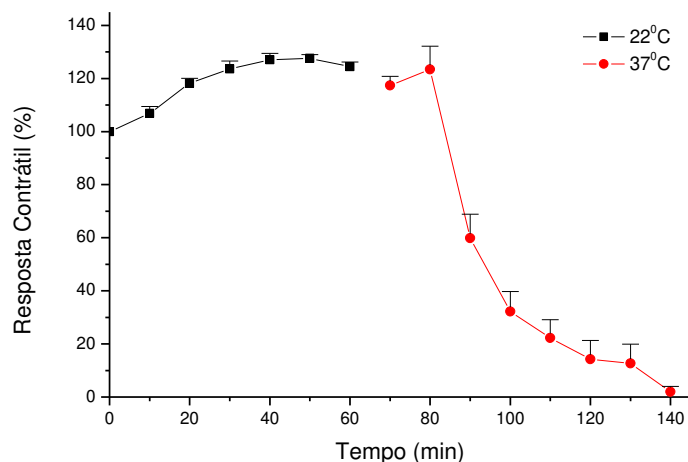


**Figura 6:** Registro miográfico da resposta contrátil da preparação BC de pintainho sob estimulação elétrica indireta. (A) preparação curarizada (d-Tc 1  $\mu\text{g/mL}$ ), e (B) preparação previamente curarizada e adição do extrato metanólico (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Note que a

preparação tratada com o extrato não apresentou reversão da resposta contrátil após lavagem. (n=4-5) (W, lavagem),  $p < 0,05$ .

#### 4.4. Baixa temperatura

A preparação BC mantida a 22° C, e seguida da adição do extrato metanólico, mostrou ausência de bloqueio neuromuscular, mantendo uma resposta contrátil em  $117 \pm 3\%$  após 70 min de incubação. Quando a temperatura foi alterada de 22° para 37° C, um progressivo e intenso bloqueio instalou-se nos 60 min seguintes (Fig. 7). Assim, o efeito bloqueador do extrato depende da temperatura do meio de incubação.

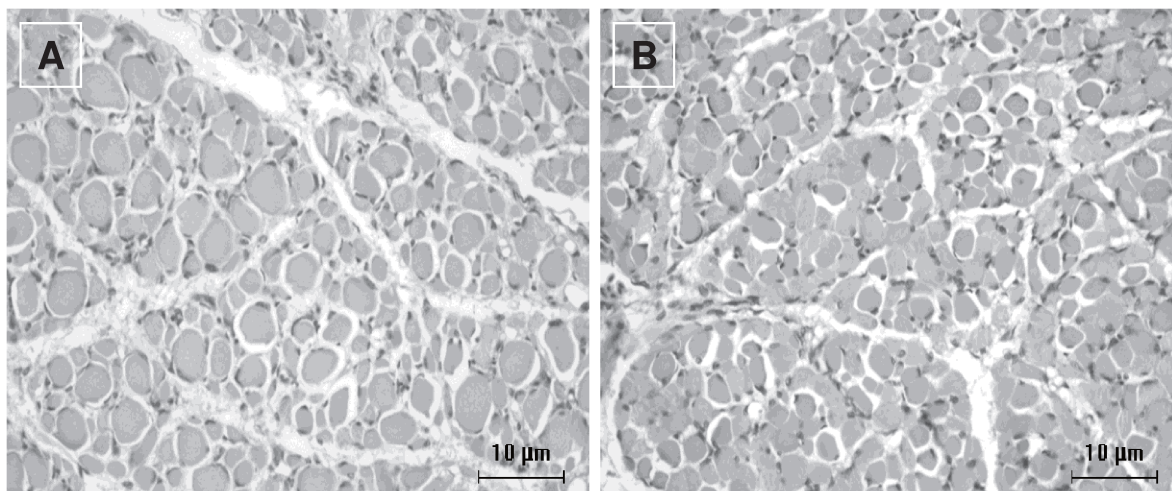


**Figura 7:** Representação gráfica da resposta contrátil do músculo BC de pintainho sob estimulação elétrica indireta, tratada com o extrato metanólico a 22° C. Note que o bloqueio típico do extrato metanólico foi estabelecido quando houve a troca de temperatura, de 22° C para 37° C (n=5).  $p < 0,05$ .

## **4.5. Estudo morfológico**

### **4.5.1. Microscopia óptica**

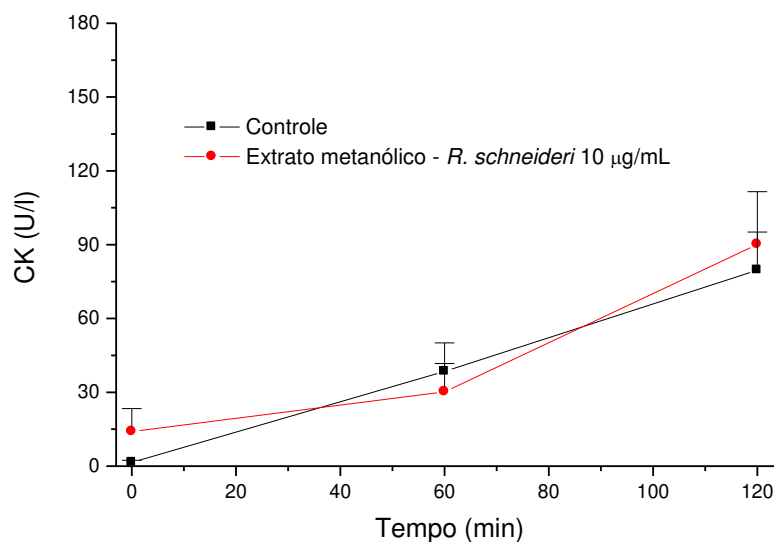
O músculo BC não apresentou alteração em sua morfologia nos grupos controle Krebs e tratado com o extrato metanólico (10 µg/mL) após 70 min de incubação, sendo os valores percentuais das células com algum tipo de lesão iguais a  $2,4 \pm 0,9$  e  $2,3 \pm 0,5\%$ , respectivamente (Fig. 8).



**Figura 8:** Corte histológico de preparações BC incubada com solução de Krebs (A, controle) ou tratada com extrato metanólico (B, 10 µg/mL). Não houve diferença significativa na morfologia da fibra muscular das preparações incubadas com o extrato metanólico quando comparada ao controle (n=5).

## **4.6. Medida da atividade de creatinoquinase**

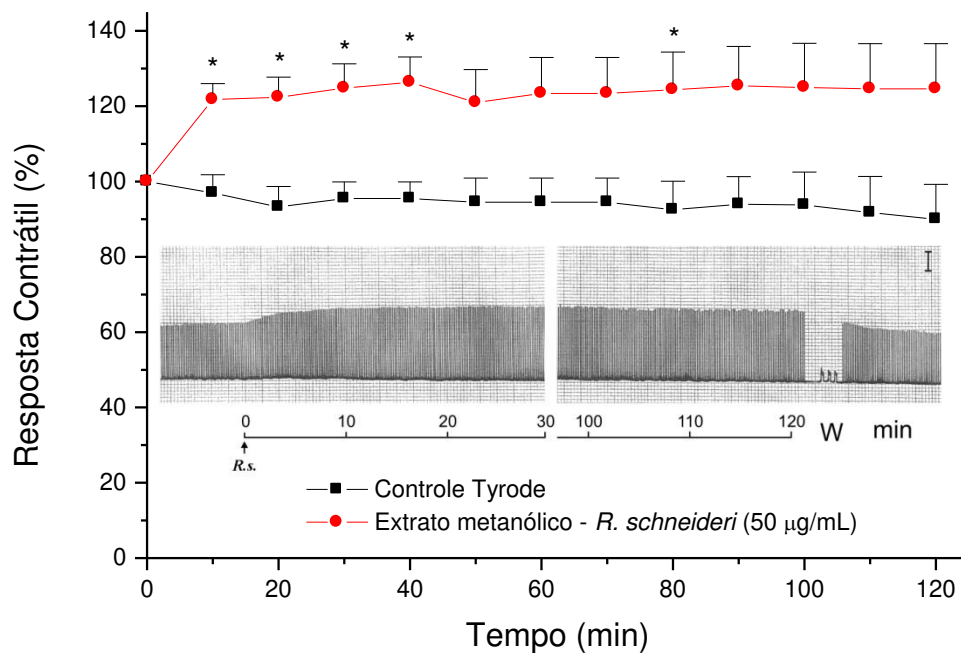
A medida da liberação de creatinoquinase (CK) não se mostrou significativa após 70 min de incubação da preparação com o extrato metanólico (10 µg/mL). Sendo os valores controle Krebs e após o tratamento com o extrato,  $80 \pm 15$  e  $90 \pm 21$  U/L, respectivamente (Fig. 9).



**Figura 9:** Medida da liberação de creatinoquinase em preparações BC incubadas com o extrato metanólico (10 µg/mL). Não houve diferença significativa entre os valores de liberação de CK nas preparações controle e sob tratamento. Os pontos representam a média  $\pm$  erro padrão (n=5).

#### **4.7. Estudo miográfico - Preparação nervo frênico diafragma de camundongo**

As preparações nervo músculo de camundongos foram expostas ao controle Tyrode e ao extrato metanólico do veneno de *Rhinella schneideri*. Nesta preparação o extrato causou somente facilitação da neurotransmissão, sem produzir bloqueio neuromuscular de qualquer intensidade (Fig. 10) ( $p < 0,05$ ).

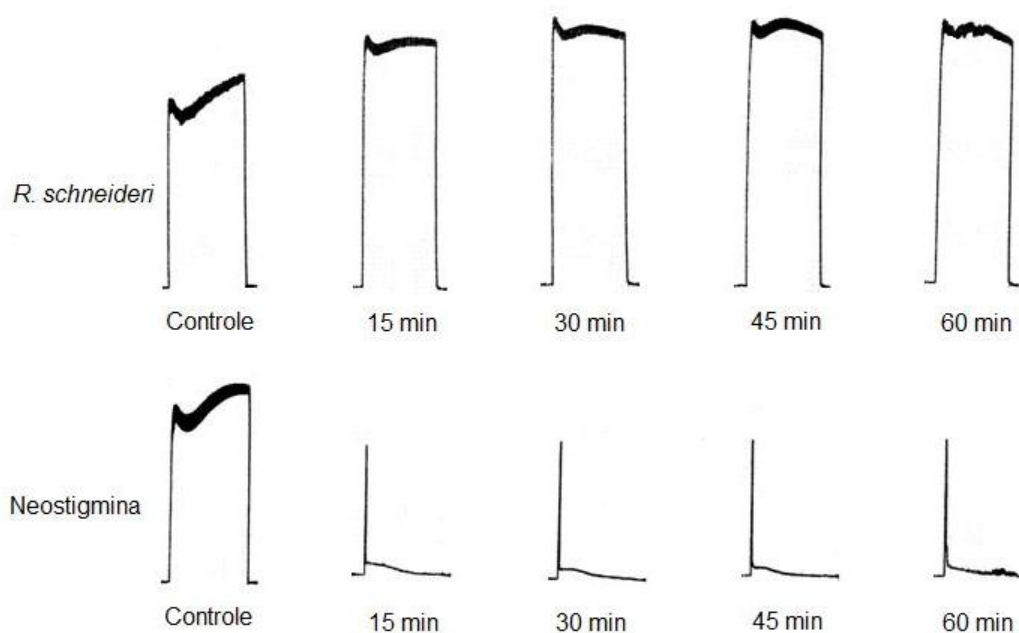


**Figura 10:** Representação gráfica e miografia representativa da preparação NFD de camundongo sob estimulação elétrica indireta, em solução de Tyrode e tratada com o extrato metanólico do veneno de *R. schneideri*. (W) Lavagem. Os pontos representam  $\pm$  erro-padrão do número de experimentos (n=4-6).

#### **4.8. Resposta da preparação nervo frênico diafragma de camundongo ao estímulo tetanizante**

A Figura 11 mostra o perfil das respostas musculares à estimulação tetanizante (70 Hz) de preparações submetidas a diferentes tratamentos, com o extrato metanólico do veneno de *R. schneideri* (50 µg/mL) e neostigmina (1 µg/mL), para analisar o efeito anticolinesterásico do extrato metanólico. Note que as preparações tratadas com o extrato, exibiram um aumento na amplitude da resposta com ausência de 'fade' tetânico. Por outro lado, a neostigmina

desencadeou uma evidente inibição de Wedensky após 15 min da adição da droga, sem afetar as respostas ao estímulo isolado indireto (0,1 Hz).



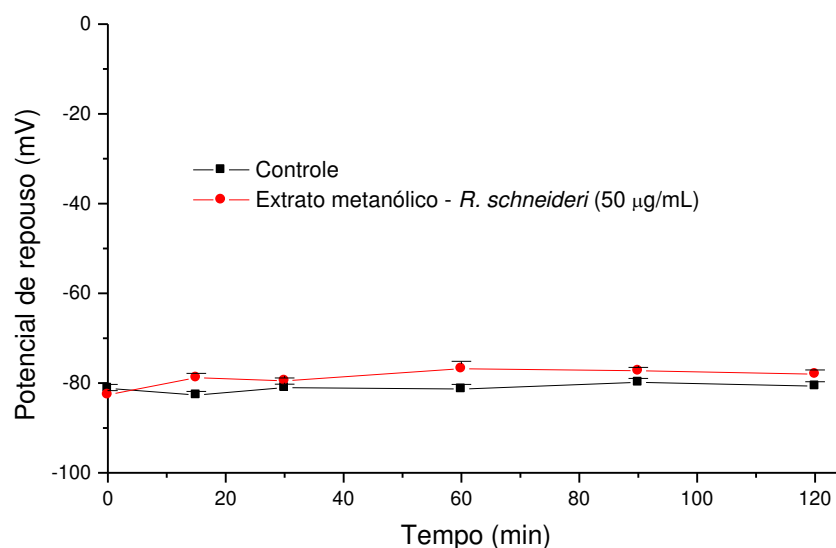
**Figura 11:** Efeitos do extrato metanólico do veneno de *R. schneideri* e neostigmina sobre preparações nervo frênico diafragma de camundongos sob estímulo tetanizante (n=5-6).

#### 4.9. Estudo eletrofisiológico

##### 4.9.1. Potencial de membrana em repouso

A incubação da preparação NFD com o extrato metanólico (50 µg/mL) não alterou o potencial de membrana em repouso, sendo  $81 \pm 0,9$  mV (controle) vs.  $78 \pm 0,9$  mV após 120 min de observação (Fig. 12).

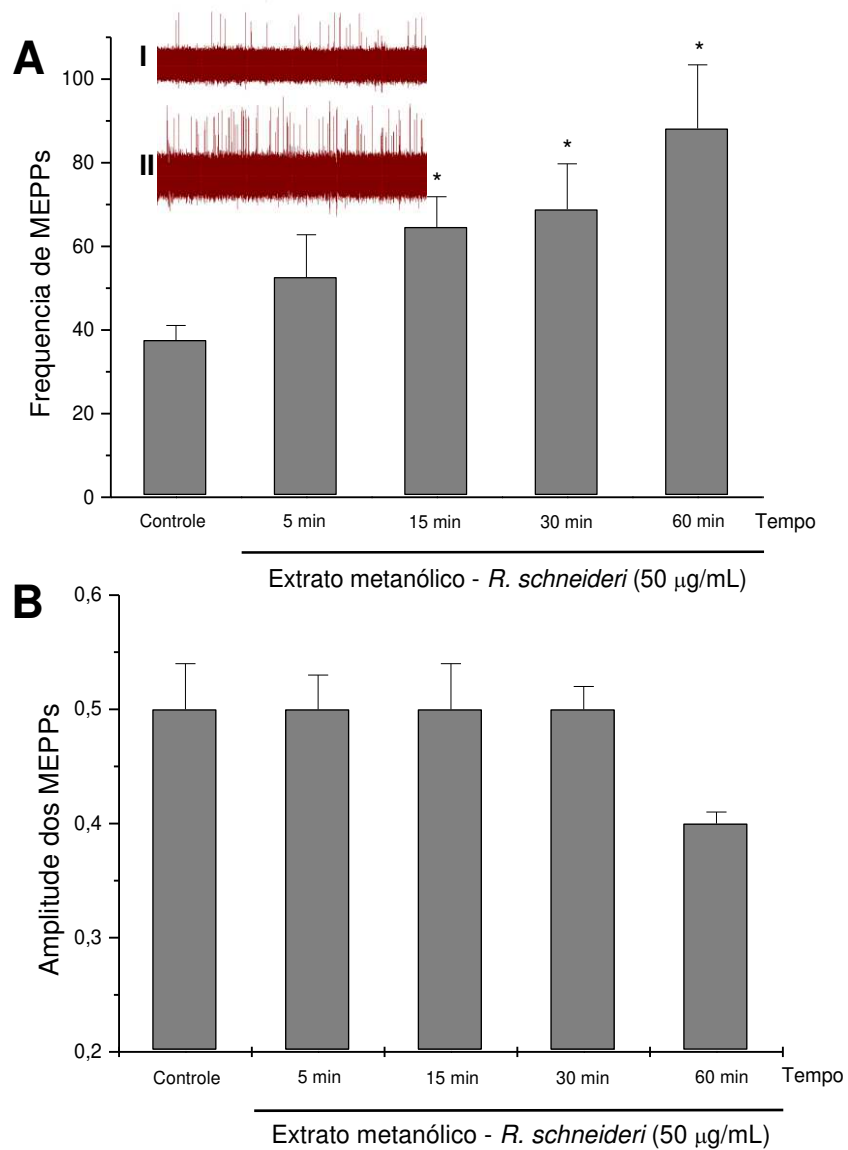




**Figura 12:** Efeito do extrato metanólico sobre o potencial de membrana em repouso da preparação nervo frênico diafragma. Os pontos representam a média  $\pm$  erro padrão (n=5).

#### 4.9.2. Potencial de placa terminal em miniatura (PPTM)

O extrato metanólico (50 µg/mL) aumentou progressiva e significativamente a frequência do potencial de placa terminal em miniatura, de  $38 \pm 3,5$  min (controle) para  $88 \pm 15$ /min após 60 min de incubação (Fig. 13A); sem promover alteração na amplitude dos potenciais em miniatura, como ficou demonstrado pelo registro dos PsPTM através de preparações em que microeletrodos foram inseridos na região da placa motora Fig. 13B).



**Figura 13:** Alterações na frequência (**A**) e amplitude (**B**) do potencial de placa terminal em miniautra (MEPPs) em preparações nervo frênico diafragma de camundongo incubadas com o extrato metanólico (50 µg/mL). Em **AI** e **AII**: registro no tempo zero (0) e após 60 min de incubação com o extrato. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão (n=5). \* $p < 0.05$  comparado ao controle.

#### 4.9.3. Medida do conteúdo quântico

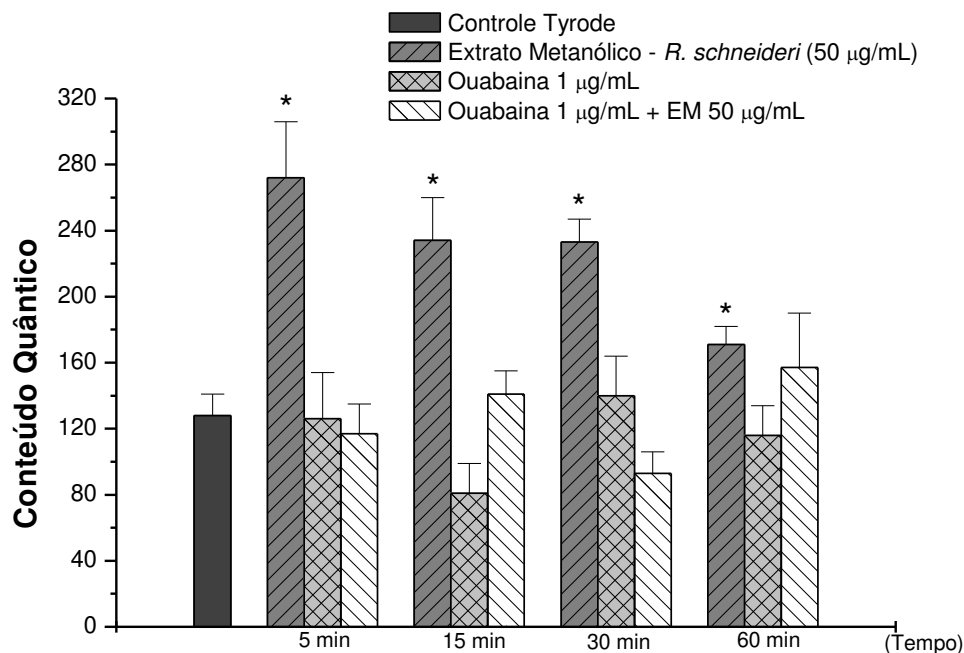
Preparações NFD incubadas com o extrato metanólico (50 µg/mL) aumentaram em um aumento significativamente nos valores do conteúdo quântico após 5 min de incubação, seguido de uma diminuição destes valores, mas mantendo-se ainda significativo após 60 min de observação. Os valores da medida do conteúdo quântico foram  $128 \pm 13$  em preparações controle e de  $272 \pm 34$  e  $171 \pm 11$  após 5 min e 60 min, respectivamente (Tabela 1) (Fig. 14).

A pré-incubação da preparação NFD com ouabaína (1 µg/mL), um inibidor da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, por 5 min, foi capaz de inibir o aumento do conteúdo quântico induzido pelo extrato metanólico. Assim, sendo para preparações ouabaína-controle e ouabaína-tratada incubadas com o extrato metanólico por 5 min e 60 min, foram obtidos valores de conteúdo quântico de  $117 \pm 18$  e  $154 \pm 33$ , respectivamente (Fig. 14) (Tabela 1).

Tabela 1: Medida do conteúdo quântico em preparações incubadas com o extrato metanólico (50 µg/mL)

	EM	Ouabaína	EM + Ouabaína
<b>Controle</b>	128±13	154±23	
<b>5 min</b>	272±34*	126±28	117±18
<b>15 min</b>	234±26*	81±18	141±14
<b>30 min</b>	233±14*	140±24	93±13
<b>60 min</b>	171±11*	116±18	154±33

\*p<0,05 em relação ao controle



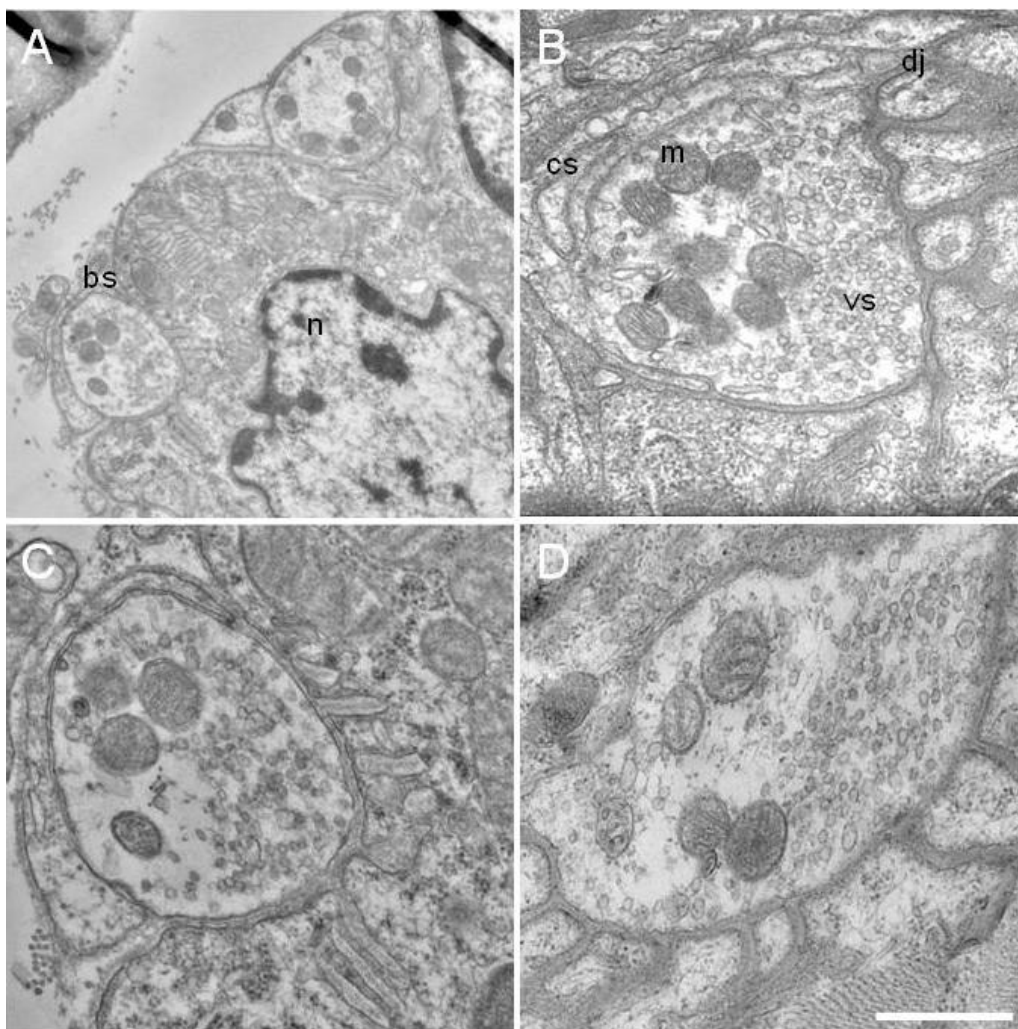
**Figura 14:** Alterações no valor do conteúdo quântico (potencial de placa terminal) de preparações nervo frênico diafragma tratadas com o extrato metanólico do veneno de *R. schneideri* (50 µg/mL) por 60 min e o efeito do pré-tratamento com ouabaína (1 µg/mL). as colunas representam média  $\pm$  S.E.M. (n=5). \* $p < 0.05$  comparado com preparações controle.

#### 4.10. Microscopia eletrônica de transmissão

A Figura 15 mostra a micrografia de um terminal nervoso da junção neuromuscular, no músculo diafragma de camundongo. O músculo foi tratado com 50 µg/mL e foi observado no tempo de 5 min e 60 min de incubação.

Analisando-se qualitativa e quantitativamente, pode-se observar que após 5 min de incubação o extrato metanólico induziu a uma diminuição na quantidade de

vesículas sinápticas no botão terminal, e que esse efeito foi reversível após 60 min de incubação, demonstrando uma quantidade de vesículas sinápticas similar ao grupo controle (Tabela 2).



**Figura 15:** Micrografia do botão sináptico da junção neuromuscular de diafragma de camundongo. O músculo diafragma foi tratado com 50 µg/mL do extrato metanólico e observado nos tempos de 5 e 60 min de incubação. (A) botões sinápticos na fibra muscular, (B) controle, (C) 5 min de incubação e (D) 60 min de incubação (bs, botão sináptico; n, núcleo; cs, célula de Schwann; m, mitocôndria; vs, vesícula sináptica; dj, dobra juncional) (Barra= 500 nm).

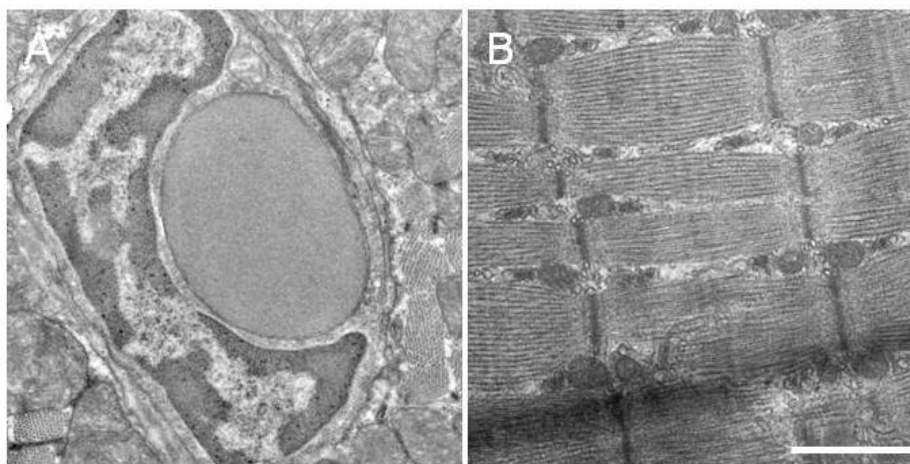
Tabela 2: Efeito do extrato metanólico (50 µg/mL) sobre a morfologia do terminal

nervoso

	<b>Número de vesículas sinápticas por botão terminal</b>	<b>%</b>
<b>Controle</b>	103±11	100%
<b>5 min</b>	74±4*	32±5%*
<b>60 min</b>	121±3	17±3%

\*p<0,05 em relação ao controle

Não foi observado alteração no vaso sanguíneo e nas fibras musculares do músculo diafragma de camundongo, após 60 min de incubação com o extrato metanólico (50 µg/mL) (Fig. 16).

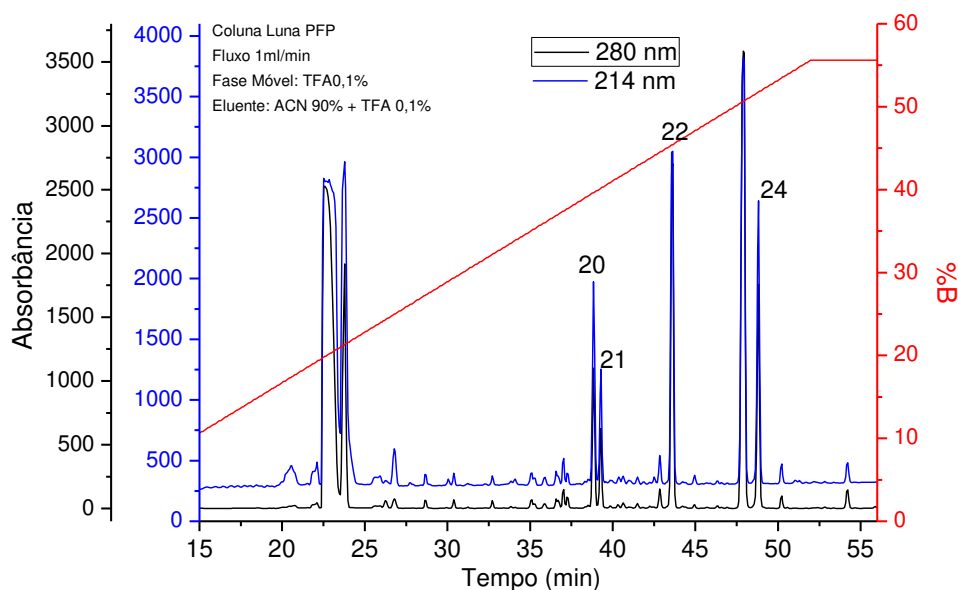


**Figura 16:** Atividade do extrato metanólico após 60 min de incubação. (A) vaso sanguíneo e (B) músculo esquelético. (Barra= 500 nm).

#### 4.11. Estudo bioquímico

##### 4.11.1. Purificação do extrato metanólico do veneno de *Rhinella schneideri*

A purificação do veneno de *R. schneideri* foi feita submetendo o extrato metanólico à cromatografia de fase reversa com coluna Phenomenex Luna PFP. Desta cromatografia resultaram-se sete picos majoritários e dezenove secundários (Figura 17). As subfrações 20, 21, 22 e 24 demonstraram ser ativas na preparação farmacológica e foram testadas, conforme a seguir.

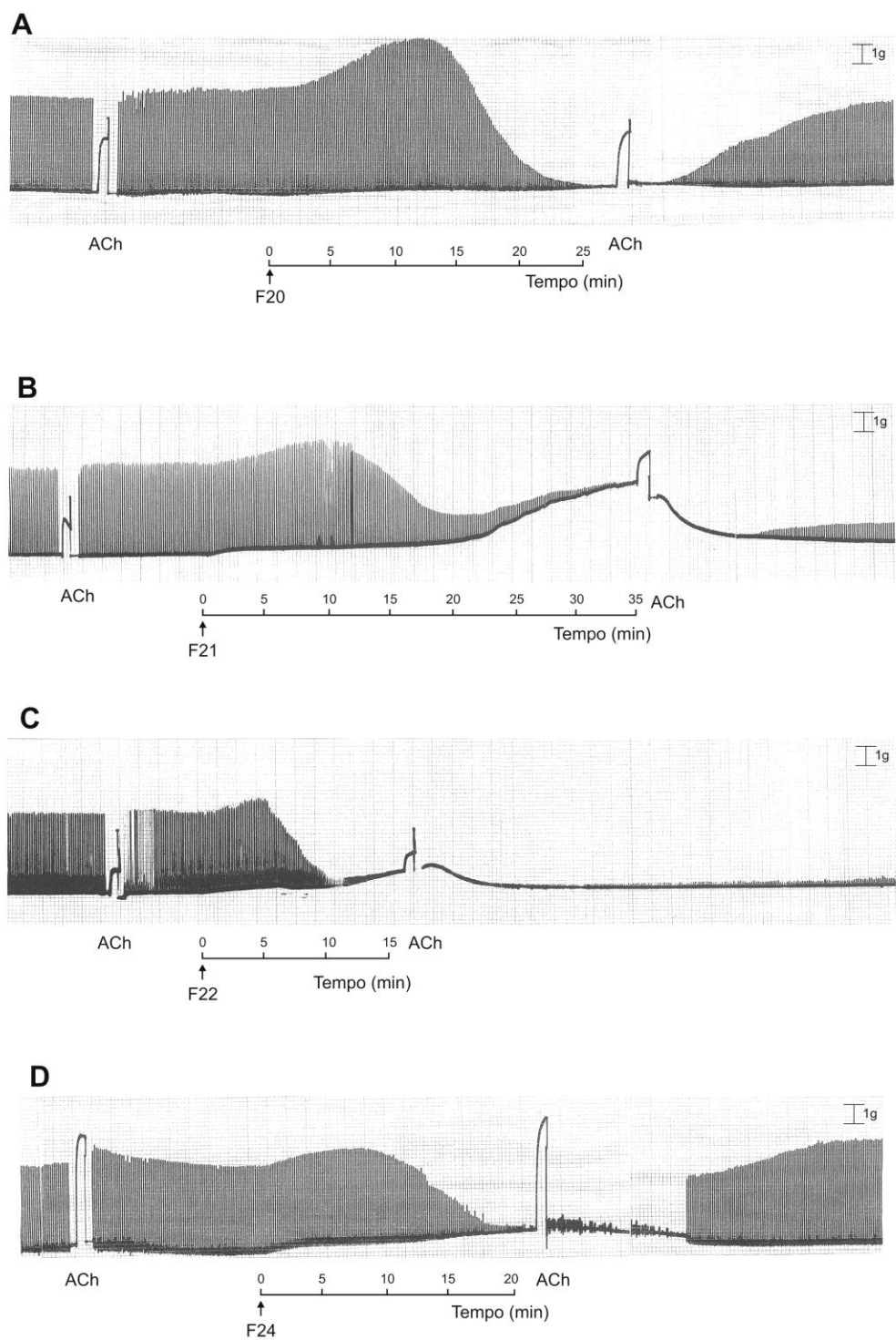


**Figura 17:** Cromatografia de fase reversa para purificação das frações ativas do extrato metanólico do veneno de *Rhinella schneideri*. Coluna Phenomenex Luna PFP; Fase móvel: Solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% + acetonitrila (ACN) 10%; Eluente: ACN 90% + TFA 0,1%. O cromatograma corresponde à injeção de 1mg do veneno. As frações foram colhidas manualmente.

#### **4.11.2. Atividade neuromuscular das frações ativas**

A preparação biventer cervicis de pintainho quando incubada com as frações F20, F21, F22 e F24 provenientes do fracionamento do extrato metanólico do veneno de *R. schneideri*, apresentaram facilitação seguido de total bloqueio neuromuscular reversível em 25 min, 35 min, 15 min e 20 min, respectivamente, sem afetar as respostas contraturantes à acetilcolina (Fig. 18).





**Figura 18:** Registro miográfico de preparações biventer cervicis de pintainho estimuladas indiretamente. As preparações foram tratadas com as frações ativas F20 (A), F21 (B), F22

#### 4.11.3. Espectrometria de massa das frações 20 e 22

65

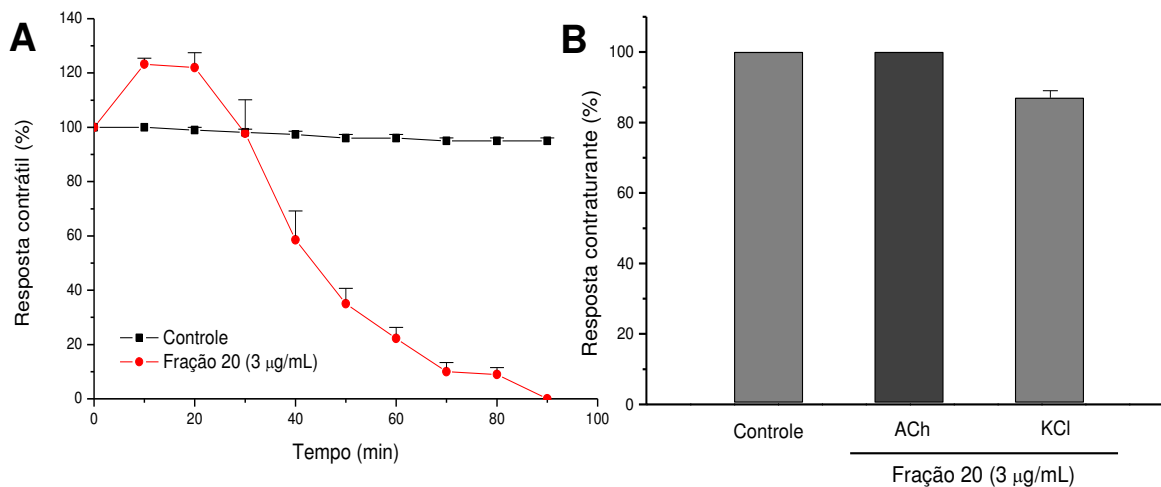
#### **4.12. Atividade neuromuscular da fração 20**

##### **4.12.1. Atividade neuromuscular em preparação biventer cervicis de pintainho**

A dificuldade em se trabalhar com essa fração 20 foi devido ao baixo rendimento após o processo de purificação. Foram utilizados 3 mg do extrato metanólico que resultou em 360 µg de fração que foi testada nas preparações neuromusculares.

A fração 20 (3 µg/mL) apresentou efeito facilitador da neurotransmissão seguido de total bloqueio neuromuscular em 90 min na preparação biventer cervicis de pintainho. Resultado similar foi observado quando comparado à preparação tratada com o extrato metanólico do veneno (10 µg/mL) que exibiu bloqueio total em 80 min (Fig 20 A).

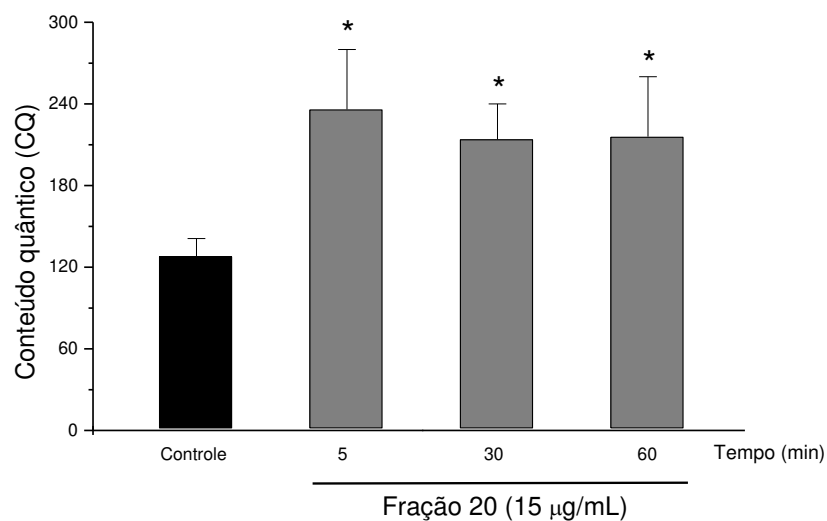
Nos ensaios, utilizando ainda a preparação biventer cervicis de pintainho, a fração 20 não alterou as respostas contraturantes à ACh e KCl (Fig. 20 B). Comportamento farmacológico característico de substâncias que causam bloqueio neuromuscular por interferir pré-sinápticamente na liberação do neurotransmissor.



**Figura 20:** (A) Resposta neuromuscular da preparação BC de pintainho sob estimulação elétrica indireta. (B) Resposta contraturante da preparação BC de pintainho sob exposição exógena de ACh e KCl. Os pontos representam  $\pm$  erro-padrão do número de experimentos. ( $n=4$ ),  $p < 0,05$ .

#### 4.12.2. Efeito da fração 20 sobre a medida do conteúdo quântico

A incubação da preparação nervo frênico diafragma de camundongo com a fração 20 (15 µg/mL) resultou em um aumento significativo do valor do conteúdo quântico em apenas 5 min de incubação; efeito que foi mantido mesmo após 60 min de incubação (Fig. 21) (Tabela 3).



**Figura 21:** Alterações no valor do conteúdo quântico (potencial de placa terminal) de preparações nervo frênico diafragma incubadas com a fração 20 (15 µg/mL) proveniente da purificação do extrato metanólico do veneno de *R. schneideri*. As colunas representam média ± S.E.M. (n=4).  $p < 0,05$ .

Tabela 3: Efeito da fração 20 (15 µg/mL) sobre a medida do conteúdo quântico

Conteúdo Quântico	
Controle	128±13
5 min	234±44*
30 min	214±26*
60 min	216±44*

\* $p < 0,05$  em relação ao controle

## *DISCUSSÃO*

## 5. DISCUSSÃO

Veneno de sapo (*Rhinella* ssp.) contém aminas biogênicas, peptídeos, esteróides e alcalóides esteroidais com uma variedade de atividades biológicas, incluindo cardiotoxicidade, miotoxicidade, neurotoxicidade, vasoconstrição, e também possui um dos mais potentes alucinógenos conhecido, 0-metilbufotenina (Daly e Wiktop, 1966).

Os resultados descritos aqui mostram claramente que o extrato metanólico do veneno de *R. schneideri* contém substâncias que são capazes de afetar a neurotransmissão, em preparações neuromusculares de ave e de mamífero.

Em preparação biventer cervicis de pintainho, o extrato metanólico (3 – 30 µg/ml) causou bloqueio neuromuscular que se mostrou concentração dependente, precedido por uma facilitação significativa da neurotransmissão na concentração de 10 µg/ml. Uma facilitação transitória foi observada com a concentração de 3 µg/ml sem apresentar um efeito bloqueador significativo; nenhuma facilitação foi observada com a concentração de 30 µg/ml, provavelmente porque o bloqueio neuromuscular se estabeleceu muito rapidamente mascarando de algum modo esse efeito.

Facilitação em preparações neuromusculares geralmente refletem um aumento de ACh no sítio pré-sináptico, que explicam o aumento na liberação do neurotransmisso. Bloqueio neuromuscular precedido por facilitação é comumente observado com venenos e/ou toxinas pré-sinápticas, como por exemplo, β-bungarotoxina, notexina (Su e Chang, 1984) e crotoxina (Hawgood e Smith, 1989).

O bloqueio aqui observado foi bifásico, com um aumento da resposta contrátil seguido por completo bloqueio neuromuscular não reversível após várias lavagens da preparação; esse efeito bifásico não foi acompanhado pela alteração nas respostas contraturantes à ACh e ao KCl. Estes achados indicam que o extrato metanólico não possui efeito inibitório sobre os receptores nicotínicos sub-sinápticos e também não interfere com o mecanismo de contratura muscular. O bloqueio neuromuscular com essas características tem sido atribuído a uma ação pré-sináptica (Harvey et al, 1994; Lewis e Gutman, 2004).

Os dados encontrados como a ausência da resposta contraturante ao KCl foram corroborados pela análise morfológica e medida da liberação de creatinoquinase, que não apresentaram efeito significativo sobre o músculo biventer cervicis de pintainho.

Quando a preparação BC foi pré-tratada com maior quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  (3,6 mM) e 3,4-diaminopiridina (10  $\mu\text{g/ml}$ ), observou-se um retardo no bloqueio neuromuscular quando comparado com a atividade do extrato metanólico em solução de Krebs normal ( $\text{Ca}^{2+}$  1,8 mM). O cálcio é necessário para a exocitose de ACh do terminal nervoso, no acoplamento excitação-contração muscular e é bombeado ativamente de volta ao RS, provocando o relaxamento muscular; e quando em maior quantidade na solução nutritiva, é suficiente para interferir na atividade neuromuscular induzida pelo extrato metanólico. A 3,4-diaminopiridina, além de provocar o retardo no bloqueio neuromuscular induzido pelo extrato metanólico, foi capaz de reverter a resposta contrátil em mais de 30% quando a droga foi administrada após o bloqueio neuromuscular; efeito semelhante não foi observado quando nas mesmas condições experimentais foi adicionado ao banho



um anticolinesterásico, a neostigmina. A 3,4-diaminopiridina causa aumento na liberação do neurotransmissor pelo aumento da duração do potencial de ação devido ao bloqueio do canal de potássio (Schauf et al., 1976; Yeh et al., 1976), e consequentemente, pelo maior influxo de íons cálcio durante a despolarização da membrana do terminal nervoso, muito maior do que aquele que normalmente ocorre (Illes e Thesleff, 1978). Assim, esses protocolos usando seja a 3,4-DAP como instrumento farmacológico, seja aumentando a concentração fisiológica de  $\text{Ca}^{2+}$ , interferiram com o equilíbrio iônico na placa motora reforçando a sugestão de uma ação pré-sináptica pelo extrato metanólico.

Mantendo-se a preparação BC em baixa temperatura, 22° C, impediu-se o bloqueio neuromuscular produzido pelo extrato metanólico, corroborando com os achados de outros pesquisadores que estudaram toxinas pré-sinápticas que se mostraram sensíveis à redução da temperatura no banho. Cogo et al. (1998) isolaram uma fração do veneno de *B. insularis* que produzia bloqueio neuromuscular por atuar no sítio pré-sináptico, cujo bloqueio se mostrou dependente da temperatura. Outras toxinas pré-sinápticas como a  $\beta$ -bungarotoxina, crotoxina e taipoxina que também apresentam atividade neuromuscular pré-sináptica, tiveram sua atividade reduzida em mais de 70% quando a temperatura foi reduzida para 27° C (Su e Chang, 1984). Embora as moléculas presentes nos venenos de sapo não apresentem atividade fosfolipásica, é possível que este protocolo usando baixa temperatura, seja mais um método para auxiliar na determinação de uma atividade pré-sináptica, e não apenas para demonstrar se há ou não atividade catalítica, como tem sido usualmente feito.

Os experimentos usando d-Tc, que tem a capacidade de bloquear as respostas pré e pós-sinápticas do receptor nicotínico para ACh exógena (Webb e Bowman, 1974), mostrou que o extrato metanólico aboliu o retorno da resposta contrátil que é normalmente observado com d-Tc sozinha após lavagem, sem afetar as respostas contraturantes à ACh e KCl (compare Figura 6B com 6A). Estes achados indicam que o extrato metanólico não afetou os receptores nicotínicos pós-sinápticos ou a excitabilidade do músculo desde que as respostas à ACh e KCl, respectivamente, foram preservadas. Consequentemente, a ação pré-sináptica deve ter sido a responsável pela perda da resposta contrátil. A observação de que as respostas contraturantes à ACh e KCl, ambos com respostas pós-sinápticas, não foram alteradas pelo extrato metanólico, indica que o bloqueio não envolveu potencial de ação muscular.

Em preparação nervo frênico diafragma de camundongo, o extrato metanólico produziu uma facilitação que aparentemente foi sustentada pela liberação do neurotransmissor ACh. Assim, a contração tetânica, gerada à alta frequência (70 Hz), pode corroborar com esses achados por apresentar uma contração mantida durante o período de estimulação tetânica; enquanto que na presença do anticolinesterásico, neostigmina, a resposta tetânica não foi sustentada, provavelmente pela dessensibilização do receptor nicotínico pós-sináptico por conta do excesso de acetilcolina atuando por um tempo prolongado, instalando-se desta forma, o fenômeno de inibição de Wedensky (Chang et al., 1986; Bowman, 1990).

O fenômeno de facilitação da neurotransmissão também foi identificado pela medida na frequência dos PsPTM; o aumento na frequência dos PsPTM,

após tratamento da preparação com toxinas, geralmente é associado a um efeito facilitatório na transmissão neuromuscular (Lundh et al., 1977; Rodrigues-Simioni et al., 1997). Em contraste, variações (aumento e diminuição) na amplitude do PPTM, tais como ocorre após o uso de curare e drogas anticolinesterásicas, são indicativas de ação pós-sináptica (Fatt and Katz, 1951); assim, a ausência de tais efeitos em preparações NFD incubadas com o extrato metanólico, ou seja, aumento ou redução na amplitude dos PsPTM, sugere que a ação pós-sináptica não esteve envolvida.

Evidências que reforçam a hipótese de uma ação do extrato metanólico pré-sináptica foram marcadas pelo aumento no conteúdo quântico após 5 min da adição do extrato metanólico nas preparações NFD. Dal Belo et al. (2004) observaram um aumento similar no conteúdo quântico de preparações NFD após 10 min de incubação com MiDCA1, uma toxina isolada do veneno de coral (*Micrurus dumerilli carinicauda*), e concluíram que uma ação pré-sináptica estava envolvida.

Os resultados apresentados pela microscopia eletrônica de transmissão, também confirmaram que o extrato metanólico do veneno de *R. schneideri* atua sobre a neurotransmissão, mais especificamente provocando uma diminuição na quantidade de vesículas sinápticas no terminal nervoso, após 5 min de incubação, sem provocar alterações na membrana pré e pós-sináptica, e também nas mitocôndrias. A batracotoxina, principal neurotoxina encontrada no veneno de rãs da família Dendrobatidae, é capaz de induzir bloqueio neuromuscular e despolarização da membrana da fibra muscular, provocando um aumento no tamanho do terminal nervoso, assim como a deformação e escurecimento das

vesículas sinápticas e mitocôndrias (Albuquerque et al., 1971). Embora sapos e rãs sejam batráquios, seus venenos apresentam efeitos diferentes sobre a junção neuromuscular. Desta forma, ao contrário da batracotoxina, o extrato metanólico não despolariza a membrana muscular e nem provocou alteração na morfologia do botão sináptico, a não ser sobre a população de vesículas sinápticas.

Os venenos de sapo são conhecidos como digoxina-like, e os animais envenenados podem apresentar sinais e sintomas ditos falso positivo para digoxina. Desta forma, a digoxina, um glicosídeo cardíaco, e ouabaína, um esteróide cardiotônico similar à digoxina, potencializam as contrações cardíacas por inibir a bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  nos cardiomiócitos, gerando um acúmulo de cálcio intracelular como resultado do bloqueio indireto do sistema de troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Quando a digoxina foi utilizada em baixas concentrações, foi demonstrado ser capaz de desencadear um efeito facilitador na liberação espontânea e evocada de ACh, levando ao aumento da frequência dos PsPTM e conteúdo quântico (Haimann et al., 1985; Balezina e Lapteva, 2007). Portanto, o efeito do extrato metanólico sobre a preparação NFD, deve estar associado à uma ação sobre a bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , pois o tratamento de preparações com ouabaína, um inibidor específico da bomba, impediu o aumento da liberação de acetilcolina, medido pelo aumento no valor do conteúdo quântico, pela adição do extrato metanólico em preparações nervo frênico diafragma de camundongo. Estudos anteriores demonstraram que a liberação quantal do neurotransmissor no terminal nervoso pode ser controlado pelo mecanismo sensível à ouabaína e que não está diretamente ligado à função da bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (Nikol'skii et al., 1989); por outro lado, a  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  neuronal sensível à ouabaína

aparentemente tem um papel importante na modulação e frequência da liberação quântica do neurotransmissor (Maeno et al., 1995). Nossos resultados mostraram que o efeito pré-sináptico do extrato foi inibido por uma concentração não tóxica de ouabaína (1  $\mu$ M). Enquanto esses achados sugerem o envolvimento da bomba de  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase na ação pré-sináptica do extrato metanólico, o protocolo experimental usado não exclui a possibilidade de uma interação não específica entre ouabaína e os componentes do extrato metanólico.

O papel preciso da bomba de  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase na modulação das funções pré-sinápticas ainda não está bem definida, embora Krivoi (2002) tenha sugerido que a ativação da bomba de  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  eletrogênica poderia hiperpolarizar o terminal nervoso e desta forma diminuir a repolarização pelas correntes de  $\text{K}^+$  e consequentemente inativar os canais de  $\text{Na}^+$ .

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica altamente sofisticada que realiza separações e análises quantitativas com alta resolução e sensibilidade (Lindsay, 1992) de compostos naturais ativos fisiologicamente. A aplicação do fracionamento possibilitou a identificação das frações ativas capazes de produzir o principal efeito do extrato metanólico sobre a junção neuromuscular, que é ativação mantida na neurotransmissão em preparação de camundongo e facilitação seguida de bloqueio neuromuscular em preparação de ave, que pode ser interpretada que o efeito sobre a junção neuromuscular está presente em mais de uma fração. Assim, através do estudo de espectrometria de massa, a fração F20 com massa molecular de 730,6 Da, além de ter-se mostrado pura foi capaz de reproduzir os efeitos característicos do extrato metanólico sobre as preparações neuromusculares ensaiadas.

Considerando a importância e a possibilidade de substâncias com ação facilitadora da neurotransmissão serem usadas para a produção de medicamento útil em doenças neuromusculares, pode-se enfatizar a importância prática do isolamento e purificação da F20 para um futuro uso clínico.

Em conjunto, estes resultados indicam que o extrato metanólico do veneno de *Rhinella schneideri* causa bloqueio neuromuscular em ave e facilitação sustentada em mamífero, por interferir com a neurotransmissão sináptica através da ativação da bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  neuronal, sem danificar a musculatura; e que esses efeitos são reproduzidos pela fração ativa isolada.

## *CONCLUSÕES*

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nos permitem concluir que o extrato metanólico do veneno de *Rhinella schneideri* possui compostos que são capazes de interferir com a neurotransmissão, causando:

- Facilitação e bloqueio neuromuscular pré-sináptico em preparações biventer cervicis de pintainho, sem alterar a função da musculatura esquelética;
- Efeito facilitador mantido em preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta e tetanizante;
- Efeito pré-sináptico em preparação de mamífero, via bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, sem alterar a função da musculatura esquelética;
- Diminuição da quantidade de vesículas sinápticas no terminal nervoso em preparações de mamífero;
- A fração 20, que foi isolada do extrato metanólico do veneno de *Rhinella schneideri*, foi suficientemente capaz de reproduzir os efeitos de facilitação e bloqueio neuromuscular em preparação de ave, e facilitação mantida em preparação de mamífero.



## *REFERÊNCIAS*

## 7. REFERÊNCIAS

- Albuquerque EX, Warnick JE, Sansone FM. The pharmacology of batrachotoxin II. Effect on electrical properties of the mammalian nerve and skeletal muscle membranes. *The Journ Pharmacol Experim Therapeutics* 1971; 176, 3, 511-528.
- Almeida PG, Felseburgh FA, Azevedo RA, Brito-Gitirana L. Morphological re-evaluation of the parotoid glands of *Bufo ictericius* (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Contributos to zoology* 2007; 76(3),145-152.
- Banker BQ, Kelly SS, Robbins N. Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *J Physiol* 1983; 339, 355-377.
- Bastos RP, Motta JAO, Lima LP, Guimarães LD. Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, estado de Goiás. 1a edição. Goiânia: R. P. Bastos, 2003; 82p.
- Balarz T, Hang JP, Herman EH. Toxic responses of the cardiovascular system. In: Casarett LJ, Doull J. *Toxicology: The basic science of poisons*. 3 ed. New York: MacMillan 1986; 387-411.
- Balezina OP, Lapteva VI. Digoxin facilitates neuromuscular transmission in mouse diaphragm. *Bull Exp Biol Med* 2007; 144(4):487-90.
- Barstad JA. Presynaptic effect of the neuro-muscular transmitter. *Experientia* 1962; 18, 579-580.
- Bedford PGC. Toad venom toxicity and its clinical occurrence in small animals in the United Kingdom. *Vet Rec* 1974; 94, 613-4.
- Bowman WC. *Pharmacology of neuromuscular function*, 2a Ed. London: Butterworth Scientific, 1990.

- Brownlee AA, Johnson P, Mills IH. Actions of bufalin and cinobufalin, two bufadienolides respectively more active and less active than ouabain, on ouabain binding and <sup>6</sup>Rb uptake by human erythrocytes. Clin Sci 1990; 78, 169-74.
- Brubacher JR, Ravikumar PR, Bania T, Heller MB, Hoffman RS. Treatment of toad venom poisoning with digoxin-specific Fab fragments. Chest 1996; 110:1282-1288.
- Bülbring E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. Brit, J Pharmacol 1946; 1: 38-61.
- Cei JM. Bufo of South America. In: Blair WF. Evolution in the genus Bufo. Dallas: University of Texas Press 1972; 82-92.
- Chang CC, Hong SJ, KO LJ. Mechanisms of the inhibition by neostigmine of titanic contraction in the mouse diaphragm. Br J Pharmacol 1986; 87:757-62.
- Chen KK, Chen AL. Notes on the poisonous secretions of twelve species of toads. J Pharmacol Exp Ther 1933; 47, 281-93.
- Chen KK, Kovarikova A. Pharmacology and toxicology of toad venom. Pharma Sci 1967; 56, 1535-41.
- Cochran DM. Frogs of southeastern Brazil. Bull. U.S. Nat Mus 1955; n. 206, p. 1-423.
- Cogo JC, Prado-Franceschi J, Giglio JR, Corrado AP, Cruz-Höfling MA, Donato JL, et al. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A2 fraction. Toxicon 1998; 36(10):1323-1332.

- Dal Belo CA. Isolamento, purificação e caracterização bioquímica e farmacológica de toxinas do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda*, 2004. 252f; Tese (Doutorado em Farmacologia)- Departamento de Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Daly, J.W., Witkop, B., 1966. The venoms of amphibians. Mem. Inst. Butantan 33, 425-432.
- Duellman WE, Trueb L. Ecology. In: Biology of amphibians. New York: Mac Craw-Hill 1986; 252-60.
- Elmqvist D, Quastel DMJ. A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. J Physiol 1965; 178: 505 – 29.
- Fatt P, Katz B. Analysis of the end-plate potential with an intracellular electrode, J Physiol 1951; 115: 320 – 370.
- Frost DR. Amphibian species of the world: an online reference, versão 5.4. Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/?action=references&id=4084>. Acesso em 02/02/2010.
- Ginsborg BL, Warriner J. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation, Brit J Pharmacol 1960; 15: 410-411.
- Gowda RM, Cohen RA, Khan IA. Toad venom poisoning: resemblance to digoxin toxicity and therapeutic implications. Heart 2003; 89:14.
- Haimann C, Torri-Tarelli F, Fesce R, Ceccarelli B. Measurement of quantal secretion induced by ouabain and its correlation with depletion of synaptic vesicles. J Cell Biol 1985; 101, 1953-1965.

- Harvey AL, Barfaraz A, Thomsom E, Faiz A, Preston, Harris JB. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 1994; 32(3):257-265.
- Hawgood BJ, Smith IC. The importance of phospholipase A2 in the early induction by crotoxin of biphasic changes in endplate potentials at the frog neuromuscular junction. *Toxicon* 1989; 27(2):272-6.
- Hoffman BF, Lefkowitz RJ. Catecolaminas e drogas simpatomiméticas. In: Goodman LS, Gilman A. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 8a edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1991; 123-44.
- Illes P, Thesleff S. 4-Aminopyridine and evoked transmitter release from motor nerve endings. *Br J Pharmacol* 1978; 64:623-629.
- Jared C, Antoniazzi MM, Jordão AEL, Silva JMRC, Greven H, Rodrigues MT. Parotoid gland in toad (*Rhinella Jini*): their structure and functioning in passive defense. *Toxicon* 2009; 54, 197-207.
- Knowles RP. Toad poisoning in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1968; 153, 1202.
- Krivoi II. Mechanisms of the non-neurotransmitter actions of acetylcholine in the neuromuscular apparatus. *Neurosci Behav Physiol* 2002; 32, 149-156.
- Lewis RL, Gutman L. Snake venoms and the neuromuscular junction. *Semin Neurol* 2004; 24, 175-79.
- Lin CS, Lin MC, Chen KS, Liu CB. Effect of Chinese medicine “Kyushin” on serum digoxin concentration measurement in dogs. *Jpn Circ J* 1989; 53:108-12.
- Lindsay S. High performance liquid chromatography. London Thames Polytechnic 1992.

- Lundh H, Schiller HH, Elmqvist D. Correlation between single fibre EMG jitter and endplate potentials studied in mild experimental botulinum poisoning. *Acta Neurol Scand* 1977; 56(2):141-52.
- Lutz A. *Batraciens du Brésil*. Comptes Rendus et Mémoires Hebdomadaires des Séances de la Société de Biologie et des ses Filiales. Paris 93 1925, vol. 2: 211-214.
- Maeno T, Hara N, Enomoto K, Ichinose M, Sawada M. Effects of inhibitors of ouabain-sensitive  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Li}^+$  ions on the neuromuscular transmission of the frog. *Jpn J Physiol* 1995; 45, 397-410.
- Mensah-Dwumah M, Daly JW. Pharmacological activity of alkaloids from poison-dart frogs (Dendrobetidae). *Toxicon* 1978; 16: 189-94.
- Micuda J. Toad poisoning. In: Hoskins HP. *Canine medicine*. Santa Barbara: American Veterinary Publications 1968; 260-1.
- Miranda IM. Principais lagartos, anfíbios e animais aquáticos de interesse médico. In: Soerensen B. *Animais peçonhentos*. 2 ed, Rio de Janeiro: Atheneu, 1990; 85-6.
- Monti R, Cardello L. Bioquímica do veneno de anfíbios. In: Barraviera B. (Ed.) *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: EPUC 1994; 225-32.
- Nikol'skii EE, Bukharaeva ÉA, Badrutdinov LR. The effects of carbachol on the spontaneous quantum secretion of mediator from motor nerve endings in the frog in the presence of ouabain and in potassium-free medium. *Neirofiziologiya* 1989; 21, 558-561.

- Oehme FW, Brown JF, Fowler ME. Toxins of animal origin. In: Casarett LJ, Doull. Toxicology: the basic science of poisons. 2 ed. New York: MacMillan 1980; 557-77.
- Otani A, Palumbo NE, Read G. Pharmacodynamics and treatment of mammals poisoned by *Bufo marinus* toxin. Am J Vet Res 1969; 60: 1865-72.
- Palumbo NE, Perry S, Read G. Experimental induction and treatment of toad poisoning in the dog. J Am Vet Med Assoc 1975; 167: 1000-5.
- Prior C, Dempster J, Marshall G. Electrophysiological analysis of transmission at the skeletal neuromuscular junction. J Pharmacol Toxicol Methods 1993; 30:1-17.
- Riet FB. Consideraciones sobre la farmacología y toxicología Del veneno de *Bufo paracnemis* Lutz. Anales de La Facultad de Veterinaria Del Uruguay 1966; 11:17-29.
- Rodrigues-Simioni, L., Silva-Carvalho, I., Heluany, N.F., Leite, G.B., Prado-Franceschi, J., Cruz-Höfling, M.A., Ballejo, G., Corrado, A.P. Novel effects of guanidine on the neuromuscular junction. Gen. Pharmacol 1997;28:599-605.
- Russel FE. Toad poisoning. In: HOSKINS, HP. Canine medicine. 4<sup>a</sup> ed. Santa Bárbara: American Veterinary Publications Incorporation 1979; 1:183-5.
- Shauf CL, Colton CA, Colton JS, Davis FA. Aminopyridine and sparteine as inhibitors of membrane potassium conductance: effects on myxicola giant axons and the lobster neuromuscular junction. J Pharmacol Exper Therap 1976; 197:414-425.


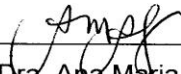
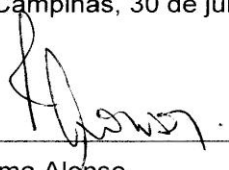
- Su NJ, Chang CC. Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A2 activity ( $\beta$ -bungarotoxin, taipoxin, crotoxin). *Toxicon* 1984; 22(4):631-640.
- Toledo RC. Breve apreciação sobre a secreção cutânea dos anfíbios. *Ciênc Cult São Paulo* 1984; 38:279-84.
- .Webb SN, Bowman WC. The role of pre- and post-junctional cholinceptors in the action of neostigmine at the neuromuscular junction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1974; 123-134.
- Werner. *Herpetologische Nova*. *Zoologischer Anzeiger* 1894; 17: 410-415.
- Yeh JZ, Oxford GS, Wu CH, Narahashi T. Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane. *J Gen Physiol* 1976; 68:519-535
- Zelnik R, Ziti LM, Guimarães CV. A chromatographic study of the bufadienolides isolated from the venom of the parotid glands of *Bufo paracnemis*. *J Chromatogr* 1964; 15:9-14.
- Zelnik R. A natureza química do veneno de sapo. *Ciênc Cult São Paulo* 1965; 17, 10-4.



***ANEXOS***

## 8. ANEXOS

### 8.1. Certificado do Comitê de Ética para o Uso de Animais

 UNICAMP	 CEEA/Unicamp
<p style="text-align: center;"><b>Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp</b></p>	
<p style="text-align: center;"><b>CERTIFICADO</b></p>	
<p>Certificamos que o Protocolo nº <b>1552-1</b>, sobre "<b><u>Estudo dos efeitos do veneno de <i>Chaunus schneideri</i> sobre preparações neuromusculares e átrio direito isolado de rato</u></b>", sob a responsabilidade de <b><u>Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni / Sandro Rostelato Ferreira</u></b>, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em <b><u>30 de junho de 2008</u></b>.</p>	
<p style="text-align: center;"><b>C E R T I F I C A T E</b></p>	
<p>We certify that the protocol nº <b>1552-1</b>, entitled "<b><u>Study of <i>Chaunus schneideri</i> venom effects on neuromuscular preparation and rat isolated right atria</u></b>", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on <b><u>June 30, 2008</u></b>.</p>	
<p style="text-align: right;">Campinas, 30 de junho de 2008.</p>	
 _____ Profa. Dra. Ana Maria Gáraldo Presidente	 _____ Fátima Alonso Secretária Executiva
CEEA – Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil	Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: <a href="mailto:comisib@unicamp.br">comisib@unicamp.br</a> <a href="http://www.ib.unicamp.br/ceea/">http://www.ib.unicamp.br/ceea/</a>

## 8.2. Artigo publicado em periódico



ISSN: 2044-0324

J Venom Res, 2011, Vol 2, 32-36

### RESEARCH REPORT

## Presynaptic effect of a methanolic extract of toad (*Rhinella schneideri*) poison in avian neuromuscular preparation

Sandro Rostelato-Ferreira<sup>a</sup>, Cháriston A Dal Belo<sup>b</sup>, Maria Alice da Cruz-Höfling<sup>c</sup>, Stephen Hyslop<sup>a</sup> and Léa Rodrigues-Simioni<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6111, 13083-970, Campinas, SP, Brazil, <sup>b</sup>Centro de Ciências Rurais de São Gabriel, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), São Gabriel, RS, Brazil, <sup>c</sup>Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

\*Correspondence to: Léa Rodrigues-Simioni, Email: [simioni@unicamp.br](mailto:simioni@unicamp.br) (LRS), [sandrorostelato@yahoo.com.br](mailto:sandrorostelato@yahoo.com.br) (SRF), Tel: +55 19 35219533, FAX: +55 19 32892968

Received: 27 May 2011; Accepted: 11 September 2011; Published: 22 September 2011

© Copyright The Author(s): Published by Library Publishing Media. This is an open access article, published under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5>). This license permits non-commercial use, distribution and reproduction of the article, provided the original work is appropriately acknowledged with correct citation details.