



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA YUMI GIGLIO MORIMOTO COUCEIRO

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FARMACOLÓGICA DE PEPTÍDEOS
ISOLADOS DO VENENO DE *Bothrops bilineatus smaragdinus* (VÍBORA
AMAZÔNICA) COM POTENCIAL ATIVIDADE MODULADORA DA LIBERAÇÃO
SINÁPTICA MOTORA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA YUMI GIGLIO MORIMOTO COUCEIRO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FARMACOLÓGICA DE PEPTÍDEOS ISOLADOS
DO VENENO DE *Bothrops bilineatus smaragdinus* (VÍBORA AMAZÔNICA) COM
POTENCIAL ATIVIDADE MODULADORA DA LIBERAÇÃO SINÁPTICA MOTORA**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Rafael Stuani Floriano

2024

Catálogo Internacional na Publicação (CIP)

591.65
C853c Couceiro, Fernanda Yumi Giglio Morimoto
 Caracterização estrutural e farmacológica de peptídeos
 isolados do veneno de *Bothrops bilineatus smaragdinus*
 (Víbora amazônica) com potencial atividade moduladora da
 liberação sináptica motora \ Fernanda Yumi Giglio Morimoto
 Couceiro; orientador Rafael Stuaní Floriano. -- Presidente
 Prudente, 2024.
 53 f.: il.

 Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -
 Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
 Prudente, SP, 2024.
 Bibliografia.

 1. Veneno de *Bothrops*. 2. Neurotransmissão motora.
 3. Facilitação neuromuscular. 4. Toxinas pré-sinápticas. I.
 Floriano, Rafael Stuaní, orient. II. Título.

FERNANDA YUMI GIGLIO MORIMOTO COUCEIRO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FARMACOLÓGICA DE PEPTÍDEOS
ISOLADOS DO VENENO DE *BOTHROPS BILINEATUS SMARAGDINUS* (VÍBORA
AMAZÔNICA) COM POTENCIAL ATIVIDADE MODULADORA DA LIBERAÇÃO
SINÁPTICA MOTORA**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 14 de março de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Stuani Floriano
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Karen de Moraes Zani
Instituto Butantan – IB
São Paulo - SP

RESUMO

Caracterização estrutural e farmacológica de peptídeos isolados do veneno de *Bothrops bilineatus smaragdinus* (Víbora Amazônica) com potencial atividade moduladora da liberação sináptica motora

Bothrops bilineatus smaragdinus é uma serpente arborícola da região amazônica cuja toxina tem sido pouco estudada. Neste trabalho, propomos purificar e identificar estrutural e farmacologicamente neurotoxinas pré-sinápticas do veneno da *B. b. smaragdinus* com potencial atividade moduladora da liberação sináptica motora. O veneno bruto foi submetido à gel filtração, com a fração de interesse sendo então purificada por RP-HPLC, e as toxinas resultantes analisadas quanto ao seu perfil neurotóxico em preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo *in vitro*. As toxinas com função excitatória sobre a neurotransmissão motora foram submetidas à espectrometria de massas para determinação da massa intacta. A gel filtração revelou a existência de oito frações (Picos: P1–P8), sendo que a fração P8 apresentou potente efeito facilitador neuromuscular concentração-dependente, sem exibir atividade fosfolipase A₂ (PLA₂). Fração P8 (15.6 µg/ml) produziu significativo aumento na frequência de potenciais de placa terminal em miniatura (PsPTM). Em adição, fração P8 (15.6 µg/ml) aumentou significativamente a amplitude de potenciais de placa terminal evocados (PsPT). Análises por RP-HPLC e espectrometria de massas da fração P8 determinaram a presença de dois peptídeos com 652,4849 Da (P8-1) e 531,4108 Da (P8-2) de massa intacta. O peptídeo P8-1 exibiu majoritariamente a ação neuromuscular vista com a fração P8, aumentando a frequência de MEPPs e amplitude of EPPs em preparação NFD de camundongo. Estes achados indicam que o peptídeo P8-1 está primariamente envolvido com o efeito excitatório neuromuscular previamente visto com o veneno de *B. b. smaragdinus* em preparação NFD de camundongo, provavelmente estimulando a liberação de acetilcolina pelo terminal nervoso motor.

Palavras-chave: veneno de *Bothrops*, neurotransmissão motora, facilitação neuromuscular, toxinas pré-sinápticas.

ABSTRACT

Structural and pharmacological characterization of peptides isolated from the venom of *Bothrops bilineatus smaragdinus* (Amazon viper) with potential modulatory activity of motor synaptic release

Bothrops bilineatus smaragdinus is an arboreal snake from the Amazon region whose toxinology has been negligibly studied. In this work, we proposed to purify and structurally and pharmacologically identify presynaptic neurotoxins from *B. b. smaragdinus* venom with the potential modulating activity of motor synaptic release. The crude venom was subjected to gel filtration, with the fraction of interest then purified by RP-HPLC, and the resulting toxins were analyzed for their neurotoxic profile in a mouse phrenic nerve-diaphragm (PND) preparation in vitro. Toxins with excitatory function on motor neurotransmission were subjected to mass spectrometry to determine intact mass. Gel filtration revealed the existence of eight fractions (Peaks: P1–P8), with fraction P8 showing a potent concentration-dependent neuromuscular facilitating effect, without exhibiting phospholipase A₂ (PLA₂) activity. Fraction P8 (15.6 µg/ml) produced a significant increase in the frequency of miniature endplate potentials (MEPPs). In addition, fraction P8 (15.6 µg/ml) significantly increased the amplitude of evoked endplate potentials (EPPs). Analysis by RP-HPLC and mass spectrometry of the P8 fraction determined the presence of two peptides with 652.4849 Da (P8-1) and 531.4108 Da (P8-2) of intact mass. The P8-1 peptide mostly exhibited the neuromuscular action seen with the P8 fraction, increasing the frequency of MEPPs and amplitude of EPPs in mouse PND preparations. These findings indicate that the P8-1 peptide is primarily involved in the neuromuscular excitatory effect previously seen with *B. b. smaragdinus* in mouse PND preparation, probably stimulating the release of acetylcholine from the motor nerve terminal.

Keywords: *Bothrops* venom, motor neurotransmission, neuromuscular facilitation, presynaptic toxins.