

JESSICA PEDROSO TEIXEIRA

**Efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas  
do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus*  
sobre astrócitos em cultura**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2012

JESSICA PEDROSO TEIXEIRA

Efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas  
do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus*  
sobre astrócitos em cultura

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Toxinologia do Instituto  
Butantan, para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

Orientadora: Solange Castro Afeche

São Paulo  
2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

Teixeira, Jessica Pedroso  
Efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas do veneno da serpente  
*Micrurus lemniscatus* sobre astrócitos em cultura. Jessica Pedroso Teixeira;  
Solange Castro Afeche. – São Paulo, 2012.  
86.fls. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação  
em Toxinologia, Instituto Butantan, 2012.

1. *Micrurus*. 2. Neurotoxinas. 3. Estresse Oxidativo  
4. Gliotransmissores. 5. Astrócitos. I. Afeche,  
Solange Castro, (orient.). II. Programa de Pós-Graduação em  
Toxinologia. Instituto Butantan. III. Título.

CDD 615.9

## AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Jessica Pedroso Teixeira, autorizo a reproduzir, disponibilizar na rede (Internet) e permitir a reprodução por meio eletrônico, da Tese intitulada “Efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* sobre astrócitos em cultura”, a partir da data de defesa.

---

Aluno(a)

---

Orientador(a)

**POS-GRADUAÇÃO EM TOXINOLOGIA  
INSTITUTO BUTANTAN**

**RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

**MESTRADO**

**NOME DO ALUNO(A):** Jessica Pedroso Teixeira

**DATA DO EXAME:**...../..... /.....

**BANCA EXAMINADORA:** Profs. Drs.

<b>NOME</b>	<b>Assinatura</b>	<b>Aprovado(a)</b>	<b>Reprovado(a)</b>
_____	_____	( )	( )
(Presidente)			
_____	_____	( )	( )
_____	_____	( )	( )

**DECISÃO FINAL: APROVADO(A) ( )      REPROVADO(A) ( )**

***Comentários da Banca (opcional):***



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

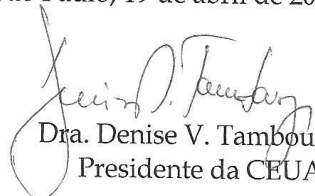
## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos oxidativos induzidos por neurotoxinas do veneno de *Micrurus lemniscatus* e o papel protetor da melatonina" **protocolo n° 813/11**, sob a responsabilidade de Solange Castro Afeche e Jessica Pedroso Teixeira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 18/04/2011.

We certify that the research entitled "Oxidative effects induced by *Micrurus lemniscatus* toxins and the melatonin protection", **protocol n° 813/11**, under the responsibility of Solange Castro Afeche and Jessica Pedroso Teixeira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 04/18/2011.

<b>Vigência do Projeto:</b> 04/2011 – 12/2013 Laboratório de Farmacologia	<b>N° de animais/espécie</b> 680 ratos Wistar
---	--

São Paulo, 19 de abril de 2011.

  
Dra. Denise V. Tambourgi  
Presidente da CEUAIB



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO OCEANOGRÁFICO**

O DIRETOR DO INSTITUTO OCEANOGRÁFICO  
NOS TERMOS DO ARTIGO 74, PARÁGRAFO ÚNICO,  
INCISO 5, ALÍNEA "B", DO  
ESTATUTO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,  
CERTIFICA QUE

**JESSICA PEDROSO TEIXEIRA**



DE NACIONALIDADE BRASILEIRA,  
PORTADORA DA CÉDULA DE IDENTIDADE  
RG Nº 43.761.014-7 SP,  
NASCIDA EM 8 DE MAIO DE 1985  
E NATURAL DOS ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA,  
CONCLUIU O



**CURSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA NA  
MODALIDADE DE ATUALIZAÇÃO:  
PROTEÇÃO RADIOLÓGICA COM ÊNFASE NO USO, PREPARO E  
MANUSEIO DE FONTES RADIOATIVAS NÃO SELADAS.**

E, PARA QUE POSSA GOZAR DE TODOS OS  
DIREITOS E PRERROGATIVAS LEGAIS,  
OUTORGA-LHE O PRESENTE CERTIFICADO.

SÃO PAULO, 24 DE MAIO DE 2011.

PRESIDENTE DA COMISSÃO  
DE CULTURA E EXTENSÃO  
UNIVERSITÁRIA

PROFA. DRA. ELISABETE DE  
SANTIS BRAGA DA GRAÇA

**IO**  
Instituto  
Oceanográfico

DIRETOR  
MICHEL MICHAELOVITCH DE  
MAHIQUES

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra Solange Castro Afeche, do laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan pela oportunidade e dedicação.

À todos do laboratório que ajudaram diretamente ou indiretamente neste trabalho, Luna, Lívia, Mari, Janaína e em especial ao Eduardo Frare.

À Dra Maria Regina Lopes Sandoval e seus alunos pela colaboração e parceria, em especial Nathalia Carvalho pela ajuda na microscopia de fluorescência confocal.

Ao Dr. Fernando Abdalla e seus alunos em especial o Thiago Oliveira pela ajuda na padronização do binding em membrana de astrócitos.

À Prof. Tânia Marcourakis ao Rafael Caio pela ajuda nas dosagens da enzimas antioxidantes.

Ao Prof. Dr. Rui Curi do ICB e sua aluna Amanda Crisma pela colaboração e ajuda na citometria de fluxo.

Ao Dr. Ivo Lebrun e sua aluna Aline pela colaboração e contribuição nas dosagens do glutamato.

À Cristina Maria Fernandes pela colaboração e contribuição nas dosagens do TNF-alfa.

À Elisa, Leo e ao Jorge pela ajuda e contribuição!

À todos os estudantes, pesquisadores e funcionários do Instituto Butantan!

À toda minha família e amigos que me acompanharam e me apoiaram nessa etapa!!



*"Miseráveis mortais, abri os olhos..."*  
Leonardo Da Vinci

## RESUMO

Efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* sobre astrócitos em cultura. 2012. 86f. Dissertação (Toxinologia). Instituto Butantan. São Paulo, 2012.

As manifestações clínicas predominantes no envenenamento pelo veneno elapídico são relacionadas com suas ações neurotóxicas e miotóxicas, causando bloqueio da transmissão nervosa periférica. As neurotoxinas fosfolipásicas constituem-se em um componente importante do veneno e induzem morte celular em neurônios hipocâmpais em cultura. Células da glia, em particular os astrócitos, liberam fatores tróficos e transmissores, participando do desenvolvimento neuronal e das sinapses. Neste trabalho foram investigados os efeitos das toxinas fosfolipásicas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas do veneno da serpente coral *Micrurus lemniscatus* sobre a viabilidade dos astrócitos em cultura. A viabilidade celular foi quantificada pelo método do MTT e por citometria de fluxo. Foi estudada a participação da via colinérgica muscarínica e do TNF- $\alpha$  na indução da morte celular, utilizando-se o antagonista atropina e o inibidor da enzima TACE, o BB1101. Foi avaliada também a liberação dos gliotransmissores glutamato, TNF-alfa e óxido nítrico (NO). As atividades das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase, glutatona redutase e glutatona transferase foram quantificadas de modo a investigar uma possível indução de estresse oxidativo. Ocorreu uma redução significativa da viabilidade celular quando as células foram tratadas com as toxinas Mlx-8 e Mlx-9 por um período de incubação de 24 horas, em todas as concentrações usadas (1, 10, 100 e 1000ng/ml). Ambas as toxinas induziram um aumento na liberação de TNF- $\alpha$  e de glutamato, embora apenas a liberação do TNF- alfa pareça não explicar a redução da viabilidade celular induzida pelas toxinas. Apenas a toxina Mlx-8 aumentou o óxido nítrico e a atividade da enzima glutatona redutase. Em síntese, a toxina Mlx-8 induziu uma redução da viabilidade celular que parece dever-se à liberação de glutamato, TNF- $\alpha$  e NO, com a ativação da enzima glutatona redutase e aumento da fragmentação do DNA. Já a toxina Mlx-9, nos momentos analisados, reduziu também a viabilidade celular, induziu a liberação de glutamato e TNF- $\alpha$ , mas não do NO.

**Palavras Chave:** *Micrurus*, Neurotoxinas, Astrócitos, Estresse oxidativo, Gliotransmissores

## ABSTRACT

TEIXEIRA, J.P. Effects of Mlx-8 and Mlx-9 neurotoxins isolated from the *Micrurus lemniscatus* snake venom in astrocytes culture. 2012 p. 86 Master Thesis (Toxinology). Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

The predominant clinical manifestations of Elapid snake bite are related to the neurotoxic and myotoxic actions of the venom, causing blockade of the peripheral nervous transmission. The phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins are an important component of the venom and induce cell death in cultured hippocampal neurons. Glial cells, astrocytes in particular, exert a profound effect on neuronal development providing trophic support and they are also partners at the synapses. In this work we investigated the effects of Mlx-8 and Mlx-9 phospholipases A<sub>2</sub> toxins isolated from the *Micrurus lemniscatus* venom on the viability of astrocytes. It was evaluated the involvement of the muscarinic cholinergic system and of the TNF- $\alpha$  release in the induction of cell death, using atropine (a non-selective muscarinic antagonist) and BB-1101 (a TACE inhibitor). It was also measured the release of the gliotransmitters glutamate, TNF- $\alpha$  and NO. A possibility of oxidative stress generation was also evaluated by the quantification of some antioxidants enzymes activities (glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase). There was a significant reduction in astrocytes viability after the incubation with both of the toxins, Mlx-8 or Mlx-9, for 24h, in all the concentrations used (1, 10, 100, 1000ng/ml). Both toxins induced an increase in glutamate and TNF- $\alpha$  release, although the increase in the TNF- $\alpha$  release seems not to explain by itself the mechanism of viability reduction in astrocytes culture. Only Mlx-8 toxin increased NO release and glutathione reductase activity. In conclusion, Mlx-8 and Mlx-9 phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins isolated from the venom of *Micrurus lemniscatus* are toxic for astrocytes in culture. Mlx-8 toxin mechanism seems to involve glutamate, TNF- $\alpha$  and NO release, together with DNA fragmentation and glutathione reductase activity elevation. Mlx-9 toxin, at the times investigated, released glutamate and TNF $\alpha$ , but not altered NO or enzymes activities.

**Keywords:** Micrurus, Neurotoxins, Astrocytes, Oxidative stress, Gliotransmitter

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Serpente Coral, <i>Micrurus lemniscatus</i>	19
<b>Figura 2.</b>	Possível ação das neurotoxinas FLA <sub>2</sub> em neurônios	22
<b>Figura 3.</b>	Eletromicrografia dos terminais pré e pós-sinápticos neuronais envolvidos pelo astrócito formando a sinapse tripartida	25
<b>Figura 4.</b>	Cromatograma obtido após cromatografia em HPLC do veneno da <i>Micrurus lemniscatus</i> mostrando os diferentes picos separados	34
<b>Figura 5.</b>	Reação de redução de MTT à formazan pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial	38
<b>Figura 6.</b>	Cultura de astrócitos isolados marcados com GFAP	48
<b>Figura 7.</b>	Quantificação dos astrócitos viáveis expostos a diferentes concentrações das toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 por 3 horas.	49
<b>Figura 8.</b>	Quantificação dos astrócitos viáveis expostos a diferentes concentrações das toxinas Mlx- 8 ou Mlx-9 por 12 horas.	49
<b>Figura 9.</b>	Quantificação dos astrócitos viáveis expostos a diferentes concentrações das toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 por 24 horas	50
<b>Figura 10.</b>	Histogramas representativos da viabilidade celular dos astrócitos	51
<b>Figura 11.</b>	Histogramas representativos da viabilidade celular dos astrócitos tratados com a toxina Mlx-8	51
<b>Figura 12.</b>	Histogramas representativos da viabilidade celular dos astrócitos tratados com a toxina Mlx-9	52
<b>Figura 13.</b>	Viabilidade celular dos astrócitos tratados com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9	52
<b>Figura 14.</b>	Quantificação de células viáveis (astrócitos) expostas a diferentes concentrações das toxinas Mlx-8 e Mlx-9 e incubadas com atropina por 24 horas	54
<b>Figura 15.</b>	Curva de deslocamento da ligação do [ <sup>3</sup> H]QNB obtida em ensaios utilizando a concentração de 100 µg de proteína em preparação de membrana de células de astrócitos de rato	55

<b>Figura 16.</b>	Curva de deslocamento da ligação do [ <sup>3</sup> H]QNB obtida em ensaios utilizando diferentes concentrações de proteína (25, 50 e 200 µg), em preparação de membrana de astrócitos de rato, pela atropina	56
<b>Figura 17.</b>	Concentração de glutamato (mg/mL) liberado no meio de cultura de astrócitos após tratamento com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9	57
<b>Figura 18.</b>	Concentração de TNF-α (U/ml) em cultura de astrócitos após o tratamento com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9	58
<b>Figura 19.</b>	Quantificação dos astrócitos viáveis quando expostos a diferentes concentrações das toxinas Mlx-8 e Mlx-9 por 24h e incubados previamente com o BB1101	59
<b>Figura 20.</b>	Concentração de óxido nítrico em cultura de astrócitos após o tratamento com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9	60
<b>Figura 21.</b>	Atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase e glutathione S-transferase (GST), após incubação com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9	61
<b>Figura 22.</b>	Fotomicrografias obtidas em microscópio confocal de células tratadas com Mlx-8 (1000 ng/ml por 24 horas)	63
<b>Figura 23.</b>	Fotomicrografias obtidas em microscópio confocal de células tratadas com a toxina Mlx-9 (1000ng/ml por 24 horas)	64
<b>Figura 24.</b>	Possível mecanismo da toxina Mlx-8 no qual vias distintas poderiam ocasionar o aumento do NO.	73

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	17
<b>1.1. Serpentes da Família Elapidae</b>	17
1.1.1 <i>Micrurus lemniscatus</i>	18
<b>1.2. Venenos Elapidicos</b>	19
<b>1.3. Neurotoxinas Elapidicas</b>	20
<b>1.4. Glia</b>	24
1.4.1. Modelo de astrócitos (Glândula Pineal)	26
<b>1.5. Gliotransmissores</b>	27
1.5.1. Glutamato	27
1.5.2. Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ )	28
<b>1.6. Óxido Nítrico (NO)</b>	29
<b>1.7. Estresse Oxidativo</b>	30
<b>1.8. Receptores Colinérgicos Muscarínicos</b>	31
<b>2. OBJETIVOS</b>	33
2.1. Objetivos Gerais	33
2.2. Objetivos Específicos	33
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	34
<b>3.1. Purificação das Toxinas do Veneno de <i>Micrurus Lemniscatus</i></b>	34
<b>3.2. Cultura de Astrócitos</b>	35
3.2.1. Animais	35

3.2.2. Obtenção de Astrócitos Isolados	35
<b>3.3. Caracterização da Cultura Celular por Imunocitoquímica</b>	<b>36</b>
<b>3.4. Ensaio de Viabilidade Celular</b>	<b>37</b>
3.4.1. Determinação da Viabilidade Celular (MTT)	37
3.4.1.1. Tratamentos Farmacológicos	38
3.4.2. Determinação da Viabilidade Celular (Citometria de Fluxo)	39
3.4.2.1. Determinação da Integridade da Membrana Celular	39
3.4.2.2. Avaliação da Fragmentação do DNA	39
3.4.2.3. Tratamentos Farmacológicos	39
<b>3.5. Ensaio com Radioligantes para Caracterizar a Presença do Receptor Colinérgico Muscarínico</b>	<b>39</b>
3.5.1. Preparação de Membranas Semi-Purificadas a partir de Astrócitos em Cultura	39
3.5.2. Estudos com Radioligantes	40
<b>3.6. Análise da Liberação de Glutamato</b>	<b>41</b>
<b>3.7. Quantificação do TNF-<math>\alpha</math> em Cultura de Células Tumorais L929</b>	<b>41</b>
3.7.1. Preparação das Amostras	41
3.7.2. Cultura de Células L929	42
3.7.3. Determinação das Concentrações do TNF- $\alpha$	42
<b>3.8. Determinação da Produção de NO</b>	<b>43</b>
<b>3.9. Avaliação da Atividade de Enzimas Antioxidantes</b>	<b>43</b>
3.9.1. Determinação da Atividade Enzimática da Glutathione Peroxidase (GPx)	43

3.9.2. Determinação da Atividade Enzimática da Glutathione Redutase (GR)	44
3.9.3. Determinação da Atividade Enzimática da Glutathione S-Transferase (GST)	45
<b>3.10. Identificação da Morfologia Celular em Microscopia de Fluorescência Confocal</b>	46
<b>3.11. Análise Estatística</b>	47
<b>4. RESULTADOS</b>	48
<b>4.1. Caracterização da Cultura Celular por Imunocitoquímica</b>	48
<b>4.2. Ensaio de Viabilidade Celular</b>	48
4.2.1. Determinação da Viabilidade Celular (MTT)	48
4.2.2. Determinação da Viabilidade Celular (Citometria de Fluxo)	50
<b>4.3. Determinação do Envolvimento da Via Colinérgica Muscarínica</b>	53
4.3.1. Determinação da Viabilidade Celular (MTT) usando Antagonista Muscarínico (Atropina)	53
4.3.2. Caracterização do Receptor Colinérgico Muscarínico em Astrócitos	55
<b>4.4. Determinação da Concentração do Glutamato</b>	56
<b>4.5. Avaliação do Envolvimento do TNF-<math>\alpha</math></b>	57
4.5.1. Determinação da concentração de TNF- $\alpha$ liberado	57
4.5.2. Determinação da viabilidade celular (MTT) usando o Inibidor da TACE (BB1101)	58
<b>4.6. Determinação da Produção de NO</b>	59
<b>4.7. Atividade das Enzimas Antioxidantes</b>	60
<b>4.8. Ensaio de Morfologia Celular em Microscopia de Fluorescência Confocal</b>	62



<b>5. DISCUSSÃO</b>	65
<b>6. CONCLUSÕES</b>	76
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	77

# 1. INTRODUÇÃO

Neurotoxinas de origem animal têm sido consideradas como ferramentas importantes para o estudo de diferentes processos biológicos. Em particular, as toxinas isoladas de venenos de serpentes da família Elapidae têm sido utilizadas para estudos sobre funções do sistema nervoso periférico e central, sendo sua importância relacionada a dois aspectos principais. Um relacionado à participação de cada uma delas no quadro do envenenamento e outro na possível utilização dessas toxinas para o estudo de processos neurobiológicos, como na caracterização farmacológica e química dos canais iônicos de tecidos excitáveis, na caracterização de receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, no processo de liberação de neurotransmissores, em processos convulsivos, epilepsia e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson.

## 1.1. Serpentes da Família Elapidae

A família Elapidae encontra-se amplamente distribuída pelo mundo, e possui aproximadamente 250 espécies. Distribui-se da Ásia à África e é particularmente diversificada na Austrália. Nas Américas, esta família está representada pelas chamadas cobras corais. Estas estão distribuídas entre o sul dos Estados Unidos, México, América Central e América do Sul até a Argentina (MELGAREJO, 2009). As serpentes constituintes da família Elapidae das Américas compreendem mais de 57 espécies classificadas em três gêneros: *Micrurus*, *Leptomicrurus* e *Micruroides* (ROZE, 1983). As serpentes corais da América do Sul e Central pertencem ao Gênero *Micrurus*. No Brasil as serpentes deste gênero compreendem 19 espécies, sendo que as espécies mais comuns são a *M. corallinus*, encontrada na região sul e litoral da região sudeste; *M. frontalis*, também encontrada na região sul, sudeste e parte do centro-oeste e *M. lemniscatus*, distribuída nas regiões norte e centro-oeste (PINHO; PEREIRA, 2001).

As serpentes corais apresentam presas relativamente pequenas, imóveis, situadas na porção anterior da boca, do tipo proteróglifa. Devido à abertura bucal e ao tamanho das presas a injeção do veneno é difícil e superficial, o que é compensado por um hábito peculiar de morder sem soltar, de forma que o período de inoculação costuma ser prolongado (Ministério da Saúde, 2001; PETERSON, 2006; ROZE, 1983).

As serpentes corais são animais de hábitos fossoriais ou subfossoriais, habitando principalmente a camada superficial do solo ou sob a serapilheira que cobre o chão das matas. Consideradas animais de pequeno a médio porte são conhecidas por coral, coral verdadeira, ibiboboca ou boicorá. Possuem anéis vermelhos, pretos e brancos em qualquer tipo de combinação. As falsas-corais possuem o mesmo padrão de coloração, porém, a configuração dos anéis não envolve toda a circunferência, e, além disso, são desprovidas de dentes inoculadores e, portanto, não são consideradas peçonhentas (Ministério da Saúde, 2001).

#### 1.1.1. *Micrurus lemniscatus*

São serpentes que possuem habitat subterrâneo e uma dieta bem específica, alimentando-se de peixes do tipo muçum (*Synbranchus marmoratus*). A *M. lemniscatus* é uma serpente muito vistosa e de porte avantajado podendo alcançar e ultrapassar 1,5m. Habitam extensas áreas do território nacional e países vizinhos, que compreendem todo o vale amazônico, as grandes áreas dos cerrados do Brasil Central e uma extensa faixa do litoral Atlântico, desde o Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro. Estão descritas quatro subespécies registradas para o Brasil: *M.l.lemniscatus*, *M.l. carvalho*, *M.l. diutiuse*, *M.l. helleri* (MELGAREJO, 2009).



**Figura 1.** Serpente Coral, *Micrurus lemniscatus* (Fonte; Nathan Shepard)

## 1.2. Venenos Elapídicos

As serpentes da família Elapidae são pouco agressivas. Raramente causam acidentes, mas mesmo pouco freqüentes, muitas vezes eles são gravíssimos, acarretando a morte se não tratados em poucas horas (ROZE, 1983).

Os venenos são misturas biológicas complexas que as serpentes utilizam no ato de imobilizar e matar as presas para se alimentar. Os efeitos provocados pelo veneno de serpentes elapídicas no organismo são muito variados e complexos. As manifestações clínicas predominantes estão relacionadas às ações neurotóxicas e miotóxicas do veneno sobre a junção neuromuscular, causando bloqueio da transmissão nervosa periférica (WEIS; MCISSAC, 1971). Assim, os sintomas neurológicos assemelham-se a aqueles encontrados na miastenia grave. Ptose palpebral, distúrbios visuais, paralisia facial, hemorragia interna, incontinência urinária e coagulopatia são alguns dos sintomas causados pelo envenenamento provocado por serpentes elapídicas. A morte geralmente é devida a uma paralisia respiratória de origem periférica (VITAL BRAZIL, 1990).

A escassez de dados relacionados à composição do veneno provém da difícil manutenção dessas serpentes em cativeiro dificultando a extração do veneno, assim estratégias proteômicas e transcriptômicas têm sido utilizadas na tentativa de elucidar sua composição.

A análise do transcriptoma da glândula e do veneno da *Micrurus altirostris* e da *Micrurus Corallinus* indicou a presença de proteínas de três dígitos e de fosfolipases A<sub>2</sub> como proteínas predominantes na composição do veneno em relação a ambas as espécies (LEAO et al., 2009; CORRÊA-NETTO, 2011).

Na análise da composição do veneno da *Micrurus mipartitus* proveniente da Colômbia, proteínas de três dígitos foram as mais abundantes (60% do total de proteínas) seguidas das fosfolipases do tipo A<sub>2</sub> (30%). A partir do veneno da *Micrurus mipartitus* da Costa Rica obteve-se um perfil semelhante com maior proporção das proteínas de três dígitos (83%) em relação às fosfolipases do tipo A<sub>2</sub> (8,2%) (SÚAREZ et al., 2011).

A análise proteômica dos venenos de *Micrurus frontalis*, *Micrurus ibiboboca* e *Micrurus lemniscatus* demonstra que proteínas de 6 a 8 kDA (proteínas de três dígitos) são as mais abundantes, seguidas das proteínas de 12 a 14kDA (fosfolipases do tipo A<sub>2</sub>) (CISCOTTO et al., 2011).

Proteínas das famílias de três dígitos e fosfolipases podem ser a causa da maior parte dos efeitos biológicos e serem responsáveis principalmente pela neurotoxicidade e morte por paralisa respiratória.

### **1.3. Neurotoxinas Elapídicas**

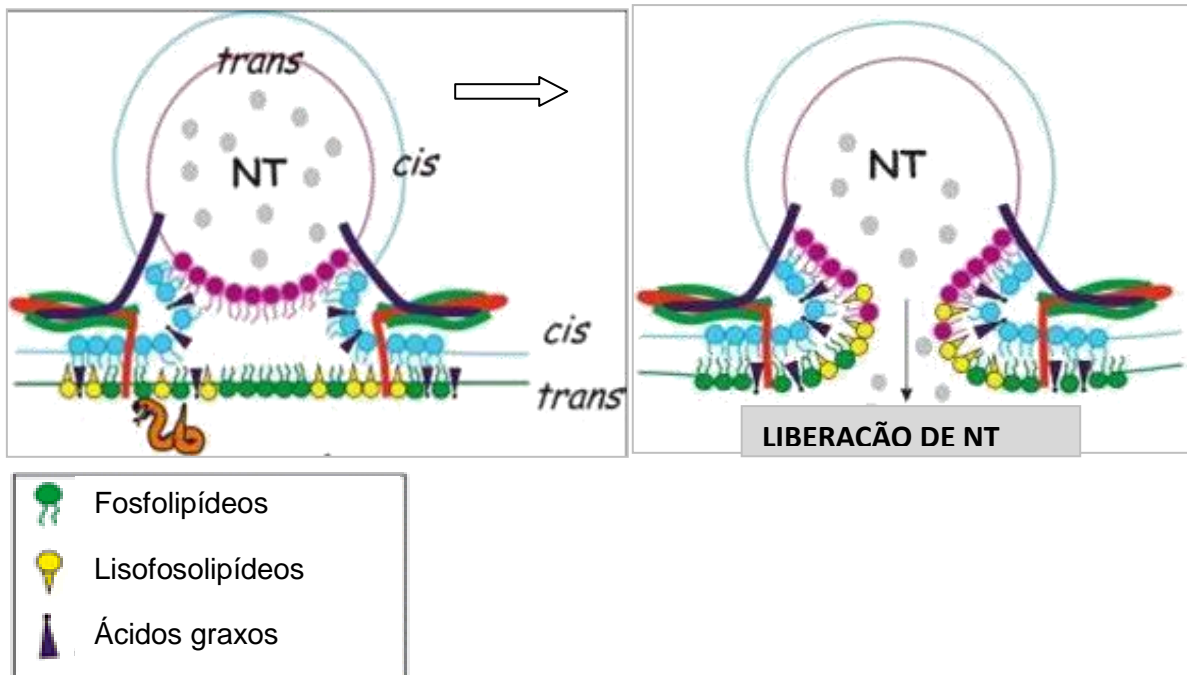
Nos venenos elapídicos são reconhecidas neurotoxinas com ações pré-sinápticas e pós-sinápticas. As neurotoxinas pré-sinápticas compreendem principalmente as β-neurotoxinas que são caracterizadas por sua atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>). As neurotoxinas pós-sinápticas compreendem as α-neurotoxinas, que podem ser caracterizadas como proteínas com estrutura em três dígitos (3FTx) desprovidas de ação enzimática e que atuam interagindo com receptores colinérgicos.

Os mecanismos de neurotoxicidade relacionados às toxinas fosfolipásicas ainda permanecem em debate. Um ponto de vista se baseia na sua atuação na parte externa da membrana plasmática; outro ponto de vista especula que é internalizada atuando na membrana intracelular (NECO et al., 2003) e é também

sugerido que ambas as ações são necessárias para produzir um efeito completo (KRIZAJ et al., 2007).

O desenvolvimento da perda da transmissão nervosa em nervos musculares isolados expostos a toxinas fosfolipásicas, como a beta-bungarotoxina, apresenta um caráter trifásico, com uma primeira fase de inibição parcial da liberação de neurotransmissores seguida por uma fase de facilitação da liberação e por último um declínio progressivo da neurotransmissão (CHANG,1984; ROSSETTO, RIGONI, MONTECUCCO, 2004).

Alguns estudos sugerem que somente a atividade enzimática não seja suficiente para explicar todos os efeitos tóxicos causados pelas neurotoxinas fosfolipásicas (KAO et al., 2007; 2012 KRIZAJ, 2007; ROSENBERG et al.,1989), sugerindo que as neurotoxinas FLA<sub>2</sub> se ligariam à membrana neuronal interagindo com um tipo de receptor de membrana pré-sináptico denominado de tipo N, específico para FLA<sub>2</sub> neurotóxicas, catalisando a hidrólise de fosfolípidos e levando à produção de lisofosfolípidos e ácidos graxos (LAMBEAU et al., 1989; 2000). Estes, por sua vez, causariam alterações conformacionais na membrana plasmática, induzindo a fusão das vesículas sinápticas e a liberação de neurotransmissores com a inibição subsequente da fissão vesicular e reciclagem das mesmas (ROSSETTO et al., 2006).



**Figura 2.** Possível ação das neurotoxinas em neurônios. As neurotoxinas FLA<sub>2</sub> se ligariam à membrana neuronal catalisando a hidrólise de fosfolípidos em lisofosfolípidos e ácidos graxos, alterando a conformação da membrana, induzindo a liberação de neurotransmissores com a inibição subsequente da fissão vesicular e reciclagem das mesmas. Fonte: Adaptado de Rossetto *et al.* (2006).

Um estudo dos efeitos neurotóxicos das principais toxinas pré-sinápticas elapídicas (notexina, beta-bungarotoxina, taipoxina e textilotoxina) em neurônios granulares do hipocampo demonstrou que estas induzem morte celular que é dependente do tempo de incubação (ROSSETTO, RIGONI, MONTECUCCO, 2004).

A beta-bungarotoxina (primeira toxina pré-sináptica caracterizada farmacologicamente) é um componente do veneno da serpente *Bungarus multicinctus* (também da família Elapidae) e, em sua forma ativa, se apresenta como um heterodímero, sendo que uma das subunidades possui atividade enzimática. Foi observada a morte apoptótica em neurônios expostos à beta-bungarotoxina como também o aumento de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, aumento do cálcio mediado por receptores do tipo NMDA, ativação da caspase-3, aumento do óxido nítrico e inibição dos canais para K<sup>+</sup> (CHEN, 2005; SHAKHMAN *et al.*, 2003; TSENG *et al.*, 2003;). No entanto, diferentemente dos neurônios, as células da glia,

os astrócitos, demonstraram ser resistentes à beta-bungarotoxina (Chen, 2005; Tseng, 2003).

A beta-bungarotoxina também potencializa a atividade de canais iônicos dependentes de voltagem seletivos para sódio em neurônios cerebelares. Este efeito foi revertido pela inibição da cicloxigenase, concluindo-se, portanto, que além dos canais para sódio serem modulados por metabólitos lipídicos, estes poderiam estar envolvidos com o efeito da toxina (GUO et al., 2012).

Além das toxinas consideradas pré-sinápticas (com atividade fosfolipásica) o veneno elapídico também apresenta alta porcentagem de toxinas pós-sinápticas que atuam em receptores de membrana.

Toxinas que atuam na pós-sinapse foram isoladas do veneno da serpente africana *Dendroaspis angusticeps* (mamba) bloqueando os receptores muscarínicos, como por exemplo, as toxinas MT2, MT3, MT7, que possuem alta seletividade para os subtipos M<sub>1</sub>/M<sub>4</sub>, M<sub>4</sub> e M<sub>1</sub>, respectivamente (ONALI et al., 2005).

A caracterização de uma nova toxina (MT-MI $\alpha$ ) isolada do veneno da *Micrurus lemniscatus* demonstrou que esta apresenta um efeito antagonista em receptores muscarínicos do hipocampo de ratos (SILVA et al., 2011).

HUANG e colaboradores (2008) isolaram uma toxina da serpente *Naja atra*, que tem alta afinidade pelos receptores colinérgicos muscarínicos, atuando como agonista e também apresentando atividade enzimática de FLA2 mostrando que algumas toxinas podem ter ambas as características.

Gandolfo e col. (1996) estudaram os efeitos comportamentais e eletroencefalográficos de três fosfolipases A<sub>2</sub> purificadas do veneno da serpente elapídea *Oxyuranus scutellatus* e de uma fosfolipase isolada do veneno de abelha, injetados por via intracerebro-ventricular em ratos. Estes estudos mostraram que a fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de abelha e uma das fosfolipases isoladas do veneno da serpente produziram movimentos estereotipados, convulsões, coceira compulsiva e dificuldades respiratórias.



Estudo semelhante foi realizado com toxinas isoladas do veneno da serpente coral *Micrurus lemniscatus*, onde foram investigados os efeitos da administração intracerebral de toxinas com atividades PLA<sub>2</sub>, Mlx-8, Mlx-9, Mlx-11 e Mlx-12 (OLIVEIRA et al., 2008). Neste trabalho foi mostrado que estas toxinas induzem um quadro de neurotoxicidade caracterizado por convulsões clônicas acompanhadas de espículas e descargas epiléticas de curta duração e uma latência prolongada para o aparecimento das convulsões. Observou-se também uma lesão acentuada dos neurônios hipocâmpais acompanhada de gliose.

Em outro estudo, em cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos, foi observado que as neurotoxinas fosfolipásicas Mlx-8 e Mlx-9 induzem morte celular por apoptose tardia que foi caracterizada pela fragmentação do DNA, alteração do potencial elétrico da membrana mitocondrial e alterações morfológicas importantes. Foi descrita também a ocorrência de morte celular com características de necrose, caracterizada pela perda da integridade da membrana plasmática e formação de debris celulares (CARVALHO et al., 2010).

A neurotoxina Mlx-8 foi capaz de induzir também o aumento do óxido nítrico em neurônios e recentemente foi descoberto que possui afinidade pelo receptor muscarínico e atua com efeito antagonista (Sandoval, R., comunicação pessoal).

#### **1.4. Glia**

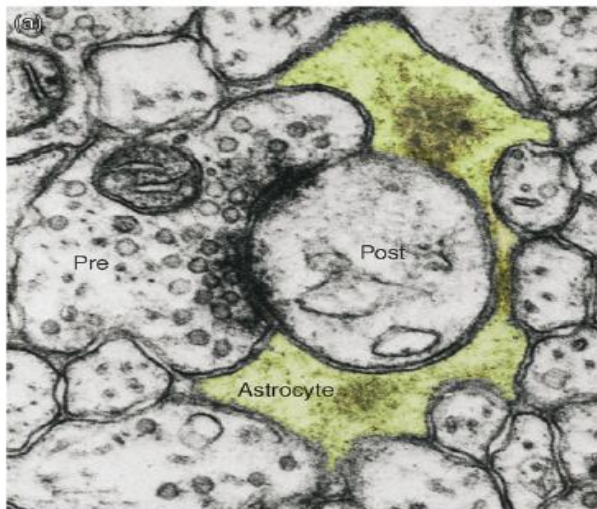
As células da glia, que compõem 85% das células no sistema nervoso central (SNC), diferentemente dos neurônios, não geram impulsos elétricos. Por muito tempo, nos últimos 100 anos, acreditou-se que estas células promoviam apenas suporte estrutural para os neurônios. Virchow primeiramente descreveu a glia como ``NERVENKITT``, com o significado de cola dos nervos, propondo que a glia seria uma população homogênea de células com uma função passiva. Novas pesquisas têm elucidado a importância da glia também como células ativas e multifuncionais (HALASSA et al., 2007).

A glia é composta por diferentes subtipos de células: células imunes do sistema nervoso central (SNC), que é a microglia; células importantes em relação à mielinização de axônios, que são os oligodendrócitos, e células em formato de

estrela responsáveis por promover suporte estrutural, metabólico e trófico aos neurônios, que são os astrócitos (HALASSA et al., 2007).

Os astrócitos asseguram a proteção dos neurônios evitando que ocorra a excitotoxicidade. Isso se dá pela liberação de fatores neuroprotetores como a cisteína derivada dos astrócitos que é essencial para a manutenção de níveis estáveis de GSH em neurônios (KAUR *et al.*, 2007; MOIDUNNY *et al.*, 2012), pela recaptação de neurotransmissores, principalmente o glutamato, pois expressa uma alta densidade de transportadores para o glutamato na membrana plasmática, e mantendo equilibrados os níveis de potássio no meio extracelular, resultantes da atividade neuronal (WALZ, 2000; HALASSA et al., 2007, 2010; WITTHOFT et al., 2012).

Nos últimos anos foi caracterizada a participação dos astrócitos nas sinapses compondo o que é chamado de sinapse tripartida. A sinapse tripartida é constituída de três elementos, elementos pré-sinápticos e pós-sinápticos neuronais e os astrócitos, estando estes envolvidos no processamento de informações no sistema nervoso central (HALASSA et al., 2007, 2010; PANANASCH et al., 2012) (Figura 3).



**Figura 3.** Eletromicrografia dos terminais pré e pós-sinápticos neuronais envolvidos pelo astrócito formando a sinapse tripartida (Fonte HALASSA *et al.*, 2007).

Os astrócitos estão envolvidos com a modulação neuronal sendo alvo de estudos de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, isquemia, doença de Parkinson e epilepsia. Os astrócitos apresentam uma função protetora no Alzheimer uma vez que seu papel é crucial para a degradação das plaquetas. Na isquemia cerebral os astrócitos têm um papel bastante significativo na fase crônica após a injúria, controlando a homeostasia iônica e secretando fatores neuroprotetores. Os fatores neurotróficos liberados pelos astrócitos também são responsáveis pela proteção de neurônios dopaminérgicos e a perda de sua função estaria envolvida na perda neuronal decorrente da doença de Parkinson (WEGRZYNOWICZ *et al.*, 2010). Foi demonstrado também que a indução de astrócitos reativos induz a formação de focos epilépticos (LOSI *et al.*, 2012; ORTINSKI *et al.*, 2010).

Além de estarem relacionados a doenças neurodegenerativas, os astrócitos também possuem um papel crítico relacionado a doenças do desenvolvimento neuronal, como a síndrome de Rett e a síndrome do X frágil (MOLOFSKY *et al.*, 2012).

Os astrócitos não são mais considerados como uma população homogênea de células. Estudos recentes indicam que os astrócitos possuem funções e morfologias distintas e que são diferenciadas nos primeiros estágios de desenvolvimento (MOLOFSKY *et al.*, 2012, OBERHEIM *et al.*, 2012).

#### 1.4.1. Modelo de Astrócitos (Glândula Pineal)

A glândula pineal, também chamada de corpo pineal ou epífise, é um pequeno órgão, localizado em uma depressão na parte superior da linha média do encéfalo, tendo sua origem a partir do diencéfalo, e, portanto, tem origem neural. A glândula pineal é composta por vários tipos celulares. Além dos pinealócitos, que são as células neuroendócrinas responsáveis por sintetizar e liberar o hormônio melatonina na circulação sistêmica, que correspondem a 90% das células, a glândula também possui aproximadamente 10% de células da glia, em particular os astrócitos (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008; VOLLRATH, 1981). Os astrócitos

provenientes da glândula pineal em cultura foram o modelo de cultura celular utilizado neste trabalho.

## **1.5. Gliotransmissores**

Apesar de os astrócitos não serem capazes de gerar potencial de ação e apresentarem potencial de membrana bem estabilizado, sinais de cálcio gerados nos astrócitos podem induzir a liberação de transmissores químicos (gliotransmissores) incluindo o glutamato, D-serina, ATP, taurina, Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (MONTANA et al., 2006). O aumento do cálcio pode ser causado pela liberação de neurotransmissores pelos neurônios e serem propagados através de ondas pelas células da glia vizinhas pela difusão do IP<sub>3</sub> (trifosfato de inositol) ou pela liberação do ATP. Os astrócitos não apresentam uma sinapse clássica, mas estudos demonstram que o mecanismo de transporte de vesículas (onde transmissores são armazenados) para a membrana é semelhante ao de neurônios. Utilizando-se a toxina botulínica, a qual cliva as proteínas SNARE necessárias para a ocorrência da exocitose, foi demonstrado que esta causa a redução dos níveis de glutamato dependentes de cálcio em astrócitos, concluindo assim que a liberação dos gliotransmissores nos astrócitos pode ocorrer através da exocitose (MONTANA et al., 2006 , PARPURA, 2010).

### **1.5.1. Glutamato**

O ácido L-glutâmico, também denominado glutamato (Glu), é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. No entanto, o excesso de glutamato pode danificar células nervosas, o que é conhecido como excitotoxicidade. O mecanismo da toxicidade pode ser decorrente da despolarização da membrana e influxo de cátions por ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos dos tipos NMDA (ativados por N-metil-D-aspartato), AMPA (ativados por alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) e os de cainato. Em um estudo foi descrita a toxicidade do glutamato em astrócitos por um mecanismo não dependente desta via excitatória, mas que provém da depleção da glutatona pela inibição da captação de cistina (CHEN et al.,2000).

A liberação de glutamato dependente de cálcio pelos astrócitos pode estar associada também à reatividade dos astrócitos decorrente de um estado inflamatório e não apenas a um papel fisiológico que ocorreria em células normais (AGULHON, 2012).

A liberação de D-serina, um co-agonista do receptor para glutamato do tipo NMDA, pelos astrócitos desempenha um papel chave na sinaptogênese, na formação dos circuitos neuronais e também está envolvida em mecanismos de plasticidade sináptica, como o aprendizado e a memória (Riedel et al., 2003, HALASSA et al, 2007). Dados obtidos em nosso laboratório confirmaram a presença dos receptores metabotrópicos dos grupos I e II e ionotrópicos (AMPA e NMDA) para glutamato em astrócitos da glândula pineal de ratos.

#### 1.5.2. Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ )

O TNF- $\alpha$  foi identificado em 1975 como uma glicoproteína induzida por endotoxinas, que causava necrose hemorrágica em sarcomas que haviam sido transplantados em ratos, sendo por isso chamado de fator de necrose tumoral. O papel do TNF- $\alpha$ , conhecido como mediador inflamatório central, vai além da sua atividade clássica e, hoje em dia, é considerado um importante regulador de processos fisiológicos no SNC (SANTELLO et al., 2012).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina (tipo protéico) que atua em receptores próprios em suas células-alvo. Quando acionados, os receptores para TNF- $\alpha$  desencadeiam cascatas sinalizadoras que controlam diversos processos celulares, relacionados à viabilidade celular, expressão de genes, homeostase iônica além de manter a integridade sináptica dos neurônios (SANTELLO et al., 2012).

Os níveis de TNF- $\alpha$  no SNC dependem de uma produção local por astrócitos, células da microglia e neurônios (KRONFOL et al., 2000). Em condições patológicas foi demonstrado que células da glia aumentam a produção dessa citocina. Seus efeitos ocorrem quando se ligam a receptores específicos denominados TNFR1 e TNFR2. Em neurônios e na microglia, o TNF-alfa induz apoptose quando se liga a TNFR1 (STEELMAN et al, 2011). Há indícios que o TNFR2 diferentemente do

TNFR1 ativa uma via de sinalização anti-apoptótica e proinflamatória (MARCHETTI et al., 2004; SANTELLO et al., 2012).

Esta citocina é sintetizada em sua forma solúvel, a partir do precursor ligado à membrana, por uma metaloprotease dependente de zinco conhecida como TACE (enzima conversora de TNF- $\alpha$ ). Estudos mostraram que a ativação da TACE é dependente da estimulação de receptores para glutamato. O mesmo estudo mostrou que a ativação de receptores NMDA é importante para um aumento da atividade da TACE e, portanto, para o aumento da produção do TNF- $\alpha$  (MADRIGAL et al, 2002).

### **1.6. Óxido Nítrico**

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso. O NO sofre rápida difusão e a sua ação não é altamente localizada. Liberado à medida que é formado, não é armazenado em vesículas, portanto não se limita a sítios de liberação convencionais. Apesar de não possuir as características de um neurotransmissor/gliotransmissor clássico participa de muitos processos fisiológicos relacionados ao sistema nervoso central e periférico como o controle da plasticidade sináptica, liberação de neurotransmissores e defesa contra patógenos (CHEN, 2004; GOURGIOTIS et al., 2012).

O NO está envolvido na modulação da memória e o desequilíbrio da síntese de NO está relacionado com doenças como esquizofrenia (GOURGIOTIS *et al.*, 2012), doenças cerebrais degenerativas relacionadas ao envelhecimento (JUNG *et al.*, 2012) e também na doença de Parkinson (BROOM *et al.*, 2011).

O NO é gerado através da ativação de receptores para glutamato do tipo NMDA. Após esta ativação, o  $\text{Ca}^{2+}$  é liberado para o citosol onde se liga à calmodulina formando um complexo que ativa a sintase do óxido nítrico (CHI et al., 2003; MENG et al., 1995; ). O NO pode reagir com lipídeos de membrana, induzindo a peroxidação lipídica, causando mutações no DNA e também sinalizar a morte celular por apoptose através de sua reação com o radical livre superóxido, produzindo peroxinitrito, um ânion altamente tóxico (KAVYA et al., 2006).

## 1.7. Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROS) incluem os radicais livres e outras moléculas que são muito reativas em função de sua instabilidade. São elas:  $O_2^-$  (superóxido);  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio ou água oxigenada),  $OH^-$  (hidroxila) (MCCONKEY, 1998). São geradas através do metabolismo do  $O_2$  na mitocôndria (cadeia respiratória) e a mais abundante é o radical superóxido  $O_2^-$  que é produzido no transporte de elétrons na mesma, pelo metabolismo de algumas enzimas hepáticas e pela decomposição da oxi-hemoglobina (RODRIGUEZ et al., 2004).

As EROS interagem com lipídeos, aminoácidos, açúcares, nucleotídeos, neste caso gerando a fragmentação do DNA. As EROS induzem a apoptose e também são geradas pelos macrófagos para eliminar bactérias. Quando ocorre um desequilíbrio entre a geração e a transformação das EROS pelas enzimas antioxidantes isso gera o estresse oxidativo que contribui para o aparecimento de doenças como câncer, neurodegeneração, diabetes e doenças auto-imunes (RODRIGUEZ et al., 2004). Há evidências de que o estresse oxidativo desempenha um importante papel na morte neuronal em modelos farmacológicos de Parkinson (FUKUI; MORAES, 2008).

A disfunção da mitocôndria de astrócitos também pode resultar em estresse oxidativo e evidências têm apontado que sua desregulação pode contribuir para a perda de neurônios quando ocorre um dano cerebral (CABEZAS et al., 2012). O aumento de espécies reativas de oxigênio foi encontrado em astrócitos primários expostos a amônia (MURTHY et al., 2001), sugerindo que distúrbios no metabolismo dos astrócitos podem levar ao estresse oxidativo e à morte celular.

A enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) transforma o radical superóxido  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e a enzima glutaciona peroxidase transforma o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ), impedindo, assim, o estresse oxidativo. Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de glutaciona oxidada (GSSG) e depleção de glutaciona reduzida (GSH). Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do

sistema protetor como agentes antioxidantes (dentre eles a glutatona, a vitamina E, o ascorbato, a SOD, a catalase), haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estado oxidativo. Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH (RODRIGUEZ et al., 2004; RAY et al., 2012).

A cisteína derivada dos astrócitos é essencial para a manutenção de níveis estáveis de GSH em neurônios (KAUR et al., 2007). Em geral os níveis de GSH são menores em neurônios comparados com astrócitos, onde estão envolvidos em mecanismos neuroprotetores.

### **1.8. Receptores Colinérgicos Muscarínicos**

Há evidências imunológicas que apoiam a ideia de que astrócitos in situ expressam receptores colinérgicos do subtipo muscarínico (mAChRs) (VAN DER ZEE et al., 1989, 1993). Através de técnicas de imunohistoquímica foram observados astrócitos imunorreativos no córtex cerebral, hipocampo e corpo caloso. Esses resultados sugerem que astrócitos protoplasmáticos e fibrosos podem expressar mAChRs.

Foi demonstrado que a ativação dos receptores muscarínicos dos astrócitos estimula cascatas de sinalização intracelular, o que atesta sua funcionalidade, porém o papel desses receptores nas células gliais não está bem esclarecido (GUIZETTI et al., 2008).

Estudos demonstraram que a ativação dos receptores muscarínicos M3 em astrócitos do córtex induzem o crescimento de prolongamentos neuronais em neurônios hipocámpais nunca expostos a estimulação colinérgica (GUIZETTI et al., 2008). Foi observado um aumento na expressão desses receptores nos astrócitos em pessoas com doença de Alzheimer (MESSAMORE et al., 1994).

Alterações na sinalização dos diferentes subtipos de receptores muscarínicos têm importância em várias patologias, incluindo síndromes de Alzheimer e Parkinson, depressão, esquizofrenia e epilepsia (LANGMEAD et al., 2008). No sistema nervoso central, os receptores muscarínicos estão envolvidos na regulação



de várias funções, como por exemplo, cognitiva, comportamental, sensorial, motora e autonômica (EGLIN, 2006).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9, dotadas de atividade fosfolipásica  $A_2$ , isoladas do veneno da serpente coral *Micrurus lemniscatus*, em cultura de astrócitos isolados da glândula pineal de ratos.

### 2.2. Objetivos Específicos

Avaliar a viabilidade celular dos astrócitos através do método da redução do brometo de tetrazólio (MTT) e analisar a integridade da membrana e a fragmentação do DNA através da citometria de fluxo.

Caracterizar o envolvimento da via colinérgica muscarínica e do TNF- $\alpha$  nos efeitos tóxicos das duas toxinas.

Analisar a liberação de glutamato, TNF- $\alpha$  e óxido nítrico induzida pelas duas toxinas.

Caracterizar o estado oxidativo dos astrócitos avaliando a atividade das enzimas antioxidantes glutaciona peroxidase, glutaciona redutase e glutaciona S-transferase.

Avaliar as alterações morfológicas dos astrócitos através da análise em microscopia de fluorescência confocal.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Purificação das Toxinas do Veneno de *Micrurus Lemniscatus*

O veneno bruto da serpente *Micrurus lemniscatus* foi fornecido pelo Laboratório de Animais Peçonhentos da Universidade Federal da Bahia. As toxinas isoladas foram obtidas a partir do veneno bruto da serpente *Micrurus lemniscatus*, que foi purificado através de cromatografia líquida de alto desempenho com fase reversa (HPLC-FR) (coluna C8) com gradiente de 10 a 35% de acetonitrila, em solução aquosa de TFA 0,1%. A absorbância foi lida em 214nm. Como resultado desta cromatografia obteve-se 19 picos denominados de P1 a P19 (Figura 4). Foram utilizados os picos 8 e 9, os quais foram denominados de Mlx-8 e Mlx-9, respectivamente. As toxinas foram conservadas a -20°C e descongeladas antes de sua utilização.

As massas moleculares das toxinas Mlx-8 (13531,3 g/mol) e Mlx-9 (13568,0 g/mol) foram previamente determinadas por espectrofotometria de massa, assim como a presença de atividade fosfolipásica (OLIVEIRA et al., 2008).

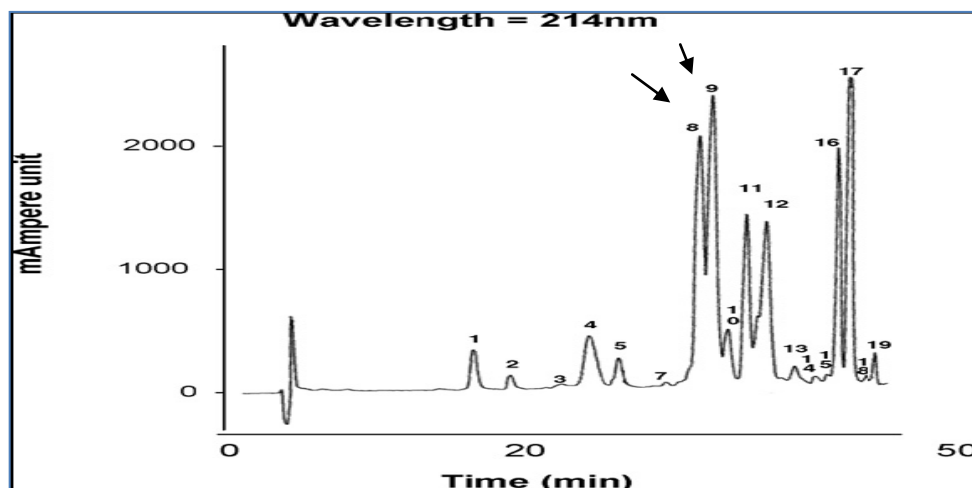


Figura 4. Cromatograma obtido após cromatografia em HPLC do veneno da *Micrurus lemniscatus* mostrando os diferentes picos separados.

## 3.2. Cultura de Astrócitos

### 3.2.1. Animais

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, machos e jovens, pesando entre 200 e 220 g. Os animais eram provenientes do Biotério do Instituto Butantan, e ficaram alojados com ciclo de iluminação claro/escuro de 12:12 horas (início do claro às 07h00) e temperatura controlada em torno de  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com alimento e água *ad libitum*. O projeto tem a aprovação do Comitê de Ética do Instituto Butantan (CEUIAB).

### 3.2.2. Obtenção de astrócitos isolados

Os astrócitos foram obtidos a partir da glândula pineal, pois a glândula tem origem neural e é composta por pinealócitos e por células da glia, em particular os astrócitos.

Os animais foram sacrificados por decapitação, e tiveram suas glândulas pineais isoladas e acondicionadas em meio DMEM contendo soro fetal bovino (SFB) a 10%, e mantidas em gelo.

A dissociação celular enzimática foi feita utilizando o Kit de digestão proteolítica com papaína (Papain Dissociation System, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey).

Sob o fluxo laminar, as glândulas foram lavadas com solução de Hanks, foram retirados os vasos sanguíneos e as glândulas foram picotadas de modo a obter pedaços menores de tecido. O tecido foi transferido para um frasco contendo a solução enzimática de papaína e DNase, o qual foi colocado em banho com agitação plana a  $37^{\circ}\text{C}$ , permanecendo por 45 minutos. Sob o fluxo laminar, as células foram então dispersas mecanicamente com 3 pipetas Pasteur com pontas de diâmetro decrescente. Em seguida, a suspensão foi transferida para um tubo de centrífuga, evitando-se os pedaços de tecidos não digeridos. A suspensão foi centrifugada a 300g (Eppendorf 5415C, Brinkman Instruments Inc., Westburg, N.Y.,

USA), durante 5 minutos, em uma temperatura de 20°C. O sobrenadante foi dispensado e o precipitado foi ressuscitado em uma solução contendo EBSS, ovomucóide e DNase, de modo a interromper a proteólise. Esta solução contendo as células foi depositada sobre uma solução de ovomucóide, sem que houvesse mistura das fases, e foi novamente centrifugada a 300g por 6 minutos a 20°C. Para a realização de culturas de astrócitos isolados, o precipitado contendo as células foi ressuscitado em 15ml de meio DMEM + 10% SFB, e colocado em garrafas de cultura, mantidos em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. No dia seguinte, os pinealócitos em suspensão foram retirados, juntamente com o meio de cultura, e os astrócitos aderidos ao fundo da garrafa, tiveram o meio de cultura DMEM + SFB 10% repostos. Os astrócitos permaneceram em cultura durante uma semana. Após este período, as células foram lavadas com solução de Hanks e colocou-se 6ml de tripsina 0.25% por 5 min, que atuou soltando os astrócitos do fundo da garrafa. Bloqueou-se a ação da tripsina com meio DMEM + 10% SFB. As células foram então centrifugadas a 500g por 5 min a 20°C. O precipitado foi ressuscitado e as células divididas em 4 garrafas de 15ml e mantidas por uma semana em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Em seguida, as células foram novamente soltas do fundo das garrafas e, após esse procedimento, foram contadas e diluídas de modo a obter uma solução de 5.000 células/90µL que foram colocados por poço em placas de 96 poços. Após um período de 48h de cultura, as células foram submetidas aos tratamentos farmacológicos.

### **3.3. Caracterização de Cultura Celular por Imunocitoquímica**

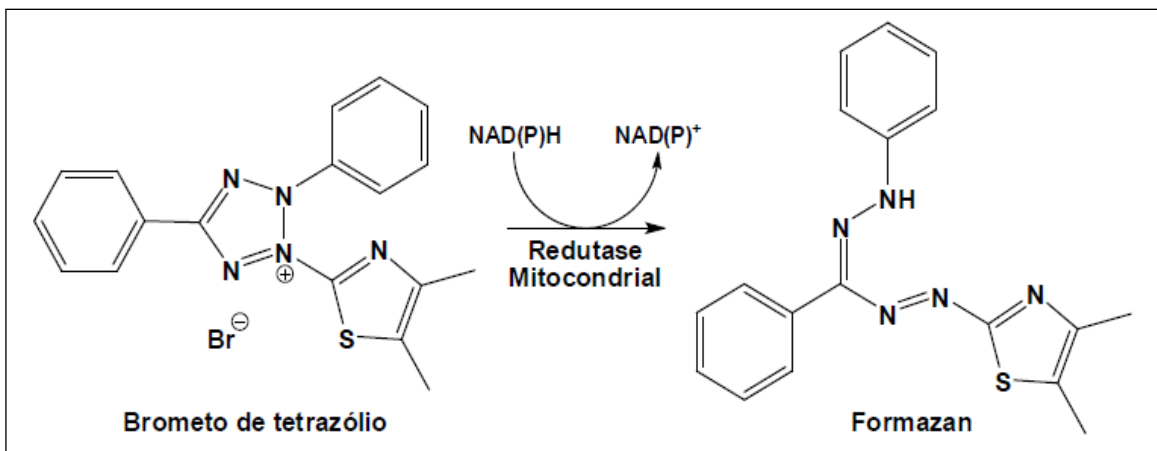
As suspensões contendo astrócitos foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (PB, 0.1 M, pH 7.4) e fixadas com paraformaldeído 2% durante 15 minutos. Depois de duas lavagens adicionais com o tampão, as células foram distribuídas em lâminas de microscopia recobertas com gelatina e alumem de cromo para que pudessem secar e aderirem a uma placa de aquecimento a 37 ° C. As células foram então incubadas em câmaras úmidas com anticorpos anti-proteína fibrilar glial ácida (GFAP; Sigma, USA) ou com receptores de complemento CR3 (OX-42, BD Biosciences, USA) diluídos 1:1000-1:2000 em tampão fosfato contendo 0.01% Triton X-100 por um período de 14-18h em temperatura ambiente. Em seguida foram

lavadas 3 vezes em tampão fosfato; depois, as células foram incubadas com aglutinina-rodamina de gérmen de trigo marcadas (WGA; Vector Laboratories, USA) misturada com anticorpo anti-camundongo produzido no burro conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (Jackson Labs, USA), diluídos 1:200 e 1:100, respectivamente por um período de 2 horas. As lâminas foram então lavadas três vezes por 10 minutos e cobertas com glicerol em tampão carbonato. O material foi analisado em um microscópio de fluorescência equipado com filtros padrões e as imagens foram coletadas e montadas usando o software Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., USA). Os controles do experimento consistiram na omissão dos anticorpos primários ou da aglutinina no procedimento. Não foram obtidas marcações nesses casos.

### **3.4. Ensaios de Viabilidade Celular**

#### **3.4.1. Determinação da Viabilidade Celular (MTT)**

O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio, ou simplesmente brometo de tetrazólio (MTT), pode ser utilizado para medir a atividade metabólica de células viáveis (MOSMANN, 1983; LIU et al., 1997). O MTT é reduzido a formazan (precipitado de coloração violeta), pela succinato desidrogenase mitocondrial, uma enzima que é ativa em células com o metabolismo da cadeia respiratória intacto (Figura 5). Assim, o formazan é quantificado espectrofotometricamente e possui correlação direta com o número de células viáveis.



**Figura 5.** Reação de redução de MTT à formazan pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial.

O ensaio do MTT foi realizado conforme descrito a seguir. Todo o meio foi retirado, adicionando-se 100 uL de solução de MTT [MTT 5 mg/mL em tampão fosfato salina (PBS) e meio Neurobasal sem fenol; proporção 1:9 v/v]. Após três horas de incubação em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C, foram adicionados 100 uL da solução de lise (dimetilsulfóxido – DMSO) a cada poço. A placa foi agitada por aproximadamente 30 minutos para a solubilização dos precipitados e, em seguida, foi feita a medida de absorbância a 540 nm em leitora de Elisa (Powerwave HT – Biotek, USA).

#### 3.4.1.1. Tratamentos Farmacológicos

Os astrócitos em cultura foram incubados com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml e 1000ng/ml) por 3, 12 ou 24h e avaliada a morte celular pelo ensaio do MTT.

Em outros ensaios, previamente à incubação com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml e 1000ng/ml) as células foram expostas a diferentes tratamentos: atropina (10<sup>-5</sup>M) ou BB1101(10<sup>-5</sup> M) por 30 minutos. Após 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C, foram realizados os ensaios de MTT.

### 3.4.2. Determinação da Viabilidade Celular (Citometria de Fluxo)

#### 3.4.2.1. Determinação da Integridade da Membrana Celular

Foram adicionados às amostras 10% de uma solução de iodeto de propídeo (PI) (20mg/mL em água). Após cerca de 5 minutos, as células foram analisadas em citômetro de fluxo (Becton Dickinson, CA, USA), com excitação de 488nm do laser de argônio e detecção no canal laranja (585/42 nm). Foram adquiridos 10000 eventos por amostra e a análise foi feita usando o programa Cell Quest (Becton Dickinson, CA, USA).

#### 3.4.2.2. Avaliação da Fragmentação do DNA

Foram adicionados 300 uL de solução de PI nas amostras (50mg/mL de PI, 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton-X) e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram adquiridas e analisadas no citômetro conforme item 3.5.1.

#### 3.4.2.3. Tratamentos Farmacológicos

Os astrócitos em cultura foram incubados com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 (100ng/ml) por 24h em placa de 24 poços, 150.000cél/poço. Foi utilizada a tripsina (5 minutos, 250 µL/poço) para remoção das células e sua ação foi bloqueada pela adição de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino no mesmo volume. O conteúdo de 3 poços foi considerado como uma amostra, foi transferido para um tubo de microcentrifuga e centrifugado a 500g por 5 minutos (Eppendorf 5415C, Brinkman Instruments Inc., Westburg, N.Y., USA),. Os precipitados foram ressuspensos em 300µL de meio DMEM. Foram avaliadas a integridade da membrana celular e a fragmentação do DNA.

### **3.5. Ensaio com Radioligantes para Caracterizar a Presença do Receptor Colinérgico Muscarínico em Astrócitos.**

#### 3.5.1. Preparação de Membranas Semi-purificadas a partir de Astrócitos em Cultura



Os astrócitos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 25 mM (contendo sacarose 0,3 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM), empregando-se o homogeneizador “Ultra-Turrax” a 9.500 rpm, 2 vezes, por 30 segundos. O homogenato foi centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi separado e filtrado em camada dupla de gaze. O precipitado foi ressuspenso no mesmo tampão, novamente homogeneizado, centrifugado e filtrado nas mesmas condições anteriormente descritas. O conjunto dos sobrenadantes obtidos foi centrifugado a 37.000 rpm durante 60 min. O precipitado foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM com o auxílio de um homogeneizador “Dounce”. Todo o processo de obtenção da membrana foi desenvolvido a 4°C e a estocagem da preparação a -80°C (PORTO et al., 1992)..

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), em alíquotas das suspensões de membranas.

### 3.5.2. Estudos com Radioligantes

Em experimentos de competição, alíquotas de membranas de astrócitos foram incubadas, a 30°C, durante 60 min, com [<sup>3</sup>H] benzilato de quinuclidina ([<sup>3</sup>H] QNB) (em uma concentração próxima da constante de dissociação) (CARDOSO et al, 2004), na ausência ou na presença de concentrações crescentes de atropina (antagonista muscarínico não-seletivo). O volume final da reação foi de 500 µL. A reação foi interrompida pela adição aos incubados de 1 mL de PBS gelado (4°C), seguida de rápida filtração em filtro Whatman GF/B. Os filtros foram lavados 3 vezes com 1 mL de PBS gelado e transferidos para frascos contendo 5 mL de líquido de cintilação. A radioatividade foi determinada em contador beta (Beckman-LS 6500).

No experimento de competição, o valor da IC 50 (concentração do antagonista capaz de inibir 50% a ligação do radioligante) foi determinado por meio da análise de regressão não-linear (GraphPad Prism), e obtenção da constante de inibição (K<sub>i</sub>) pela equação de Cheng & Prusoff (1973):

$K_i = IC_{50} / (1 + [D]^* / K_D)$ , onde  $[D]^*$  corresponde à concentração do radioligante. A potência antagônica será expressa através do valor de  $pK_i$ , isto é, do logaritmo negativo da constante de inibição ( $K_i$ ).

### **3.6. Análise da Liberação de Glutamato**

As amostras foram analisadas usando-se um aparelho de Cromatografia Líquida (UFLC- Shimadzu acoplado a uma coluna C18, fase reversa, ACE 3 C18-300, 150X3.0mm), com detector UV variável, ajustado no comprimento de onda de 254nm.

A análise do glutamato foi feita utilizando-se um padrão com concentração conhecida (1mg/mL) e uma amostra de água ultra-pura com o reagente de derivatização, como o branco. O reagente de derivatização tem a seguinte composição: 350µL de etanol, 50µL de trietilamina, 50µL água Milli-Q, 50µL fenilisotiocianato. Este reagente permaneceu em repouso por 15 minutos. Após esse período este foi adicionado à amostra, permanecendo em repouso por 15 minutos. Depois de realizada a reação foi adicionada água ultra-pura para ajustar o volume final em 100 µL e foram injetados 50 µL desta solução no UFLC.

O glutamato das amostras foi identificado pelo seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, e a sua concentração determinada pela comparação com o padrão de glutamato de concentração conhecida. A dosagem foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

### **3.7. Quantificação do TNF- $\alpha$ em Cultura de Células Tumorais L929**

#### **3.7.1. Preparação das Amostras**

Os astrócitos foram colocados em placa de 24 poços em uma concentração de  $2 \times 10^4$  astrócitos/poço em 1 mL de meio DMEM + 10% SFB. As células foram incubadas por um período de 48h, em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Ao término da incubação, 770 µL do meio foram retirados e as células receberam 30 µL de meio DMEM (sem SFB) ou 30 µL da toxina (de acordo com os grupos experimentais) e foram incubadas por 5h. Após este período as placas foram colocadas sobre gelo

picado e os meios colhidos em microtubos estéreis, e centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm (Eppendorf 5415C, Brinkman Instruments Inc., Westburg, N.Y., USA),. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos estéreis e imediatamente congelados em gelo seco e estocados em freezer -80 °C.

### 3.7.2. Cultura de Células L929

As células L929, uma linhagem tumoral de fibroblastos de camundongo, sensíveis à ação lítica do TNF (FLICK & GIFFORD, 1984), foram cultivadas em meio de cultura RPMI, suplementado com gentamicina (40 µg/mL), L-glutamina (2 mM) e soro fetal bovino (10%), em garrafas plásticas de 250 mL. A cultura foi mantida em estufa, a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Ao formarem uma camada contínua na superfície da garrafa, normalmente a cada 3 dias, as células foram retiradas por tratamento com uma solução de tripsina 0,05%, por 5 minutos, à temperatura de 37°C. Posteriormente, as monocamadas foram lavadas com meio completo e, então, utilizadas para o ensaio de citotoxicidade.

### 3.7.3. Determinação das Concentrações do TNF-α

A produção de TNF-α foi avaliada por ensaio de citotoxicidade sobre células tumorais da linhagem L929 (FLICK & GIFFORD, 1984). Para tanto, estas células, suspensas em meio RPMI completo, foram semeadas ( $3,5 \times 10^4$ /poço) em placas de cultura de 96 poços, com fundo chato e incubadas, durante 24 horas, em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, 200 µL dos sobrenadantes das culturas de astrócitos foram adicionados a cada poço das placas de cultura de células L929 e diluídos de modo seriado. Foi adicionada actinomicina D (0,2 µg/mL) para inibição da síntese proteica. Seguiu-se incubação por mais 20 horas em estufa, nas mesmas condições descritas acima. Para a determinação da lise celular, foram adicionados 10 µL/poço de solução de cristal violeta a 0,5%, em ácido acético 30%. Após 15 minutos, as placas foram lavadas em água corrente e o cristal fixado nas células remanescentes foi dissolvido com 100 µL de metanol absoluto. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA, a 620 nm.

A porcentagem de lise foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de lise} = [1 - (A \text{ amostra}/A \text{ controle})] \times 100$$

Onde a amostra corresponde à absorbância obtida em uma determinada diluição da amostra titulada e, A controle, à absorbância obtida no controle das células alvo. O título de TNF, em U/mL, é definido como a recíproca da diluição onde se observa 50% de lise de célula L929. Uma curva padrão foi realizada com TNF recombinante murino, sendo 50% de citotoxicidade equivalente a 1 ng de TNF recombinante. Além disso, 0,2 µg/poço de anticorpo anti-TNF-α foram adicionados à uma série de poços para determinação da especificidade do ensaio.

### **3.8. Determinação da Produção de NO**

A concentração de óxido nítrico foi determinada de acordo com o método de Archer (1993), que se baseia na reação de quimioluminescência entre NO e Ozônio (fase gasosa). Neste método, o nitrato presente nas amostras é reduzido a NO, pela formação de nitrito, e detectado em fase gasosa.

As células foram tratadas com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9, 100ng/ml, por 24 horas. Foi retirado o sobrenadante mantendo-o em gelo e este foi estocado em freezer -80 °C até o momento de sua utilização.

As concentrações de óxido nítrico foram medidas no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Alíquotas contendo 10 µL de cada amostra foram aplicadas ao sistema analisador de óxido nítrico NOA TM280 (Sievers, USA), para reação com uma solução redutora (VCI3 0,8% em HCl 1N) e detecção do NO resultante. A partir dos registros obtidos por esse sistema, as concentrações de NO foram calculadas por extrapolação de curvas-padrão de NaNO<sub>2</sub>, utilizando-se o software Bag Program (versão 2.2 Sievers, USA), que está acoplado ao sistema NOA.

### **3.9. Avaliação da Atividade de Enzimas Antioxidantes.**

#### **3.9.1. Determinação da Atividade Enzimática da Glutathione Peroxidase (GPx)**

A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi medida indiretamente pela reação conjunta com a glutathione redutase (GR), onde a oxidação de NADPH a

NAD<sup>+</sup> é acompanhada pelo decaimento da absorvância a 340 nm e à 37°C (FLOHÉ; GUNZEL, 1984). A glutathiona oxidada (GSSH), produzida pela redução de hidroperóxidos pela GPx, é reciclada para gerar seu estado reduzido (GSH) pela GR e NADPH.

Foram adicionados, em cada poço de uma microplaca de 96 poços, tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e EDTA 1,0 mM (q.s.p. 200 µL); 40 µL de amostra; 5 µL de solução de glutathiona reduzida (GSH) 80 mM; 0,048 U de glutathiona redutase (5 µL da solução 0,0096 U/µL). Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de solução de terc-butil hidroperóxido 0,46% e 30 µL de solução de NADPH 1,20 mM. O decréscimo na absorvância foi monitorado a 340 nm por 5 minutos em leitora de Elisa (Powerwave HT – Biotek, USA). As amostras foram analisadas em duplicata.

O cálculo da atividade enzimática foi feito a partir da fórmula:

$$\text{ATIVIDADE} = \frac{[k / \text{coeficiente de absorvância molar do NADPH } (6,22 \cdot 10^{-3} / \mu\text{M/cm}) \cdot b \times 200 / V_a \times 10^{-3}] / \text{PROTEÍNA}}$$

Onde:

- *Atividade*: atividade específica da GPx dado em µmol de NADPH consumido/minuto/mg de proteína;
- *k*: coeficiente angular da reta de decaimento dado em 1/minuto;
- *b*: caminho óptico (0,524 cm);
- 200/*V<sub>a</sub>*: diluição da amostra na microplaca;
- concentração de proteína, em mg/mL, na amostra.

### 3.9.2. Determinação da atividade enzimática da Glutathiona Redutase (GR)

A atividade da GR é medida diretamente utilizando NADPH como co-fator na redução da GSSG a GSH. De maneira semelhante ao ensaio da GPx, a oxidação de

NADPH a NADP+ é acompanhada pelo monitoramento da absorvância nas mesmas condições da GPx .

Foram preparados 2,5 mL de meio reagente no momento do uso, contendo 1 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e EDTA 1,0 mM; 0,75 mL de EDTA 0,005 M; 0,75 mL de água deionizada, 5 mg de glutationa oxidada (GSSG) e 1 mg de NADPH. Foram adicionados, em cada poço de uma microplaca de 96 poços, 50 µL de amostra e meio reacional (q.s.p. 200 µL).

O decréscimo na absorvância foi monitorado a 340 nm por 10 minutos. As amostras foram analisadas em duplicata.

O cálculo da atividade enzimática foi feito a partir da fórmula:

$$\text{ATIVIDADE} = \left[ \frac{k}{\text{coeficiente de absorvidade molar do NADPH (6,22} \cdot 10^{-3} / \mu\text{M/cm)} \cdot b \times 200 / V_a \times 10^{-3}} \right] / \text{PROTEÍNA}$$

Onde:

- *Atividade*: atividade específica da GPx dado em µmol de NADPH consumido/minuto/mg de proteína;
- *k*: coeficiente angular da reta de decaimento dado em 1/minuto;
- *b*: caminho óptico (0,524 cm);
- 200/*V<sub>a</sub>*: diluição da amostra na microplaca;
- concentração de proteína, em mg/mL, na amostra.

### 3.9.3. Determinação da Atividade Enzimática da Glutathione S- Transferase (GST)

A atividade da GST é determinada pela formação de um complexo entre a GSH e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), o qual é medido

espectrofotometricamente. O aumento de absorvância é monitorado a 340 nm e a 25 °C e é diretamente proporcional à atividade da GST na amostra.

Foram adicionados, em cada poço de uma microplaca de 96 poços, 40 µL de amostra, tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 (q.s.p. 200 µL) e 5 µL de solução de CDNB 0,1 M. Essa mistura foi pré-incubada por 2 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 15 µL de GSH 0,1 M. O aumento de absorvância foi monitorado a 340nm por 5 minutos à 25°C. As amostras foram analisadas em duplicata.

O cálculo da atividade enzimática foi feito a partir da fórmula:

$$\text{ATIVIDADE} = \left[ \frac{k}{\text{coeficiente de absorvidade molar do CDNB}} \left( \frac{9,60 \cdot 10^{-3}}{\mu\text{M/cm}} \right) \cdot b \times \frac{200}{V_a} \times 10^{-3} \right] / \text{PROTEÍNA}$$

Onde:

- *Atividade*: atividade específica da GPx dado em µmol de NADPH consumido/minuto/mg de proteína;
- *k*: coeficiente angular da reta de decaimento dado em 1/minuto;
- *b*: caminho óptico (0,524 cm);
- $\frac{200}{V_a}$ : diluição da amostra na microplaca;
- concentração de proteína, em mg/mL, na amostra.

### **3.10. Identificação da Morfologia Celular em Microscopia de Fluorescência Confocal**

A microscopia confocal utiliza a iluminação pontual e um pequeno orifício, chamado pinhole, em um plano conjugado opticamente em frente ao detector para eliminar toda a informação fora do foco, detectando-se apenas a luz dentro do plano focal, aumentando a qualidade da imagem.

A morfologia das células foi observada em microscópio confocal de fluorescência utilizando um filtro azul e aumento de 40 vezes. Laranja de acridina (LA) e brometo de etídio (BE) são corantes que se intercalam ao DNA celular, os quais exibem fluorescência sob excitação de uma luz ultravioleta. LA tem a característica de penetrar no interior celular, independente de sua integridade, enquanto que BE somente penetra em células que apresentam danos de membrana celular. Por meio de um filtro azul e da luz ultravioleta, as células coradas com LA são visualizadas em verde, enquanto que as células coradas com BE são visualizadas em laranja. Como BE é um corante mais potente, sua coloração encobre a coloração do LA quando ambos estão no interior das células, tornando as células totalmente coradas em laranja (MERCILLE e MASSIE, 1994). As amostras dos cultivos celulares em lamínulas dentro de microplacas de 12 poços, cada um contendo cerca de  $5 \times 10^3$  células, foram misturadas em igual volume com uma solução contendo 100 µg/mL de LA e 100 µg/mL de BE. Como conservante de fluorescência, foi utilizado Mowiol (Calbiochem) e Dabco (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA).

### **3.11. Análise Estatística**

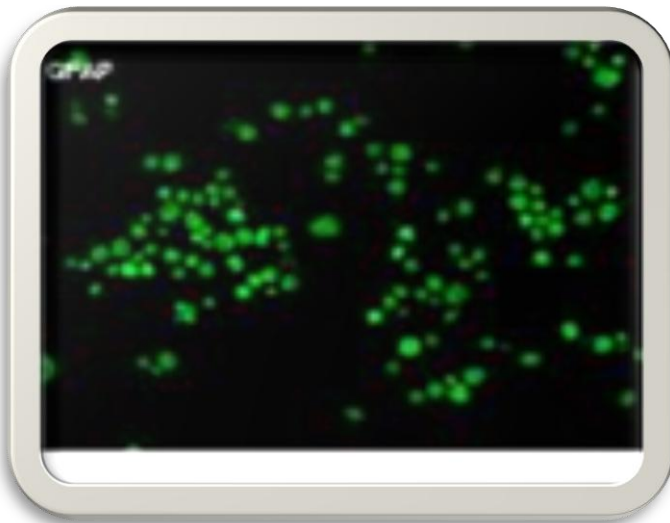
Para comparação entre mais de dois grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA unifatorial ou bifatorial), seguida do teste de comparação múltipla de Newmann- Keuls ou de Dunnett. Foi utilizado o programa GraphPad Prism v. 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) e Start LSM Image Browser.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização da Cultura Celular por Imunocitoquímica

A figura 6 mostra a cultura de astrócitos isolados. Estas culturas foram validadas e caracterizadas por imunomarcção com proteína fibrilar glial ácida (GFAP), um marcador específico para células da astroglia, e OX-42, que é um marcador específico para anticorpos da microglia. O WGA foi utilizado como um marcador de pinealócitos. A cultura de astrócitos isolados apresentou fluorescência na presença de GFAP (Figura 6), e não mostrou na presença de OX-42 e WGA (dados não mostrados), validando o modelo de cultura utilizado.



**Figura 6.** Cultura de astrócitos isolados marcados com GFAP

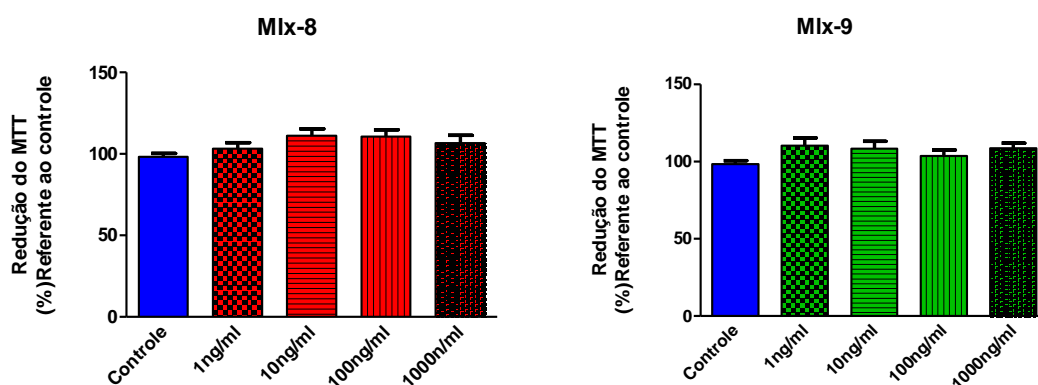
### 4.2. Ensaio de Viabilidade Celular

#### 4.2.1. Determinação da Viabilidade Celular (MTT)

Os resultados apresentados nas Figuras 7, 8 e 9 mostram a porcentagem de astrócitos viáveis em relação ao controle quando incubados com diferentes concentrações das toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 por 3, 12 ou 24 horas. Houve uma

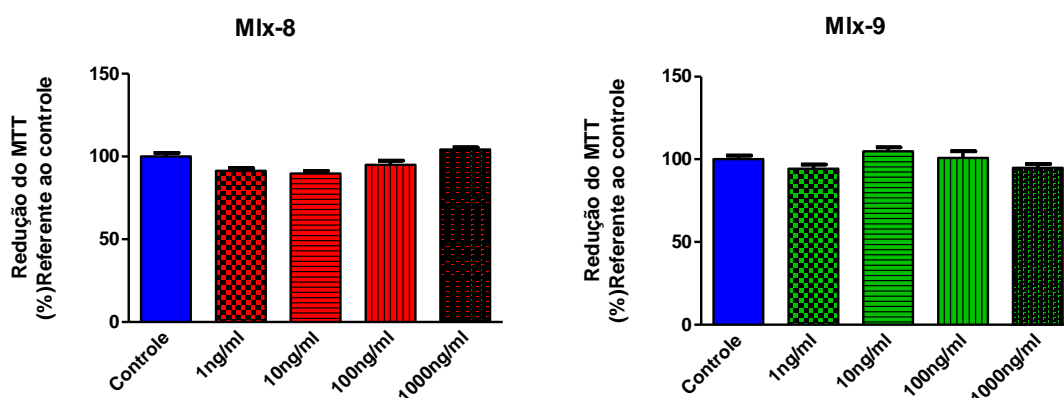
redução estatisticamente significativa da viabilidade celular somente no tempo de 24 horas em todas as concentrações utilizadas para ambas as toxinas (Viabilidade celular em relação ao grupo controle: Mlx-8 1ng/ml: 75,33%; 10ng/ml: 71,06%; 100ng/ml: 77,77%, 1000ng/ml: 81,39%. Mlx-9 1ng/ml: 77,10%; 10ng/ml: 77,87%; 100ng/ml: 85,54%; 1000ng/ml: 81,47%).

### 3 horas



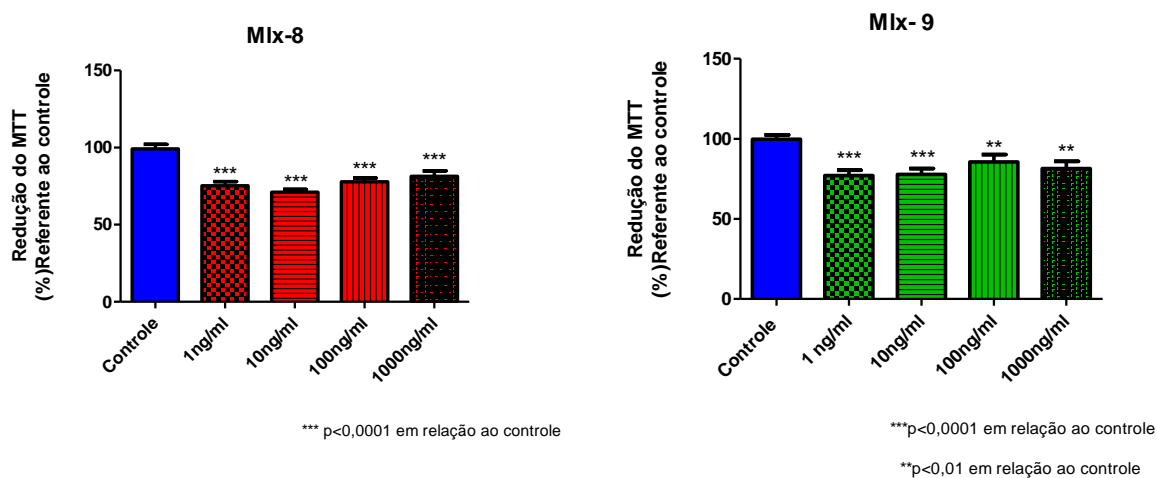
**Figura 7.** Quantificação dos astrócitos viáveis expostos a diferentes concentrações das toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml) por 3 horas (n=14).

### 12 horas



**Figura 8.** Quantificação dos astrócitos viáveis expostos a diferentes concentrações das toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml) por 12 horas (n=14).

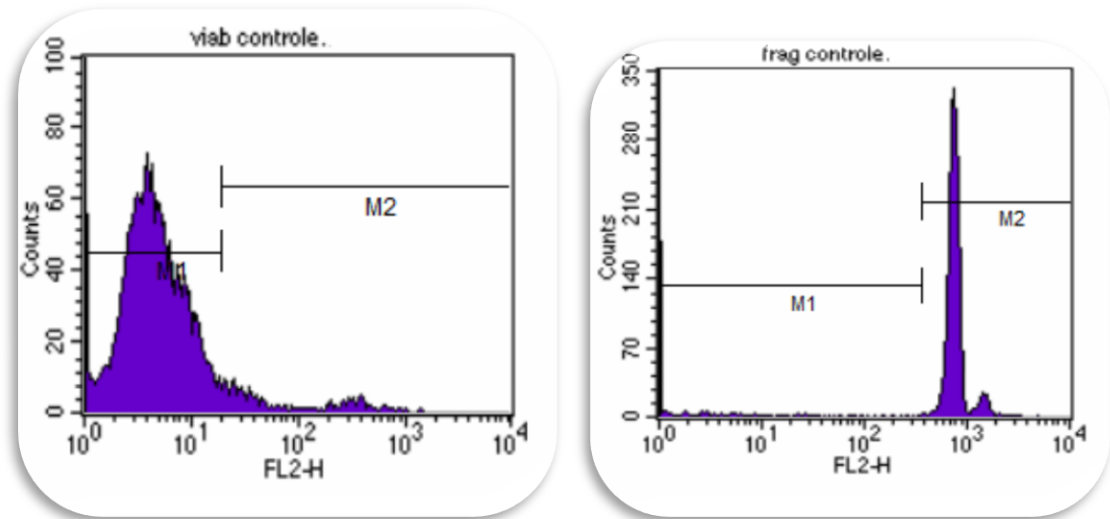
## 24 horas



**Figura 9.** Quantificação dos astrócitos viáveis expostos a diferentes concentrações das toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml) por 24 horas. \*\*\*p<0,0001, \*\*p<0,01 em relação ao controle (ANOVA e comparação múltipla de Newmann- Keuls) (n=30).

### 4.2.2. Determinação da Viabilidade Celular (Citometria de Fluxo)

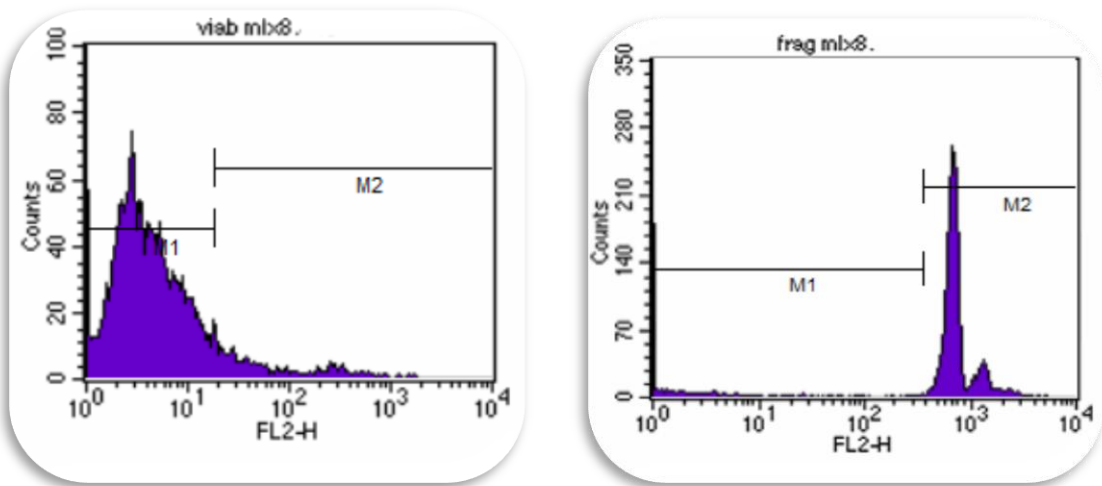
Optou-se por usar a concentração de 100ng/mL nos experimentos subsequentes, uma vez que se obteve uma boa resposta e que esta não foi a concentração máxima utilizada. A viabilidade dos astrócitos tratados com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9, 100ng/mL por 24 horas foi determinada pela fragmentação do DNA e integridade da membrana, representadas nos histogramas (Figuras 10, 11 e 12). Foi observada uma tendência muito acentuada, embora não significativa estatisticamente, para redução de viabilidade celular demonstrada pela fragmentação do DNA das células tratadas com a toxina Mlx-8 (100ng/mL) (Figura 13).



A

B

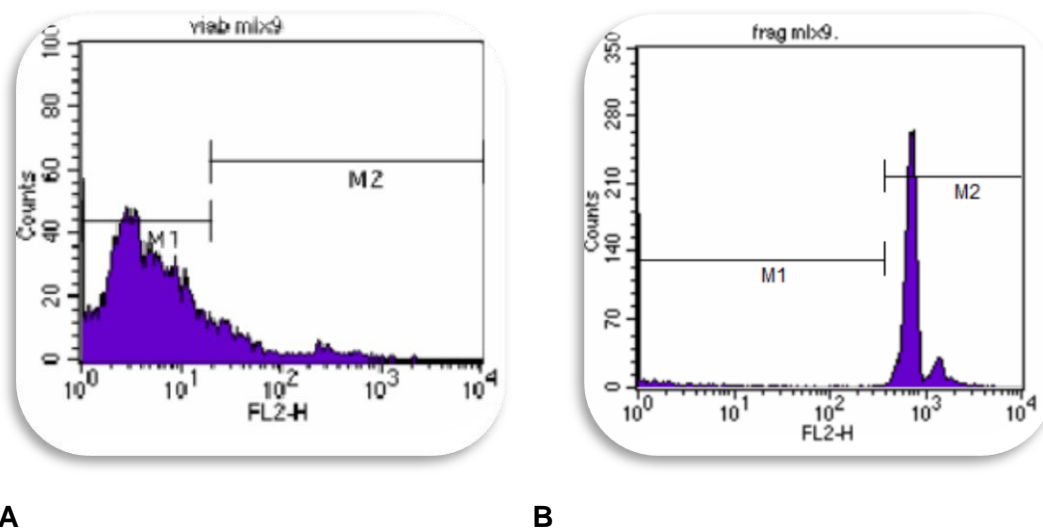
**Figura 10.** Histogramas representativos da viabilidade celular dos astrócitos. A) Integridade da membrana. B) Fragmentação do DNA. Controle (n=3)



A

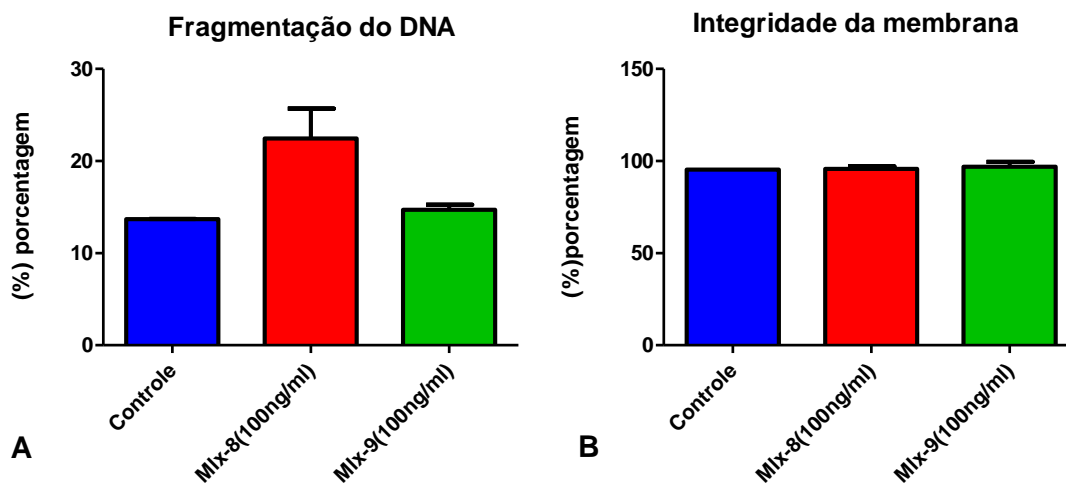
B

**Figura 11.** Histogramas representativos da viabilidade celular dos astrócitos. A) Integridade da membrana. B) Fragmentação do DNA. Tratados com a toxina Mlx-8 (100ng/ml) por 24h (n=3).



**Figura 12.** Histogramas representativos da viabilidade celular dos astrócitos. A) Integridade da membrana. B) Fragmentação do DNA. Tratados com a toxina Mlx-9 (100ng/ml) por 24h (n=3).

### Viabilidade Celular



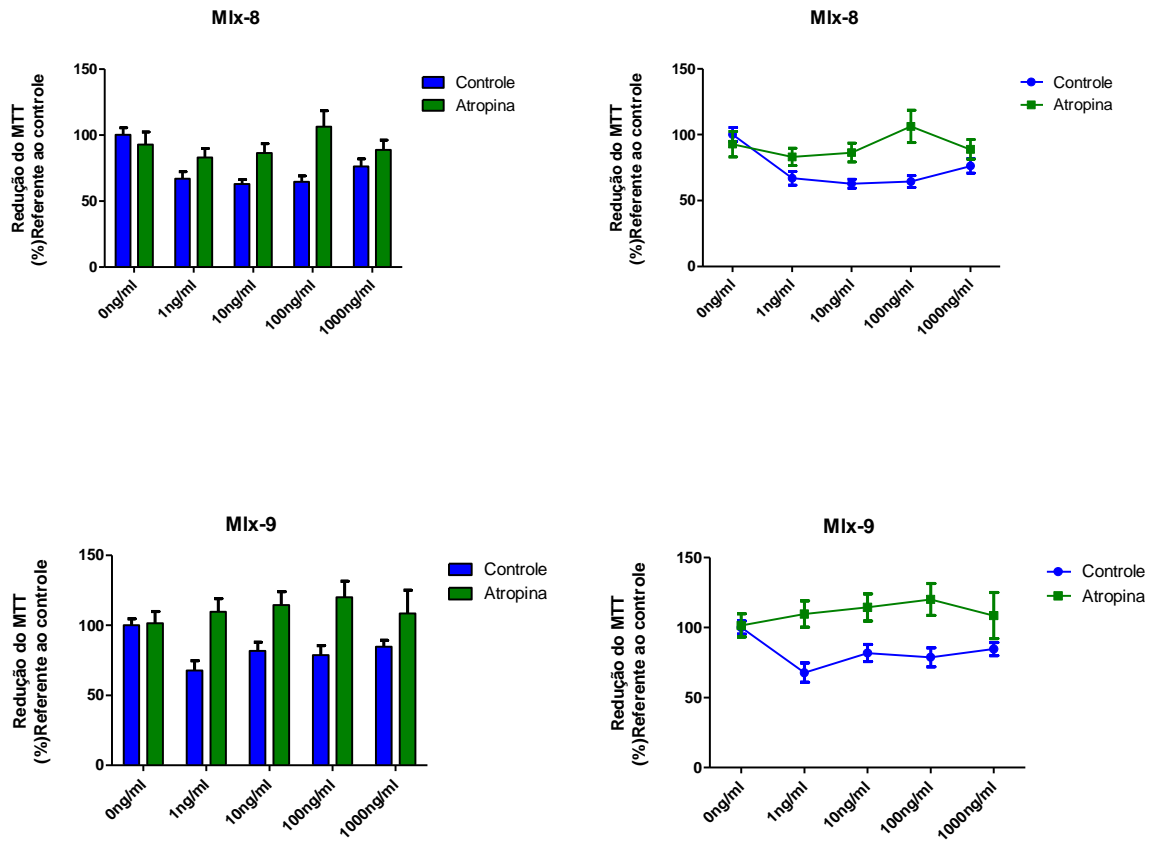
**Figura 13.** Viabilidade celular dos astrócitos tratados com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9, demonstrada pela fragmentação do DNA (A) e Integridade da membrana (B) (n=3)

### **4.3. Determinação do Envolvimento da Via Colinérgica Muscarínica**

#### **4.3.1. Determinação da Viabilidade Celular (MTT) usando Antagonista Muscarínico (Atropina)**

A Figura 14 mostra a porcentagem de células viáveis na cultura de astrócitos quando incubada por 30 minutos com atropina ( $10^{-5}M$ ) e posteriormente com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 em 4 diferentes concentrações (1, 10, 100, 1000ng/mL) por 24 horas. A toxina Mlx-8 em diferentes concentrações quando incubada juntamente com atropina teve seu efeito revertido, pois houve aumento da viabilidade celular. O mesmo ocorreu com a Mlx-9.

## Atropina/ Mlx-8 ou Mlx9

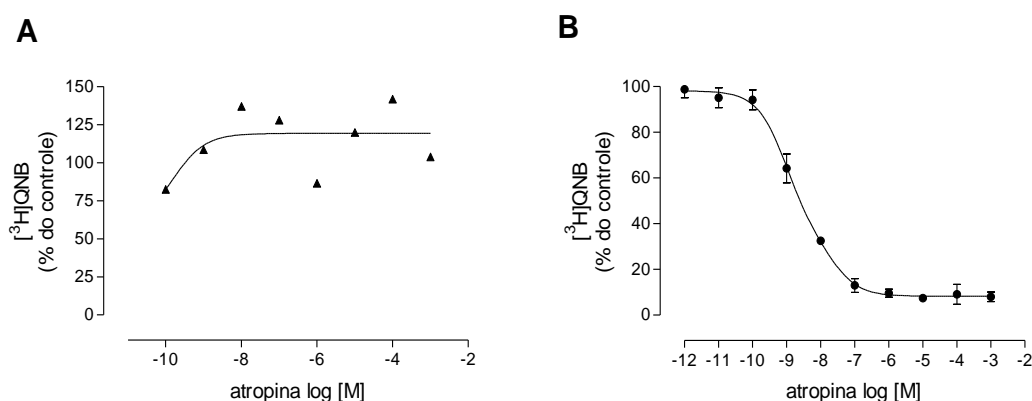


**Figura 14.** Quantificação de células viáveis (astrócitos) expostas a diferentes concentrações das toxinas Mlx-8 e Mlx-9 (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml) e incubadas com atropina ( $10^{-5}M$ ) por 24 horas. (ANOVA bifatorial: significativa para tratamento, concentração e interação) (n=8).

#### 4.3.2. Caracterização do Receptor Colinérgico Muscarínico em Astrócitos.

Na figura 15A está representada a curva de deslocamento da ligação do [<sup>3</sup>H]QNB (concentração próxima ao valor de  $K_D$ ), pela atropina, em preparação de membrana obtida de astrócitos de ratos, utilizando a concentração de proteína de 100  $\mu$ g. Nesta concentração, não houve deslocamento da ligação do [<sup>3</sup>H]QNB, nas membranas de astrócitos.

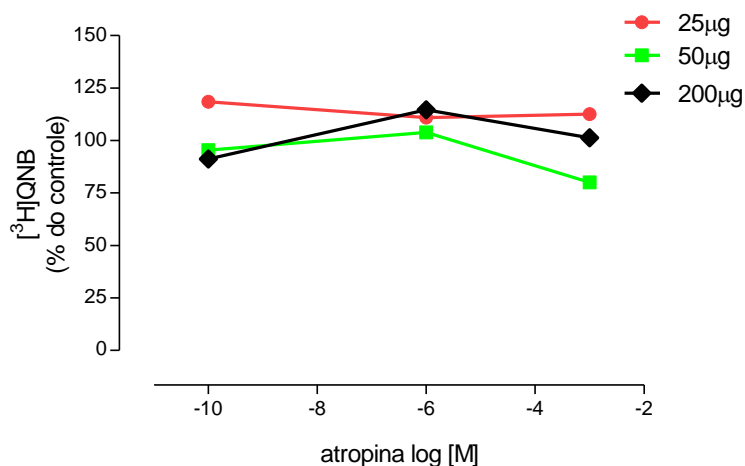
Por outro lado, quando a mesma concentração de proteína foi utilizada em preparação de membrana de hipocampo de ratos (controle positivo), a atropina foi capaz de deslocar a ligação do [<sup>3</sup>H]QNB (Figura 15B). O valor de  $pK_i$  (logarítmo negativo da constante de inibição) da atropina foi de  $8,39 \pm 0,07$  ( $n=4$ ). Além disso, a curva de deslocamento da ligação do [<sup>3</sup>H]QNB, pela atropina foi monofásica e apresentou coeficiente de Hill ( $n_H$ ) próximo da unidade.



**Figura 15.** Curva de deslocamento da ligação do [<sup>3</sup>H]QNB obtida em ensaios utilizando a concentração de 100  $\mu$ g de proteína em preparação de membrana de células de astrócito de rato (A) e de hipocampo de rato (controle positivo) (B), pela atropina. Os resultados em (A) são relativos a 1 experimento realizado em duplicata. Os resultados em (B) são as médias  $\pm$  SEM de 4 experimentos, expressas como porcentagem do valor obtido na ausência da atropina.

Posteriormente, foram realizados ensaios utilizando diferentes concentrações de proteína, em membrana de astrócitos de ratos. As concentrações utilizadas foram de 25, 50 e 200 $\mu$ g. Entretanto, em nenhuma dessas concentrações a atropina foi capaz de deslocar a ligação do [<sup>3</sup>H]QNB nas membranas de astrócitos (Figura 16).

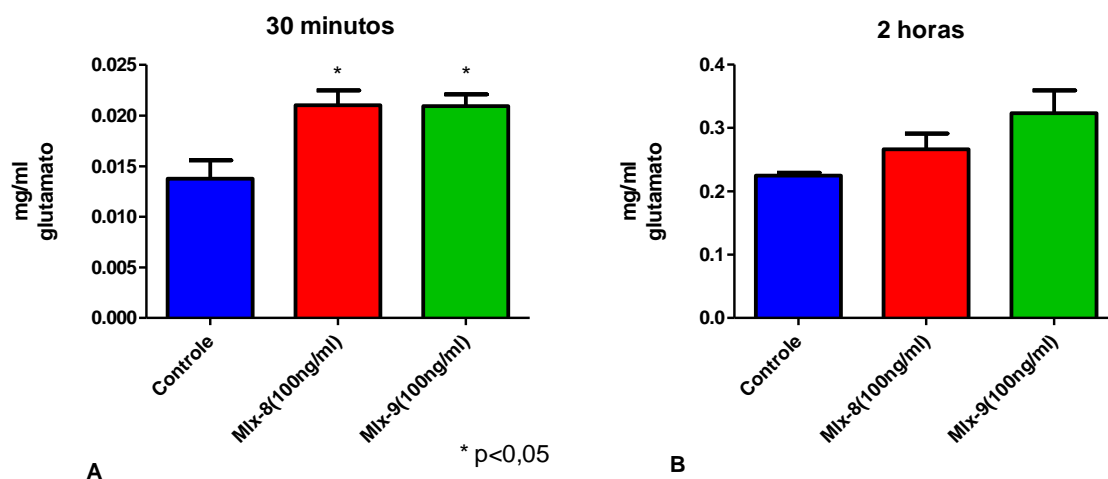




**Figura 16.** Curva de deslocamento da ligação do [<sup>3</sup>H]QNB obtida em ensaios utilizando diferentes concentrações de proteína (25, 50 e 200 µg), em preparação de membrana de astrócitos de rato, pela atropina. O resultado é relativo a 2 experimentos realizados em duplicata.

#### 4.4. Determinação da Concentração de Glutamato Liberada

As Figuras 17, A e B representam as concentrações de glutamato no meio de cultura de astrócitos quando incubados com as toxinas Mlx-8 (100ng/mL) ou Mlx-9 (100ng/mL). Ocorreu o aumento da concentração de glutamato em relação ao controle nas células tratadas tanto com a toxina Mlx-8 como com a toxina Mlx-9, sendo estatisticamente significativo para ambas no tempo de 30 minutos após a incubação com as mesmas (Figura 17 A).



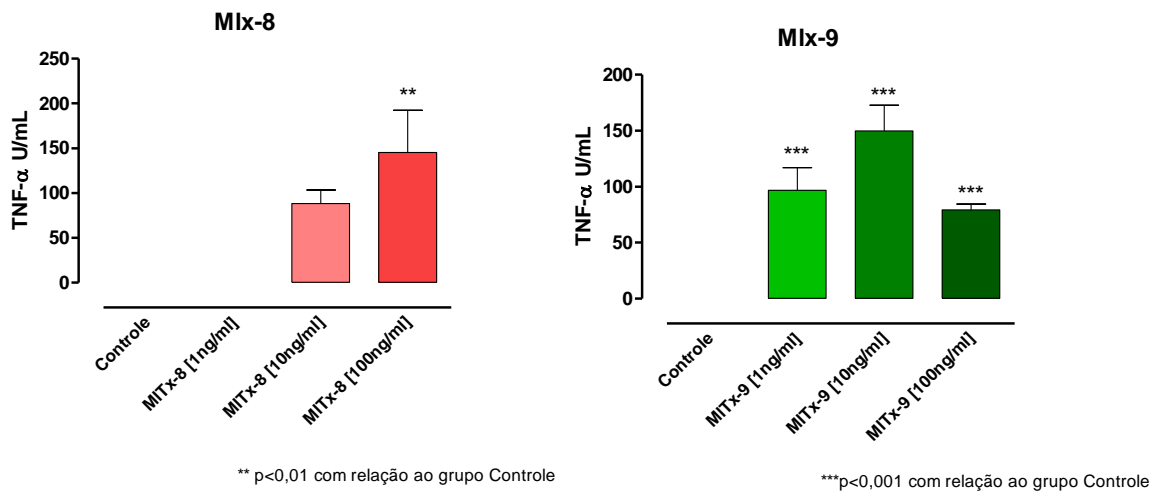
**Figura 17.** Concentração de glutamato (mg/mL) liberado no meio de cultura de astrócitos após meia hora (A) ou 2 horas de tratamento (B) com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 (100ng/mL). \*p<0,05 em relação ao controle (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls) (n=3)

#### 4.5. Avaliação do Envolvimento do TNF- $\alpha$

##### 4.5.1. Determinação da Concentração de TNF- $\alpha$ Liberado

Na Figura 18 pode-se observar que houve um aumento na liberação do TNF- $\alpha$  quando os astrócitos foram incubados por 5h com as toxinas Mlx-8 (10 e 100ng/mL) ou Mlx-9 (1,10, 100 ng/mL) em relação ao controle .

## TNF- $\alpha$

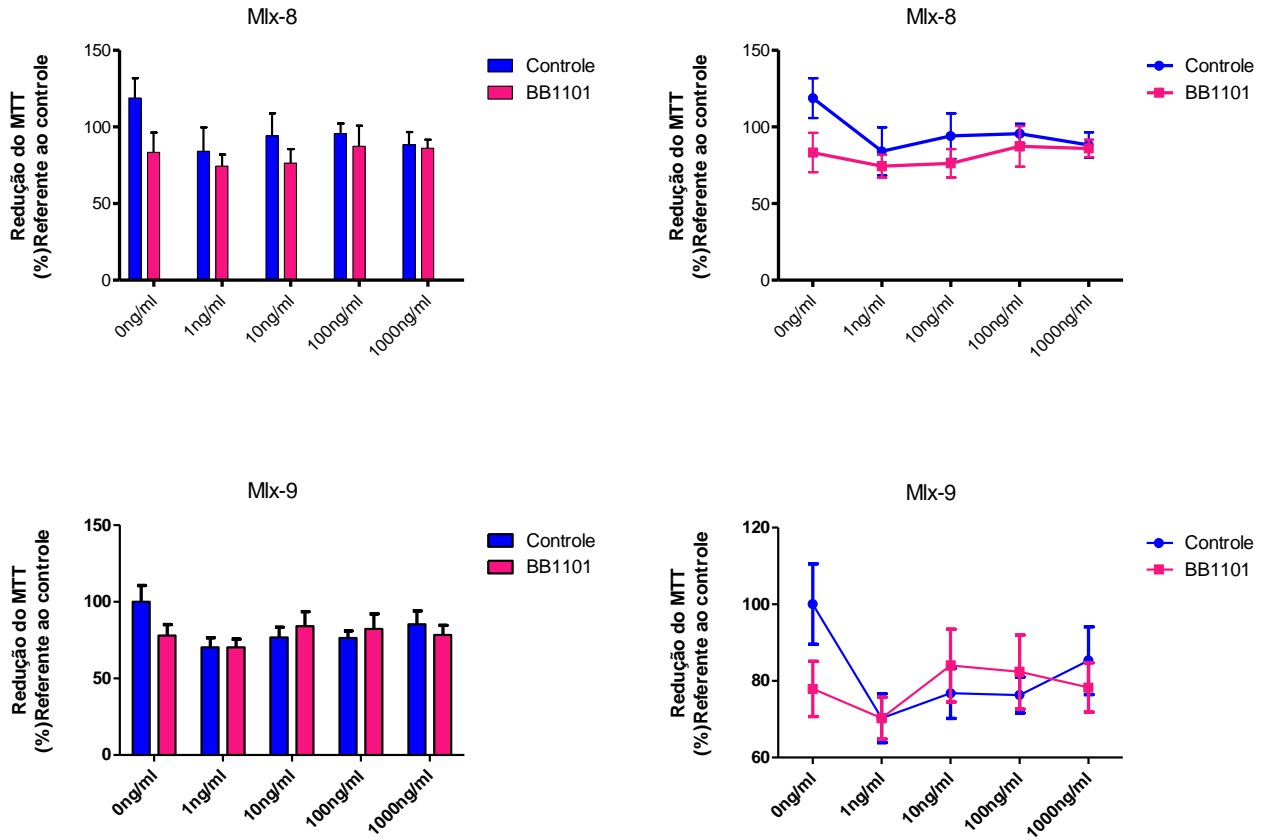


**Figura 18.** Concentração de TNF- $\alpha$  (U/ml) em cultura de astrócitos após 5 horas de tratamento com as toxinas Mlx-8 (100ng/ml) ou Mlx-9 (100ng/ml). \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 em relação ao controle (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls) (n=6).

### 4.5.2. Determinação da Viabilidade Celular (MTT) usando o Inibidor da TACE (BB1101)

O BB1101 (inibidor da enzima conversora do TNF- $\alpha$ ) ( $10^{-5}$ M) não reverteu a redução da viabilidade celular avaliada pelo método do MTT induzida pelas toxinas Mlx-8 e Mlx-9 nas diferentes concentrações em cultura de astrócitos (Figura 19).

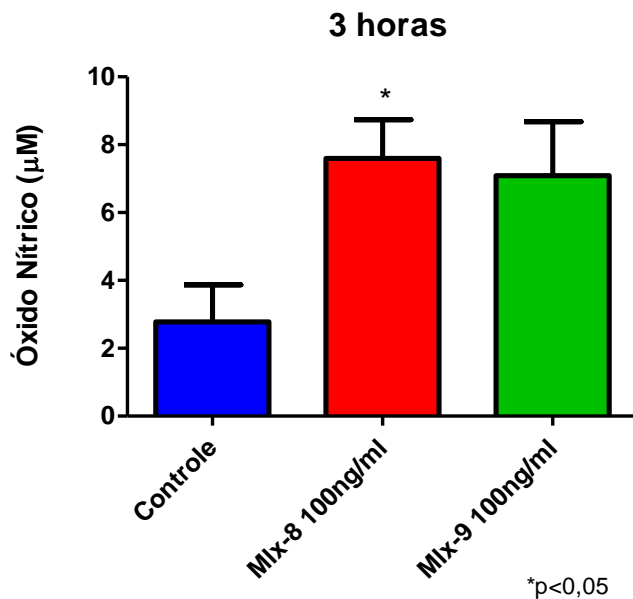
## BB1101/Mlx-8 ou Mlx-9



**Figura 19.** Quantificação dos astrócitos viáveis quando expostos a diferentes concentrações das toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 por 24h (1, 10, 100,1000ng/mL) e incubadas previamente com o BB1101 ( $10^{-5}$ M) (ANOVA bifatorial) (n=8).

### 4.6. Determinação da Produção de NO

A Figura 20 mostra as concentrações de óxido nítrico (em  $\mu$ M) em cultura de astrócitos após 3 horas de exposição às toxinas Mlx-8 (100ng/mL) ou Mlx-9 (100ng/mL). Apesar de ambas as toxinas demonstrarem uma tendência de aumentar o NO, apenas a toxina Mlx-8 (100ng/mL) foi capaz de aumentar significativamente os níveis de óxido nítrico em relação ao controle.



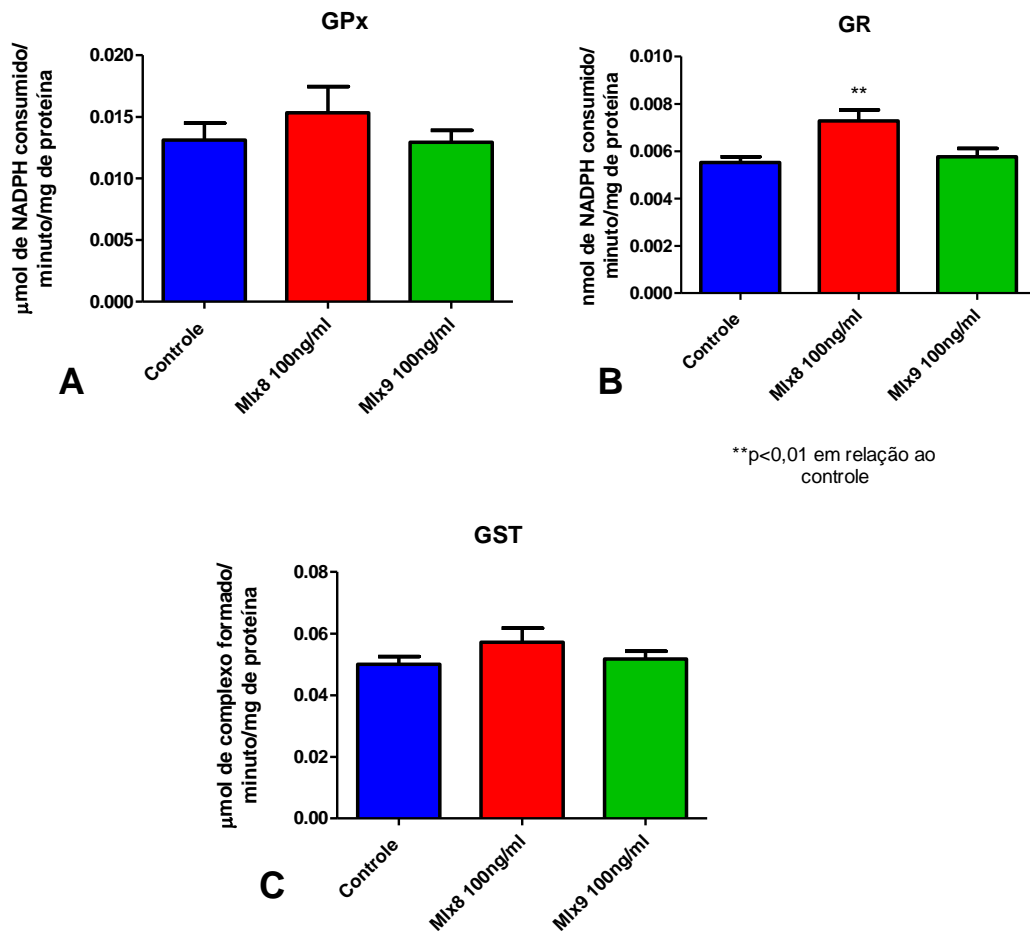
**Figura 20.** Concentração de óxido nítrico em cultura de astrócitos após 3 horas de tratamento com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 (100ng/mL). \*p<0,05 (ANOVA e comparação múltipla de Dunnett) (n=3).

#### 4.7. Atividade das Enzimas Antioxidantes

A atividade enzimática das enzimas GPx, GR e GST foram determinadas após 3 horas de incubação com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9, 100ng/mL, uma vez que, após 24 horas, houve redução da viabilidade celular demonstrada pelo ensaio de MTT.

Não foi observada diferença significativa na atividade das enzimas GPx e GST dos grupos tratados com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 em relação ao grupo controle (Figura 21, A e B). Houve um aumento significativo na atividade da enzima GR no grupo tratado com Mlx-8 em relação ao controle (Figura 21, C).

### Enzimas antioxidantes



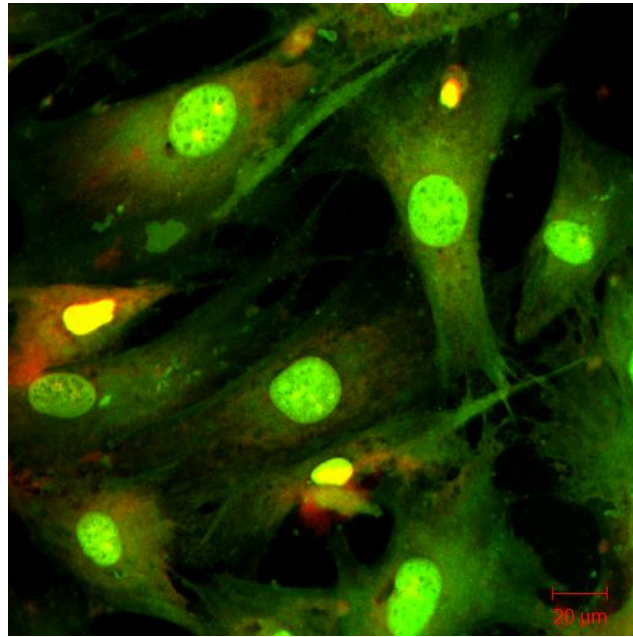
**Figura 21.** Atividade enzimática da glutatona peroxidase (GPx) **(A)**, glutatona redutase (GR) **(B)** e glutatona S-transferase (GST) **(C)**, após 3 horas de incubação com as toxinas Mlx-8 (100ng/mL) ou Mlx-9 (100ng/mL). A atividade das enzimas GPx e GST não demonstraram diferença significativa. A atividade da enzima GR mostrou diferença significativa pelo tratamento com a toxina Mlx-8 em relação ao controle (\*\*p<0,01) (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls) (n=8).

#### **4.8. Ensaio de Morfologia Celular em Microscopia de Fluorescência Confocal.**

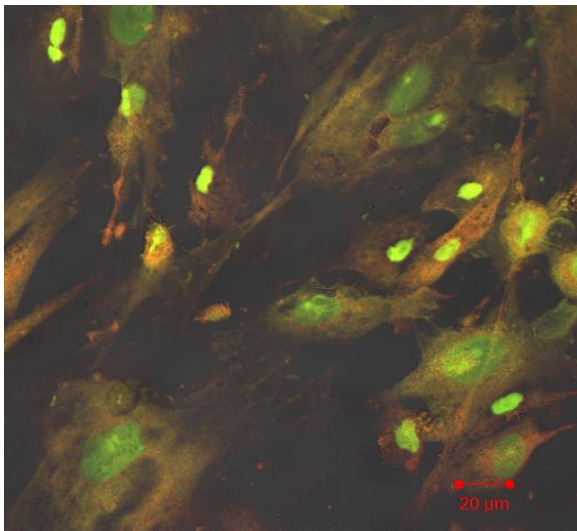
A técnica de coloração pelos corantes fluorescentes laranja de acridina (LA) e brometo de etídeo (BE) permite detectar células apoptóticas ou necróticas em microscopia de fluorescência.

As células viáveis são coradas uniformemente em verde, sem alteração no núcleo e citoplasma (Figura 22 A).

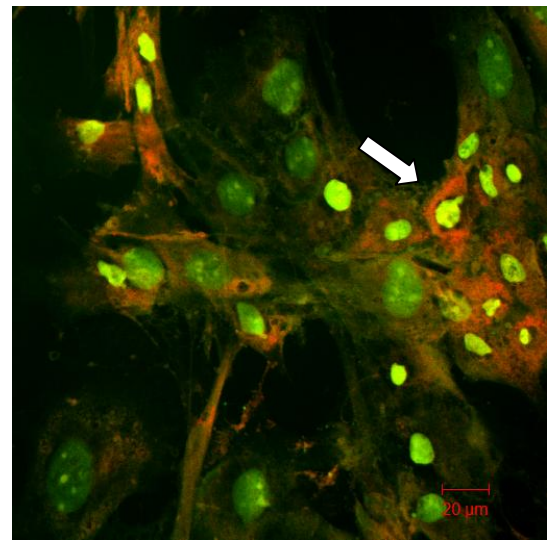
As Figuras 22 e 23 evidenciam as alterações morfológicas desencadeadas por cada toxina após 24 horas de tratamento. Células coradas intensamente em vermelho, de uma maneira uniforme, apresentando retração nuclear e núcleo em laranja, podem indicar um processo de apoptose (Figura 22C) (seta branca), assim como um volume celular reduzido e alteração na integridade da membrana.



(A)



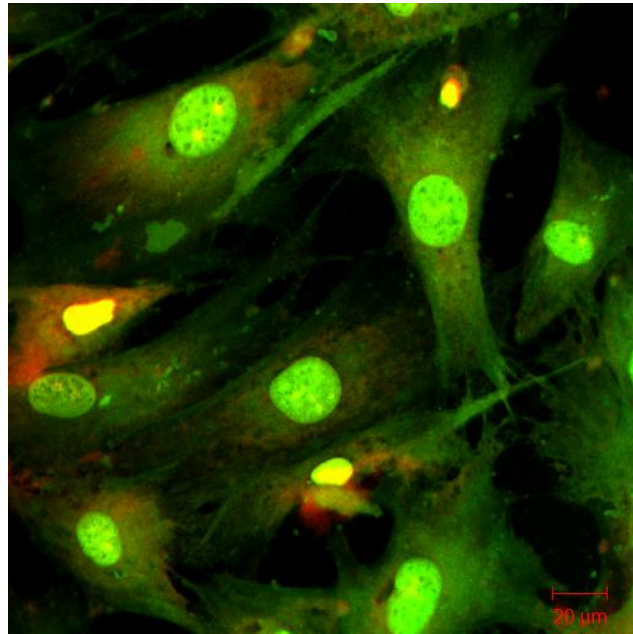
(B)



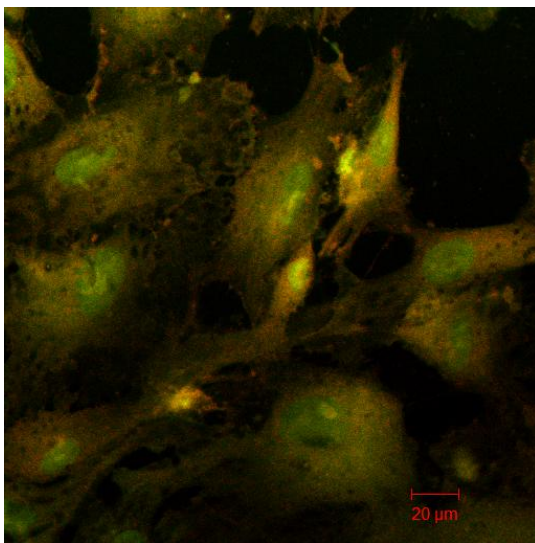
(C)

**Figura 22.** Fotomicrografias obtidas em microscópio confocal (Aumento de 40 x). **A)** células do controle; **B)** células tratadas com Mix-8 100ng/ml por 24 horas; **C)** células tratadas com Mix-8 1000 ng/ml por 24 horas.

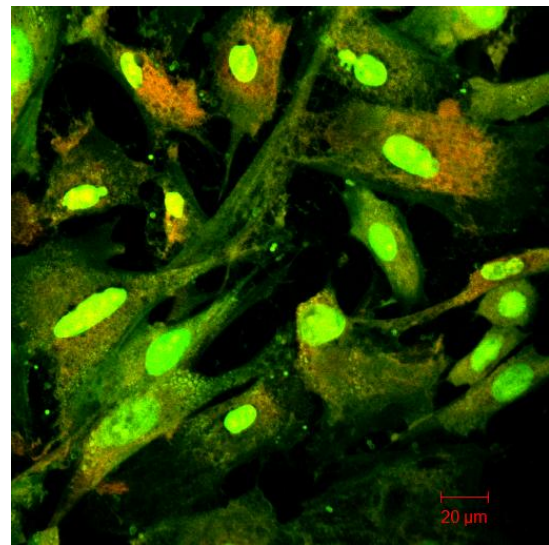




(A)



(B)



(C)

**Figura 23.** Fotomicrografias obtidas em microscópio confocal (Aumento de 40 x). **A)** células do controle **B)** células tratadas com Mlx-9 100ng/ml por 24 horas; **C)** células tratadas com Mlx-9 1000 ng/ml por 24 horas.

## 5. DISCUSSÃO

Toxinas de origem animal têm sido consideradas como ferramentas importantes para o estudo de diferentes processos biológicos.

Este estudo foi realizado utilizando duas frações semi-purificadas, Mlx-8 e Mlx-9, isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* e que apresentam alto grau de purificação. Essas toxinas apresentam atividade fosfolipásica (OLIVEIRA et al., 2008) e juntamente com as toxinas de três dígitos (3FTx), representam os componentes principais do veneno das serpentes do gênero *Micrurus* (LEAO et al., 2009).

As toxinas fosfolipásicas A<sub>2</sub> de venenos elapídicos atuam sobre a junção neuromuscular como um alvo importante, mas elas são também extremamente ativas e/ou neurotóxicas quando administradas diretamente no sistema nervoso central (OLIVEIRA et al., 2008) e em modelos de cultura de neurônios (MONTECUCCO; 2008, CARVALHO; 2010), onde tiveram seus mecanismos de ação estudados.

Assim como a cultura de células neuronais é um modelo de estudo para toxinas fosfolipásicas, células da glia como os astrócitos também desempenham essa função, podendo contribuir para elucidar os mecanismos de ação de toxinas de venenos. Com o crescimento de estudos relacionados a células da glia cresce também o entendimento do papel da glia no SNC, em que estas células estão sendo apontadas como estando envolvidas em processos neurodegenerativos (HALASSA et al., 2007; PANANASCH et al., 2012).

Na primeira etapa do projeto analisou-se a viabilidade celular de astrócitos, provenientes da glândula pineal, após o tratamento com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus*.

Primeiramente foi utilizado o método de MTT, o qual se baseia na redução do MTT a formazan pela succinato desidrogenase mitocondrial, uma enzima que é ativa em células com metabolismo intacto. A redução na atividade desta enzima se reflete

na coloração desenvolvida e tem uma correlação direta com o número de células viáveis, sendo quantificadas espectrofotometricamente (MOSMANN, 1983; LIU et al., 1997).

Para esta análise de viabilidade foram utilizadas diferentes concentrações das toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 (1, 10, 100 e 1000ng/mL) em tempos distintos (3, 12 e 24 horas de incubação). Houve uma redução significativa da viabilidade celular quando os astrócitos foram tratados com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9, mas somente após 24 horas de incubação, sem apresentar uma relação dependente de concentração. A redução foi em torno de 25% em relação ao controle quando as células foram incubadas com a toxina Mlx-8 e em torno de 20% em relação ao controle quando incubadas com a toxina Mlx-9.

Além do método do MTT, que avalia a integridade mitocondrial, avaliou-se também a integridade da membrana e a fragmentação do DNA através da citometria de fluxo. As membranas não demonstraram alterações em sua integridade e apesar de não haver uma diferença significativa foi observada uma tendência acentuada na fragmentação do DNA nas células tratadas com a toxina Mlx-8 (100ng/mL) em comparação com o controle.

Utilizando a microscopia de fluorescência confocal, com os marcadores brometo de etídio e laranja de acridina, foi possível observar as alterações morfológicas típicas de apoptose como retração nuclear, volume celular reduzido e alteração da membrana celular para ambas as toxinas. Da mesma forma que o observado nos astrócitos, as toxinas induziram o mesmo aspecto em neurônios hipocámpais em cultura (CARVALHO, 2010).

Na morte celular por necrose ocorrem alterações da função mitocondrial, com o aumento do  $Ca^{2+}$  citosólico, induzindo a ativação de fosfolipases e proteases, que juntamente com o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzem a ruptura da membrana plasmática (ORRENIUS, 2011).

Nos processos de apoptose, as células tornam-se arredondadas e se retraem do contato com as células vizinhas. Após o estímulo que desencadeia a apoptose,

que pode ocorrer por duas vias distintas, a “via intrínseca” e a “via extrínseca”, as caspases são ativadas (ORRENIUS, 2011).

A via extrínseca é iniciada através da ativação de receptores de morte da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral. Este é caracterizado por um domínio extracelular rico em cisteína, possibilitando o reconhecimento de seus ligantes (ORRENIUS, 2011).

A via intrínseca é ativada por fatores extracelulares ou intracelulares como a privação de fatores de crescimento, hipóxia ou danos no DNA. Estes fatores convergem para a mitocôndria, causando alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol, levando a formação do complexo apoptossomo. A caspase-9 ativa pode então clivar as caspases efetoras subsequentes (ORRENIUS, 2011).

A lesão da mitocôndria é causada por quase todos os agentes nocivos e tem como consequência a permeabilidade mitocondrial, que impede a manutenção da cadeia respiratória, do potencial e do gradiente de pH na organela (ORRENIUS, 2011).

A tendência da fragmentação do DNA sem ruptura da membrana caracterizada na cultura de astrócitos incubados com a toxina Mlx-8 pode ser decorrente de uma via de morte programada, apoptótica, ocasionada pela fragmentação do DNA.

Alguns estudos sugerem que somente a atividade enzimática não seja suficiente para explicar todos os efeitos tóxicos causados pelas neurotoxinas fosfolipásicas (ROSENBERG et al., 1989; KRIZAJ, 2007; KAO et al., 2007; 2012).

HUANG e colaboradores (2008) isolaram uma toxina da serpente *Naja atra*, que tem alta afinidade pelos receptores colinérgicos muscarínicos, atuando como agonista e também apresentando atividade enzimática de FLA2 mostrando que algumas toxinas podem ter ambas as características.

Na tentativa de elucidar o mecanismo de ação das toxinas e seu envolvimento com a via colinérgica muscarínica analisou-se a viabilidade mitocondrial dos astrócitos quando incubados com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 (1, 10, 100, 1000ng/mL) na presença ou não de atropina, que é um antagonista não seletivo de receptores muscarínicos.

A toxina Mlx-8 em diferentes concentrações quando incubada juntamente com atropina teve seu efeito revertido, pois houve aumento da viabilidade celular. O mesmo ocorreu com relação à Mlx-9.

Há evidências imunológicas que apoiam a ideia de que astrócitos *in situ* expressam receptores colinérgicos do subtipo muscarínico (VAN DER ZEE et al., 1989, 1993), porém não há estudos com relação à presença de receptores muscarínicos em astrócitos da glândula pineal. Para investigar o efeito das toxinas em receptores muscarínicos avaliou-se a presença desses receptores no modelo de astrócitos utilizado.

Foram realizados ensaios utilizando diferentes concentrações de proteína, em membrana de astrócitos de ratos. As concentrações utilizadas foram de 25, 50 e 200µg. Foi observado que em nenhuma dessas concentrações a atropina foi capaz de deslocar a ligação do [<sup>3</sup>H]QNB nas membranas de astrócitos, não havendo indícios da presença de receptores muscarínicos nos astrócitos da glândula pineal.

Estudos de “binding” relacionados à glândula pineal tem demonstrado um baixo número ( $B_{máx}$ , 13-26) de sítios de ligação de alta afinidade ( $K_d$  28-41pM) em membrana de pineal de ratos e ovelhas (TAYLOR, 1980; LAITINEN, 1995). Como a glândula pineal é composta de pinealócitos e células da glia, a presença desses receptores poderia estar relacionada com a sinalização colinérgica apenas nos pinealócitos.

Se de fato não houver receptores muscarínicos nestas células pode-se supor que a reversão da redução da viabilidade induzida pelas toxinas Mlx-9 ou Mlx-8 pela atropina, poderia ter sido causada pela interação direta da mesma com as toxinas

Mlx-9 ou Mlx-8, inibindo a sua atividade fosfolipásica, como é sabido ocorrer com outras fosfolipases.

Um dado que reforçaria a investigação de uma possível ação dessas toxinas em receptores muscarínicos é que recentemente foi caracterizada a afinidade da neurotoxina fosfolipásica Mlx-8 pelo receptor muscarínico neuronal e atuando com efeito antagonista (Sandoval,R., comunicação pessoal).

As toxinas fosfolipásicas podem induzir a liberação de neurotransmissores, sugerindo que estas se ligariam à membrana neuronal interagindo com um tipo de receptor de membrana pré-sináptico denominado de tipo N, específico para FLA<sub>2</sub> neurotóxicas, catalisando a hidrólise de fosfolípidos e levando à produção de lisofosfolípidos e ácidos graxos (LAMBEAU et al., 1989, 2000). Estes, por sua vez, causariam alterações conformacionais na membrana plasmática, induzindo a fusão das vesículas sinápticas e a liberação de neurotransmissores com a inibição subsequente da fissão vesicular e reciclagem das mesmas (ROSSETTO et al., 2006).

Porém nos astrócitos, modelo de cultura celular utilizado, não está claro o efeito das neurotoxinas, pois a localização de zonas de sítios específicos para exocitose continuam indeterminadas (MONTANA et al., 2006). Estudos demonstram que o mecanismo de transporte de vesículas para a membrana é semelhante ao de neurônios (MONTANA et al., 2006), com os astrócitos liberando gliotransmissores por exocitose, e, portanto, a toxina poderia interferir com este mecanismo, ainda que estas células não façam uma sinapse clássica.

Há evidências de que as toxinas fosfolipásicas isoladas do veneno de *Micrurus lemniscatus* (Mlx-8 e Mlx-9) induzem a liberação de glutamato, pois a sua injeção intrahipocampal induziu convulsões e descargas epilépticas típicas de um quadro de epilepsia (OLIVEIRA et al., 2008). Na epilepsia há indícios de que os receptores para glutamato estejam envolvidos com a disfunção patológica (MATUTE, 2006). Além disso, a investigação do mecanismo de ação de outras toxinas fosfolipásicas isoladas do mesmo veneno mostrou o envolvimento do glutamato na indução desses processos (SANDOVAL, R- comunicação pessoal).

Tendo em vista esse possível efeito das toxinas de indução da exocitose de transmissores químicos e seu envolvimento com a indução de um quadro epiléptico, analisou-se a liberação de glutamato em astrócitos após 30 minutos e duas horas de incubação com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9 (100ng/mL). Ocorreu o aumento da concentração de glutamato em relação ao controle nas células tratadas com ambas as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9, sendo estatisticamente significativo para ambas no tempo de 30 minutos após a incubação com as mesmas.

Em astrócitos, um excesso de glutamato pode ser tóxico. Assim, o glutamato pode apresentar uma atividade gliotóxica. O mecanismo da toxicidade do glutamato pode ser decorrente da depleção da glutathiona pela inibição da captação de cistina e seu efeito pode ser bloqueado por antioxidantes e por inibição dos transportadores de glutamato (CHEN et al., 2000). Este mecanismo difere da toxicidade clássica pela via excitatória, com despolarização da membrana e influxo de cátions em decorrência da ativação de receptores de glutamato, descrita para os neurônios. Apesar da ativação excessiva de receptores para glutamato como o AMPA ser tóxico para os astrócitos, normalmente esse efeito é bloqueado devido ao mecanismo de dessensibilização do receptor (CHEN et al., 2000, MATUTE, 2006).

O glutamato pode induzir a liberação do TNF-alfa. A ativação de receptores NMDA é importante para um aumento da atividade da TACE e, portanto, para o aumento da produção do TNF- $\alpha$  (MADRIGAL et al., 2002).

Analisou-se a liberação do TNF- $\alpha$  e seu envolvimento na via de redução da viabilidade celular. Foi observado um aumento na liberação do TNF- $\alpha$  quando as células foram incubadas por 5h com as toxinas Mlx-8 (10 e 100ng/ml) ou Mlx-9 (1, 10, 100 ng/mL) em relação ao controle. No entanto, quando as células foram incubadas com o BB1101 (inibidor da enzima conversora do TNF- $\alpha$ ) juntamente com as toxinas não houve reversão da redução da viabilidade celular avaliada pelo método do MTT. O fato de o inibidor da TACE não ter revertido o efeito das toxinas Mlx-8 e Mlx-9 não descarta definitivamente a participação desta citocina nos processos de redução da viabilidade celular uma vez que foi observado o seu aumento na cultura celular.

A produção aumentada de TNF- $\alpha$  e prostaglandinas nos processos de neuroinflamação também pode levar à liberação de glutamato (ROSSI; VOLTERRA, 2009). Santello et al. (2012) demonstraram que o TNF- $\alpha$  está envolvido na modulação da gliotransmissão, pois o TNF- $\alpha$  é responsável por dobrar o tamanho das vesículas glutamatérgicas presentes na membrana plasmática prontas para a exocitose em astrócitos.

O TNF-alfa poderia exercer seus efeitos se ligando a receptores específicos denominados TNFR1 e TNFR2. Em neurônios e na glia, o TNF-alfa induz apoptose quando se liga ao receptor TNFR1 (BRIETZKE et al, 2008) e pode favorecer o dano ao DNA por aumento na síntese do óxido nítrico.

Por esse motivo, foi avaliada a produção do óxido nítrico quando as células foram incubadas com as toxinas. Analisou-se as concentrações de óxido nítrico no meio de cultura de astrócitos expostos por 3 horas às toxinas Mlx-8 (100ng/mL) ou Mlx-9 (100ng/mL). Apesar de demonstrar uma tendência ao aumento de NO, apenas a toxina Mlx-8 (100ng/mL) foi capaz de aumentar significativamente os níveis de óxido nítrico em relação ao controle.

Quando o NO é produzido em quantidade excessiva este muda de um neuromodulador fisiológico para um fator tóxico. Citocinas como o TNF-alfa podem levar ao aumento do NO através da estimulação da sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), a qual não é expressa sob condições fisiológicas normais e que requer algumas horas para ser expressa, liberando quantidades significativas de NO e resultando em uma ação citotóxica (DUSTING et al., 1995).

O NO também pode ser gerado através da ativação de receptores para glutamato do tipo NMDA, podendo levar a um aumento do influxo de cálcio e ligação com a calmodulina formando um complexo que ativa a sintase do óxido nítrico constitutiva (cNOS), a qual nem sempre está envolvida em patologias.

O NO é especialmente danoso quando reage com espécies reativas de oxigênio (EROS), como com o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) formando o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (RODRIGUEZ et al., 2004; RAY., 2012).



Espécies reativas de oxigênio que incluem radicais livres e espécies não radicalares podem induzir uma disfunção em processos metabólicos. O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular. Este tipo de lesão oxidativa é definido como estresse oxidativo (RODRIGUEZ et al., 2004).

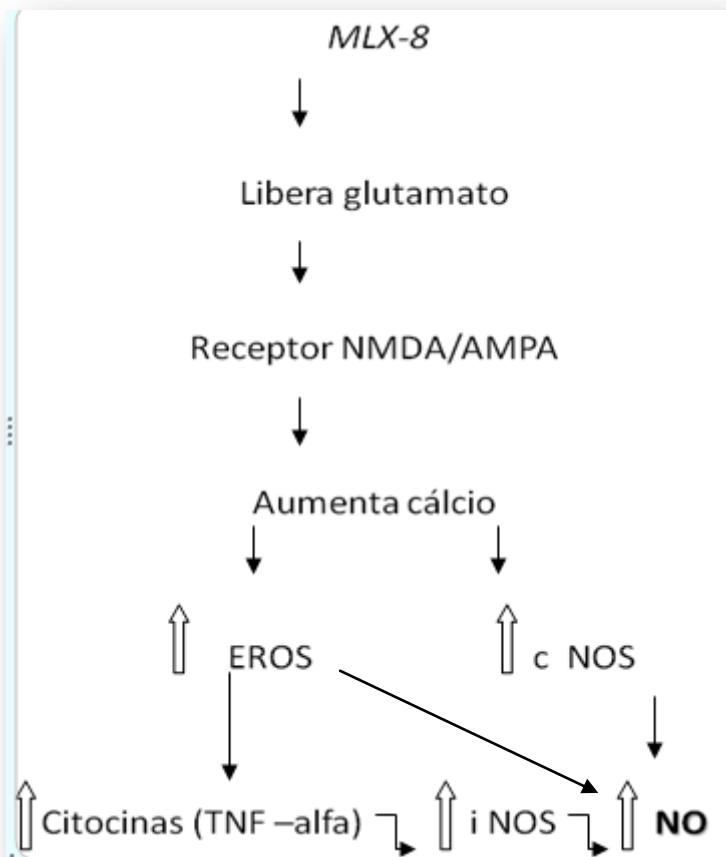
Analisou-se a via de estresse oxidativo dos astrócitos tratados com as toxinas através da atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GST) uma vez que a glutathione e as enzimas que fazem parte do ciclo catalítico deste peptídeo apresentam associações com alteração dos estados antioxidantes e com o aumento do estresse oxidativo (RODRIGUEZ et al., 2004; RAY., 2012).

Não foi observada diferença significativa na atividade das enzimas GPx e GST quando os astrócitos foram incubados com as toxinas Mlx8 ou Mlx-9 (por 3h) em relação ao controle. Houve um aumento na atividade da enzima GR no grupo tratado com Mlx-8 em relação ao controle. O aumento da atividade da GR pela toxina Mlx-8 pode ter sido causado pela diminuição de GSH decorrente de um possível aumento do NO. O NO poderia levar a uma diminuição de GSH causado pela formação de GSNO levando a uma alteração na sinalização celular (DUSTING et al, 1995). Ou ainda, a própria produção de EROS levaria a um aumento da produção de glutathione oxidada (GSSG) e depleção de glutathione reduzida (GSH). A recuperação da GSH seria feita pela enzima glutathione redutase (GR), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. (RODRIGUEZ et al., 2004; RAY., 2012).

A Mlx-8 poderia ter uma ação semelhante à beta-bungarotoxina, uma toxina FLA2, que induz a produção de NO e este é um dos fatores indutores de morte celular em cultura primária de neurônios granulares do cerebelo. Porém, a beta-

bungarotoxina não demonstrou ser tóxica para células da glia, mesmo na concentração mais elevada (1 µg/mL) (TSENG e LIN-SHIAU, 2003).

Foi demonstrado que a beta-bungarotoxina causa um influxo maciço de cálcio, induzindo a formação de EROS e alterando a função mitocondrial, resultando em um colapso do potencial de membrana mitocondrial e depleção de ATP (TSENG e LIN-SHIAU, 2002). A inibição de receptores para glutamato demonstrou ser efetiva na diminuição da produção de EROS, indicando que o glutamato poderia levar ao estresse oxidativo.



**Figura 24.** Possível mecanismo de ação da toxina Mlx-8 no qual vias distintas poderiam ocasionar o aumento do NO.

Em cultura celular de neurônios hipocâmpais tratados com as toxinas Mlx-8 ou Mlx-9, houve um aumento do NO apenas quando os neurônios foram tratados com a toxina Mlx-8, apesar da toxina Mlx-9 apresentar maior toxicidade (CARVALHO, 2010).

Nos astrócitos houve o aumento do NO quando incubados com a toxina Mlx-8 e apesar da diferença ser pequena (em torno de 5%) a toxina Mlx-8 induziu uma maior redução da viabilidade mitocondrial avaliada pelo método do MTT. Os astrócitos possivelmente poderiam ser mais sensíveis à produção de NO e o mecanismo de morte celular ser diferente daquele induzido nos neurônios. Recentemente, foi demonstrado que a toxina Mlx-8 possui um efeito antagonista em receptores muscarínicos em membranas de neurônios hipocâmpais de ratos. Nos astrócitos a via colinérgica parece não estar envolvida com os efeitos desta toxina, tendo em vista os nossos resultados os quais não demonstraram a presença de receptores muscarínicos nos astrócitos da glândula pineal. Este dado de ausência de receptores muscarínicos ainda poderia ser confirmado utilizando outras metodologias, como a imunocitoquímica.

A toxina Mlx-9 induziu um aumento na liberação do glutamato e do TNF- alfa, mas não houve alteração na liberação de NO e nem nas atividades das enzimas antioxidantes avaliadas.

O aumento da liberação do glutamato pela Mlx-9 poderia estar envolvido na redução da viabilidade celular, assim como ocorreu com a Mlx-8, porém o mecanismo de redução da viabilidade celular da toxina Mlx-9 pode se dever a indução de outros sistemas enzimáticos de defesa antioxidantes que operam em conjunto com as enzimas estudadas que incluem a superóxido dismutase (SOD), dependente de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  como cofatores, onde ocorre a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, bem como a catalase que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (RODRIGUEZ et al., 2004; RAY., 2012).

O excesso de glutamato poderia estar envolvido na toxicidade dos astrócitos tratados com as toxinas também por um outro mecanismo onde seu excesso

causaria a competição com a cistina levando à inibição da recaptação da cistina e diminuição da produção da glutathione responsável por manter o equilíbrio do estado oxidativo (KATO et al., 1992; CHEN et al., 2000).

Os mecanismos de ação das toxinas fosfolipásicas Mlx-8 e Mlx-9 possivelmente se devem à ativação de vias distintas, mas não está descartada a possibilidade de que os mesmos efeitos sejam observados em momentos diferentes, os quais não foram avaliados neste trabalho.

Futuros estudos são necessários para melhor elucidar o mecanismo de ação dessas toxinas em células da glia e seus efeitos no SNC.

## 6. CONCLUSÕES

As toxinas fosfolipásicas, Mlx-8 e Mlx-9, isoladas do veneno da serpente *Micurus lemniscatus* adicionadas a cultura de astrócitos provenientes da glândula pineal induzem a redução da viabilidade celular em aproximadamente 20 a 25% em relação ao controle. Há indícios de uma redução na viabilidade celular que poderia ser causada devido à um processo de morte celular característica de apoptose. O aumento da liberação do glutamato e do TNF-alfa pode estar envolvido com essa redução da viabilidade celular e apesar de apenas a toxina Mlx-8 ser capaz de induzir significativamente o aumento do NO e da GR comparada ao controle nos tempos estudados não podemos descartar a via do estresse oxidativo com relação à indução da diminuição na viabilidade celular causada pela toxina Mlx-9 por alteração de outras vias enzimáticas.

## 7. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

AGULHON, C.; SUN, M.; MURPHY, T.; MYERS, T. LAUDERDALE K, FIACCO TA. Calcium Signaling and Gliotransmission in Normal vs. Reactive Astrocytes. **Front Pharmacol**, v.3 p.139, 2012.

ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **FASEB J.**, v.7, n.2, p. 349-360, 1993.

BROOM, L.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; SADEGHIA; Na, M.; DAVIS, J.B.; MEDHURST, A.D.; DEXTER, D.T. Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v.5, p.633-40, 2011.

CABEZAS, R.; EI-BACHÁ, R.S.; GONZALEZ, J.; BARRETO, G.E. Mitochondrial functions in astrocytes: Neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. **Neurosci. Res.**, 2012.

CARDOSO, C.C; PEREIRA, R.T; KOYAMA, C.A.; PORTO, C.S.; ABDALLA, F.M. Effects of estrogen on muscarinic acetylcholine receptors in the rat hippocampus. **Neuroendocrinology**, v.80, n.6, p.379-386, 2004.

CARVALHO, N.D. Toxinas Mlx-8 e Mlx-9 com atividade fosfolipásica A2 isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* induzem morte neuronal por apoptose/necrose em cultura de neurônios hipocámpais embrionários de ratos. Dissertação de Mestrado, Interunidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHANG, C.C.; SU, M.J. Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A<sub>2</sub> activity (beta-bungarotoxin, taipoxin, crotoxin). **Toxicon**, v.4, p. 631-640, 1984.

CHEN, C.J.; LIAO, S.L.; KUO, J.S. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. **J. Neurochem.**, v. 75, p.1557-1565, 2000.

CHEN, C.J.; RAUNG, S.L.; LIAO, S.L.; CHEN, S.Y. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by baicalein in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. **Biochem. Pharmacol.**, v.5 p.957-965, 2004.

CHEN, Y.J. Phospholipase A<sub>2</sub> Activity of  $\beta$ -bungarotoxin Is Essential for Induction of Cytotoxicity on Cerebellar Granule Neurons. **J. Neurobiol.**, v. 64, n.2, p.213-23, 2005.

CHENG, Y.; PRUSSOF, W.H. Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. **Biochem. Pharmacol.** v. 23, p.3099-3108, 1973.

CHI, O.; LIU, X.; WEISS, H.R.; Effects of inhibition of neuronal nitric oxide synthase on NMDA-induced changes in cerebral blood flow and oxygen consumption. **Brain Res.**, v. 148, n.2, p.256-60, 2003.

CIPOLLA-NETO, J. & AFECHE, S.C. Glandula pineal. In: Aires, MM (coord.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008, p. 980-990.

CISCOTTO, P.H.C.; RATES, B.; SILVA, D.A.F.; RICHARDSON, M.; SILVA, L.P.; ANDRADE, H.; DONATO, M.F.; COTTA, G. A.; MARIA, W.S.; RODRIGUES, R.J.; SANCHEZ, E.; LIMA, M.E.; PIMENTA, A.M.C. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. **J. of Proteomics**, v.74, p. 1810-1825, 2011.

CORRÊA- NETTO, C.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.L.M.; SILVA, A.D.; HO, P.L.; LEITÃO DE ARAÚJO, M.; ALVES, M.L.M.; SANZ, L.; FOGUEL, D.; ZINGALI, R.B.; CALVETE, J.J. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of

Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. **J. Proteomics**, v.9, p.1795-809, 2011.

EGLÉN, R.M. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function (review). **Auton. Pharmacol.**, v.3, p. 219-233, 2006.

FLICK D.A.; GIFFORSG, A. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. **J. Immunol. Methods.**, v. 68, p. 167-175, 1984.

FLOHÉ, L. & GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 105, p.114 – 121, 1984.

FUKUI, H.; MORAES, C. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? **Trends Neurosci.**, v. 31, p. 251-256, 2008.

GANDOLFO, G.; LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M.; GOTTESMANN, C. Effects on behaviour and EEG of single chain phospholipases A2 from snake and bee venoms injected into rat brain: search for a functional antagonism. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 78, p. 341-347, 1996.

GOURGIOTIS, I.; KAMPOURI, N.G.; KOULOURI, V.; LEMPESIS, I.G.; PRASINOUM, D.; GEORGIADOU, G.; PITSIKAS, N. Nitric oxide modulates apomorphine-induced recognition memory deficits in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.4, p.507-14, 2012.

GUIZZETTI, A.; MOORE, N.H.; GIORDANO, G.; COSTA, L.G. Modulation of neuritogenesis by astrocyte muscarinic receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 31884-31897, 2008.

GUO, D.; XIANG, W.; SEEBAHN, A.; BECKER, C.M.; STRAUSS, O. Modulation of TTX-sensitive voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels by  $\beta$ -bungarotoxin in rat cerebellar neurons. **B.M.C. Neurosci.**, v. 29, p.13:36, 2012.



HALASSA, M.M.; FELLIN, T.; HAYDON, P.G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends Mol. Med.**, v. 30, p. 1-10, 2007.

HALASSA, M.M.; HAYDON, P.G. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. **Annu. Rev. Physiol.**, v.72, p. 335–355, 2010.

HUANG, L.F.; ZHENG, J.B.; XU, Y.; SONG, H.T.; YU, C.X. A snake venom phospholipase A2 with high affinity for muscarinic acetylcholine receptors acts on guinea pig ileum. **Toxicon**, v. 51, p.1008-1016, 2008.

JUNG, J.; NA, C.; HUH, Y. Alterations in Nitric Oxide Synthase in the Aged CNS. **Oxid. Med. Cell Longev.**, 2012, In Press.

KAO, P.H.; CHIOU, Y.L.; CHEN, Y.J.; LIN, S.R. CHANG.,Guanidination of notexin promotes its phospholipase A(2) activity-independent fusogenicity on vesicles with lipid-supplied negative curvature. **Toxicon**, v.1, p. 47-58, 2012.

KAO, P.H.; LIN S.R.; CHANG. LS.Phospholipase A2 activity-independent membrane-damaging effect of notexin. **Toxicon**, v.7, p. 952-959, 2007.

KAUR, P.; ASCHNER, M.; SYVERSOEN, T. Role of glutathione in determining the differential sensitivity between the cortical and cerebellar regions towards mercury – induced oxidative stress. **Toxicology**, v. 230, p. 164-77, 2007.

KAVYA, R.; SALUJA, R.; SINGH, S.; DIKSHIT, M. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. **Nitric Oxide**, n.4, p.280-94, 2006.

KRONFOL, Z.; REMICK, D.G. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. **Am. J. Psychiatry**, v.157, n.5, p. 683-94, 2000.

LAITINEN, JT; LAITINEN, K.S; KOKKOLA, T. Cholinergic signaling in the rat pineal gland. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 2, p. 177-92,1995.

LAMBEAU, G.; BARHANIN, J.; SCHWEITZ, H.; QAR, J.; LARDUNSKI, M. Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the Taipan venom. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p.11503-11510, 1989.

LANGMEAD, C.J; WATSON, J.; REAVILL, C. Muscarinic acetylcholine receptor as CNS drug targets. **Pharmacol. Therapeutics**, v. 117, p. 232-234, 2008.

LEÃO LI; HO, P.L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDOLI, I. L.; Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. **B. M. C. Genomics**. v. 16, p.110-112, 2009.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J. Neurochem.**, v. 69, p. 581-593, 1997.

LOSI, G.; CAMMAROTA, M.; CARNIGNOTO, G. The role of astroglia in the epileptic brain. **Front. Pharmacol.**, v.3, p.132, 2012.

MADRIGAL, J. L. M.; HURTADO, O.; MORO M. A.; LIZASOIN I.; LORENZO P.; CASTRILLO A.; BOSCA L.; LEZA J.C. The increase in TNF- $\alpha$  levels is implicated in NF-kB activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. **Neuropsychopharmacology**, v.26, p.155-163,2002.

MARCHETTI, L.; KLEIN, M.; SCHLETT, K.; PFIZENMAIER, K.; EISEL, U.L. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n.31, p.32869-32881, 2004.

MATUTE, C.; DOMERCQ, M.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.V. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. **Glia**, v.15, n.2, p.212-24, 2006.

MCCONKEY, D.J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicol. Letters**, v. 99, p.157 – 168, 1998.

MELGAREJO, A. R. *In*: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. (Ed.) **Animais Peçonhentos no Brasil** –Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2 edição: p. 63-69, 2009.

MESSAMORE, E., BOGDANOVICH, N. SCHRODER, H. , WINBLAD, B. Astrocytes associated with senile plaques possess muscarinic acetylcholine receptors. **Neuroreport**, v. 5, p.1473-1476, 1994.

MENG, W.; TOBIN, J.R.; BUSIJA, D.W. Glutamate-induced cerebral vasodilation is mediated by nitric oxide through N-methyl-D-aspartate receptors. **Stroke**, v.5 p.857-62, 1995.

MERCILLE, S.J.; MASSIE, B. Induction of apoptosis in oxygen-deprived cultures of hybridoma cells. **Cytotechnology**, v. 15, p. 117-128, 1994.

Ministério da Saúde - Fundação Nacional da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2<sup>a</sup> ed. Brasília 2001.

MOIDUNNY, S.; VINET, J.; WESSELING, E.M.; BIJZET, J.; SHIEH, C.H; VANLJENDOOM, S.C.; BEZZI, P.; BODDEKEHW; BIBE, K. Adenosine A2B receptor-mediated leukemia inhibitory factor release from astrocytes protects cortical neurons against excitotoxicity. **J. Neuroinflammation**, v. 16, n.9 p.1-198, 2012.

MOLOFSKY, A.V; KRENCIK, R.; ULLIAN, E.M.; TSAI, H.H.; DENENEEN, B.; RICHARDSON, W.D. Barres BA, Rowitch DH. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. **Genes Dev.**, v. 26, n.9, p.891-907, 2012.

MONTANA, V.; MALARKEY, E. B.; VERDERIO, C., MATTEOLI, M.; PARPURA, V. Vesicular transmitter release from astrocytes. **Glia**, v. 54, p.700-715, 2006.

MONTECUCCO, C.; GUITIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: comon aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.65, n.18, p 2897-2912, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUIR, J.L. Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease. **Pharmacol. Biochem.**, v. 56, p. 687-696, 1997.

MURTHY, C.; RAMA; RAO, K.V.; BAI, G.; NORENBURG, M.D.; Ammonia- induced production of free radicals in primary culture of rat astrocytes. **J. Neurosci. Res.**, v. 66, p. 282-88, 2001.

NECO, P.; ROSSETTO, O.; GIL, A.; MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, L.M. Taipoxin induces F-actin fragmentation and enhances release of catecholamines in bovine chromaffin cells. **J. Neurochem.** v. 85, n.2, p.329-37, 2003.

OBERHEIM, N.A.; GOLDMAN, S.A.; NEDERGAARD, M. Heterogeneity of astrocytic form and function., **Methods Mol. Biol.**, v.814, p.23-45, 2012.

OLIVEIRA, D.A.; HARASAWA, C.; SEIBERT, C.S.; CASAS E SILVA,L.L.; PIMENTA,D.C.; LEBRUN,I.; SANDOVAL,M.R. Phospholipases A2 isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: behavioral, electroencephalographic, and neuropathological aspects. **Brain Res. Bull.**, v. 75, p. 629-639, 2008.

ONALI, P.; ADEM, A.; KARLSSON, E.; OLIANAS, M.C. The pharmacological action of MT-7. **Life Sci.**, v. 7, p.1547 – 1552, 2005.

ORRENIUS, S; NICOTERA, P; ZHIVOTOVSKY, B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. **Toxicol. Sci.**, v.119, n.1, p.3-19, 2011.

ORTINSKI, P.I.; DONG, J.; MUNGENAST, A.; YUE, C.; TAKANO, H.; WATSON D.J.; HAYDON, P.G.; COULTER, D.A. Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. **Nat. Neurosci.**, v.5, p.584-91, 2010.

PACHIAPPAN, A.; THWIN, M.M.; MANIKANDAN; GOPALAKRISHNAKONE, P. Glial inflammation and neurodegeneration induced by candoxin, a novel neurotoxin from *Bungarus candidus* venom: global gene expression analysis using microarray. **Toxicol.** v. 46, p. 883-889, 2005.

PANNASCH, U.; DERANGEON, M.; CHEVER, O.; ROUACH, N. Astroglial gap junctions shape neuronal network activity. **Commun. Integr. Biol.**, v.3, p. 248-54, 2012.

PARPURA, V.; LIU, F.; BRETHORST, S.; JEFTINIJA, K.; JEFTINIJA, S.; HAYDON, P. G. Alpha- latrotoxin stimulates glutamate release from cortical astrocytes in cell culture. **FEBS Lett.**, v. 360, p. 266-270, 1995.

PARPURA, V.; ZOREC, R.; Gliotransmission Exocytotic release from astrocytes. **Brain Res.**, v. 63, p. 83-92, 2010.

PETERSON, M.E. Snake bite: coral snakes. **Clin. Tech. Small Anim. Pract**, v. 21, p. 183-186, 2006.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 47, p. 24-29, 2001.

PUNGERCAR, J.; KRIZAJ, I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 50, p.871-892, 2007.

RAY., P.D.; HUANG., B.W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal.**, v.5, p. 981-90, 2012.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behav. Brain Res.**, v.140, n. 1-2, p.1-47, 2003.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; ANTOLIN, I.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; REITER, R.J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 36, n. 1, p.1-9, 2004.

ROSSETO, O.; MORBIATO, I.; CACCIN, P.; RIGONI, M.; MONTECCUCO, C. Presynaptic enzymatic neurotoxins. **J. Neurochem.**, v. 97, p.1534-1545, 2006.

ROSSETO, O.; RIGONI, M.; MONTECUCCO, C. Different mechanism of blockade of neuroexocytosis by presynaptic neurotoxins. **Toxicol. Letters**, v.149, p. 91-101, 2004.

ROSSI, D.; VOLTERRA, A. Astrocytic dysfunction: Insights on the role in neurodegeneration. **Brain Res.**, v. 80, p. 224-232, 2009.

ROZE, J.A. New world coral snakes (elapidae): a taxonomic and biological summary. **Mem. Inst. Butantan**, v. 46, p.305-338, 1983.

SANTELLO, M.; VOLTERRA, A. TNF $\alpha$  in synaptic function: switching gears. **Trends Neurosci.**, 2012. In press.

SHAKHMAN, O.; HERKERT, M.; ROSE, C.; HUMENY, A.; BECKER, C.M. Induction by beta-bungarotoxin of apoptosis in cultured hippocampal neurons is mediated by Ca(2+)-dependent formation of reactive oxygen species. **J. Neurochem.**, v. 87, p. 598-608, 2003.

SILVA, D.C.; MEDEIROS, W.A.; BATISTA, I. F.; PIMENTA, D.C.; LEBRUN, I.; ABDALLA, F.M.; SANDOVAL, M. R. Characterization of a new muscarinic toxin from the venom of the Brazilian coral snake *Micrurus lemniscatus* in rat hippocampus. **Life Sci.**, v. 89, p.25-26, 2011.

STEELMAN, A.J; LI, J. Poly(I:C) promotes TNF $\alpha$ /TNFR1-dependent oligodendrocyte death in mixed glial cultures. **J. Neuroinflammation**, v. 3, p.8-89, 2011.

SUAREZ, P.R; NÚÑEZ, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Proteomic and biological characterization of the venom of the redtail coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidea), from Colombia and Costa Rica. **J. Proteomics.**, v.75, p. 655-667, 2011.

TAYLOR, R.L; ALBUQUERQUE, M.L; BURT, D.R. Muscarinic receptors in pineal. **Life Sci.**, v. 25, p.2195-2200.

TSENG, W.P.; LIN-SHIAU, S.Y. Calcium- activated NO production plays a role in neuronal death induced by  $\alpha$ -bungarotoxin in primary cultures of cerebellar granular neurons. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 367, p. 451-461, 2003.

VAN DER ZEE, E.A.; MATSUYAMA, T.; STROSBURG, A.D.; TRABER, J.; LUITEN, P.G. Demonstration of muscarinic acetylcholine receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain and upper brainstem. **Histochemistry**, v. 92, p. 475-485, 1989.

VAN DER ZEE, E.A.; DE JONG, G.I.; STROSBURG, A.D.; LUITEN, P.G. Muscarinic acetylcholine receptor-expression in astrocytes in the cortex of young and aged rats. **Glia**, v.8, p. 42-50, 1993.

VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of coral snake venoms. **Mem. Inst. Butantan**, v. 52, p.31, 1990.

.

VOLLRATH L. The Pineal Organ. New York, NY: Springer-Verlag Heidelberg, 1981.

WALZ, W. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. **Neurochem.**, v. 36, p.291-300, 2000.

WEGRZYNOWICZ, S.M.; WEGRZYNOWICZ, M.; LEE, E.; BOWMANN, B. A.; ASCHNER. Role of Astrocytes in Brain Function and Disease. **Toxicol. Pathol.**, v.1, p.1-9, 2010.

WEIS, R.Y. & MCISAAC, R.J. Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. **Toxicon**, v. 9, p. 219-28, 1971.

WITTHOFT, A.; EM KARNIADAKIS, G. A bidirectional model for communication in the neurovascular unit. **J. Theor. Biol.**, v. 311, p. 80-93, 2012.