

Célio José de Castro Junior

**EFEITO DA TOXINA PhTx3-4 DO  
VENENO de *Phoneutria nigriventer*  
NOS NÍVEIS DE  $\text{Ca}^{2+}$   
INTRACELULAR E NA EXOCITOSE  
EM SINAPTOSOMAS**

Belo Horizonte

Setembro

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Célio José de Castro Junior

**EFEITO DA TOXINA PhTx3-4 DO  
VENENO de *Phoneutria nigriventer*  
NOS NÍVEIS DE  $Ca^{2+}$   
INTRACELULAR E NA EXOCITOSE  
EM SINAPTOSOMAS**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau Mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular

Orientador: *Marcus Vinícius Gomez*

Co-orientadora: *Cristina Guatimosim Fonseca*

Belo Horizonte

Setembro

2007

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia do ICB-UFMG com o auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT)
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)
- Instituto do Milênio

Dedico este trabalho aos meus pais Célio e Edir e aos meus irmãos Lílian e Fabrcício pelo apoio, carinho, afetividade e sobretudo por manter sempre vivo em mim o valor da família.

## **Agradecimentos**

A Deus, pelo dom da vida e por colocar no meu caminho pessoas tão especiais.

Ao professor Marcus Vinícius Gomez. Porque orientar não é simplesmente ensinar e indicar rumos no trabalho, mas ser orientador é, sobretudo, ser exemplo. Obrigado pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelo carinho, pela confiança e pelo exemplo.

À professora Cristina Guatimosim, grande profissional, pela acolhida, pelos ensinamentos, apoio, prestatividade e sobretudo pela confiança no meu trabalho.

Ao professor Marco Antônio, pelos ensinamentos, prestatividade e pelo exemplo.

Aos professores Marco Aurélio Romano, Luiz Armando de Marco, Helton José Reis, Vânia Prado, Grace Schenatto e André Massensini, pela prestatividade, apoio e pelo exemplo.

Ao Bráulio, pelo convite de voltar a trilhar os caminhos da ciência, pela cumplicidade e pela grande e verdadeira amizade.

À Ana Cristina, pela oportunidade, pelos ensinamentos, confiança e pela amizade.

Aos amigos e companheiros de laboratório Fabiana, Vinícius, Bruno Resende, Cristina, Magda, Cristiane, Patrícia, Daniela Valadão, Alessandra, Jomara, Nancy, Monalise, Xavier, Bruno Leles, Paulo, Eloah, Allan, Bernardo, Janice, Jarbas, Rafael (bolha), Bruno Pinheiro, pelo companheirismo, empenho, apoio científico, e pelos momentos agradáveis.

Aos amigos Danuza e Diogo, prestatividade e simpatia constantes.

Aos prezados amigos da morfologia, Bento, Ernani, Débora, Luciana, e Maíla, pelos momentos agradáveis, pelas ricas discussões semanais de artigos e pela simpatia.

Às amigas distantes Luciene e Lucimar, pelos ensinamentos e pela amizade.

À Wolfanga, pelo carisma, prestatividade e simpatia.

À Adriane, grande mãe, exemplo de humildade, e de compromisso com o laboratório, obrigado pela amizade e generosidade.

À Cris pelos bons valores que ficaram, pela consideração e pela fé, um especial muito obrigado!

Aos meus familiares em especial aos meus avôs Raimundo e Olinda, minhas tias Sânia, Ladica e Aide, pelo apoio incondicional e pelo incentivo.

Por fim, à UFMG e às entidades financiadoras CNPq, FAPEMIG, CAPES e Instituto do Milênio, por propiciarem uma pós-graduação de tão elevado nível no Brasil.

# Índice

Lista de Figuras e Tabela	ix
Lista de Abreviaturas	x
Resumo	xii
Abstract	xiii
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Neurotransmissão - Aspectos gerais	2
1.2 - O ciclo de vesículas sinápticas	3
1.3 - Canais de Ca <sup>2+</sup> neurais	7
1.4 - Antagonistas de canais de Ca <sup>2+</sup> neuronais como ferramentas para investigar a neurotransmissão	10
1.5 - Potencial terapêutico de neurotoxinas antagonistas de canais de Ca <sup>2+</sup>	11
1.6 - Phoneutria nigriventer	13
1.7 - Ação das toxinas purificadas do veneno da Phoneutria nigriventer	14
1.8 – PhTx3-4	16
2 - OBJETIVOS	19
2.1 – Objetivo geral	20
2.2 – Objetivos específicos	20
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 – Equipamentos	22
3.2 - Soluções	22
3.3 - Drogas e toxinas	23
3.4 - Animais	23
3.5 - Preparação de sinaptosomas	23
3.6 - Ensaio de exocitose de vesículas sinápticas	24
3.7 - Medida do cálcio livre intrasinaptosomal	25
3.8 - Análise estatística dos resultados	25
3.9 - Uso de FM2-10 para monitorar a exocitose	26
4 - RESULTADOS	28
4.1 – PhTx3-4 e medidas de cálcio intrasinaptosomal	29
4.2 – Efeito comparativo da PhTx3-4 com o de toxinas bloqueadoras de canais de cálcio nas medidas de cálcio intracelular	31

4.3 - Exocitose de vesículas sinápticas induzida por KCl	33
4.4 - Calcio e exocitose	35
4.5 - Efeito da toxina PhTx3-4 na exocitose	37
5 - DISCUSSÃO	40
6 - CONCLUSÕES	46
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

## Lista de Figuras e Tabela

Figura 1: O ciclo de vesículas sinápticas	4
Figura 2: Modelo molecular da exocitose de vesículas sinápticas	6
Figura 3: Aspectos estruturais dos canais de $\text{Ca}^{2+}$ regulados por voltagem	9
Figura 4: aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>	15
Figura 5: Purificação das frações Tx1 a Tx3 do venenno de <i>Phoneutria nigriventer</i>	15
Figura 6: Estrutura química da molécula FM2-10	27
Figura 7: Monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas por FM2-10	27
Figura 8: Efeito da PhTx3-4 na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzida por KCl 30mM	30
Figura 9: Efeito das $\omega$ -toxinas PhTx3-4, $\omega$ -CgTx MVIIC, $\omega$ -CgTx GVIA e $\omega$ -AgaIVA no aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzido por KCl	32
Figura 10: Exocitose em sinaptosomas córticos induzida por despolarização de membrana	34
Figura 11: Liberação de FM2-10 é cálcio-dependente	36
Figura 12: Efeito da PhTx3-4, $\omega$ -Cgtx MVIIC, $\omega$ -Cgtx GVIA e $\omega$ -Aga IVA na exocitose induzida por KCl 30 mM	39
Tabela 1: Bloqueadores das diversas correntes de $\text{Ca}^{2+}$ neuronais	11

## Lista de Abreviaturas

Ach	Acetilcolina
DMSO	Dimetil sulfóxido
Min	Minuto
ml	Mililitro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
EGTA	Etilenoglicol-bis- $\beta$ -aminoetil éster
EGTA-AM	Etilenoglicol- <i>bis</i> ( $\beta$ -aminoetil)-N,N,N',N'- tetraacetoximetil Éster
Seg	Segundo
KRH	Krebs-Ringer-Hepes
SNC	Sistema Nervoso Central
NO	Óxido Nítrico
Cd <sup>2+</sup>	Íons cádmio
Ca <sup>2+</sup>	Íons cálcio
Na <sup>+</sup>	Íons sódio
K <sup>+</sup>	Íons potássio
VGCC's	Canais de cálcio regulados por voltagem
EPM	Erro padrão médio
EPP	Potencial final de placa
MEPP	Potencial final de placa em miniatura
BAPTA-AM	bis-(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácidotetracético
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>
SNF	Proteína de fusão sensível à N-etil-maleimida
$\alpha$ -SNAP	Proteína associada ao sinaptosoma
EEEE	Sequência de 4 aminoácidos ácido glutâmico
DEKA	Sequência de aminoácidos: ácido aspártico –ácido glutâmico-Lisina-Alanina
RFPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
TTX	Tetrodotoxina

HVA	Canais de cálcio ativados por alta voltagem
LVA	Canais de cálcio ativados por baixa voltagem
DHP's	Dihidropiridinas

## Resumo

O influxo de cálcio e a exocitose de vesículas sinápticas no terminal nervoso são eventos chave na neurotransmissão. A entrada de cálcio, em resposta a um estímulo despolarizante, através de canais de cálcio regulados por voltagem é o principal sinal que dispara a ativação da maquinaria excitotóxica e consequente liberação de neurotransmissores. A existência de diferentes subtipos de canais de cálcio regulados por voltagem com funções fisiológicas distintas motiva a busca de novos agentes farmacológicos atuantes sobre estes canais. O veneno da aranha brasileira *Phoneutria nigriventer* contém uma variedade de substâncias com ação predominantemente neurotóxica, dentre elas a fração PhTx3-4 foi recentemente descrita como uma potente bloqueadora da neurotransmissão em diversos modelos experimentais. Para testar o efeito dessa toxina nas alterações intracelulares da concentração de cálcio ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ ) induzidas por KCl, terminais nervosos centrais isolados (sinaptosomas) foram marcados com a sonda fluorescente Fura 2-AM. A PhTx3-4 reduziu a  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  induzida por KCl de uma forma dependente da dose inibindo 53% desse efeito em concentrações saturantes. O  $\text{IC}_{50}$  encontrado para o efeito inibitório da Tx3-4 na  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  foi de 1,4 nM. As toxinas bloqueadoras de canais de cálcio  $\omega$ -conotoxina MVIIC,  $\omega$ -conotoxina GVIA e  $\omega$ -agatoxina IVA reduziram por 47, 22 e 24%, respectivamente, a  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  induzida por KCl. Em associação à PhTx3-4, somente a  $\omega$ -agatoxina IVA mostrou efeito inibitório aditivo no aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]$  induzida por KCl. Para investigar o efeito da PhTx3-4 na exocitose de vesículas utilizamos a sonda fluorescente FM2-10. A PhTx3-4 também reduziu com elevada potência ( $\text{IC}_{50} = 1,1$  nM) a exocitose induzida por KCl, efeito comparativamente maior que o das toxinas  $\omega$ -conotoxina MVIIC,  $\omega$ -conotoxina GVIA e  $\omega$ -agatoxina IVA. Tal como nas medidas de cálcio intracelular, somente a  $\omega$ -agatoxina IVA apresentou efeito aditivo inibitório com a PhTx3-4 na exocitose induzida por KCl. Juntos esses dados mostram que PhTx3-4 é um potente inibidor de canais de cálcio Tipo-P/Q envolvidos no controle da entrada de cálcio e exocitose de vesículas sinápticas em sinaptosomas cérebro-corticais.

## Abstract

Calcium influx and synaptic vesicle exocytosis at nerve terminals are key events in the neurotransmission. Calcium entrance throughout voltage-gated calcium channels in response to a depolarizing stimulus is the main signal that triggers the exocytotic machinery leading to neurotransmitter release. Existence of multiple subtypes of voltage-gated calcium channels with distinct physiological functions has leading to the search for new pharmacological agents that act on these channels. Venom of the brazilian spider *Phoneutria nigriventer* contains several substances with action markedly neurotoxic. Amongst them the fraction PhTx3-4 has been show to be a potent blocker of neurotransmission at various experimental models. To test for the effect of PhTx3-4 on the calcium concentration changes ( $\Delta[Ca^{2+}]$ ) induced by KCl, isolated central nerve endings (synaptosomes) were stained with the fluorescent probe Fura 2-AM. PhTx3-4 reduces the  $\Delta[Ca^{2+}]$  induced by KCl in a dose dependent way, reducing by 53% this effect at saturating concentrations.  $IC_{50}$  found for the PhTx3-4 effect on KCl induced changes in  $[Ca^{2+}]$  was 1,4 nM. The calcium blockers toxins  $\omega$ -conotoxin MVIIIC,  $\omega$ -conotoxin GVIA and  $\omega$ -agatoxin IVA reduced by 47, 22 e 24% the changes in  $[Ca^{2+}]$  induced by KCl. In association with PhTx3-4, only  $\omega$ -agatoxin IVA showed an additive inhibitory effect on the KCl induced  $[Ca^{2+}]$  increase. To test for the PhTx3-4 effect on vesicle exocytosis, we used the fluorescent probe FM2-10. PhTx3-4 also reduces with great potency ( $IC_{50} = 1,1$  nM) the KCl induced exocytosis. This effect was comparatively stronger than that observed with  $\omega$ -conotoxin MVIIIC,  $\omega$ -conotoxin GVIA and  $\omega$ -agatoxin IVA. As such as in the calcium measurements, only  $\omega$ -agatoxin IVA showed an additive inhibitory effect on the KCl induced exocytosis. Taken together these data show that PhTx3-4 is a potent inhibitor of P/Q calcium channels involved in controlling calcium entry and exocytosis of synaptic vesicles in brain cortical synaptosomes.

## **1 - INTRODUÇÃO**

## 1.1 - Neurotransmissão - Aspectos gerais

Um grande progresso científico sobre o entendimento do sistema nervoso central foi alcançado nos dois últimos séculos. Páginas importantes desse progresso foram escritas por Ramón y Cajal (1911) que propôs a histologia básica do sistema nervoso central, e destacou a zona especializada de contato entre os neurônios que mais tarde Charles Serrington (1947) veio a denominá-la sinapse. Embora inicialmente pensava-se que as sinapses eram puramente elétricas e que houvesse sempre contato físico entre as sinapses, Otto Loewi (1926) em experimento clássico, mostrou que a acetilcolina era capaz de transmitir sinais do nervo vago para o coração, sendo proposta então a primeira evidência sobre a sinapse química.

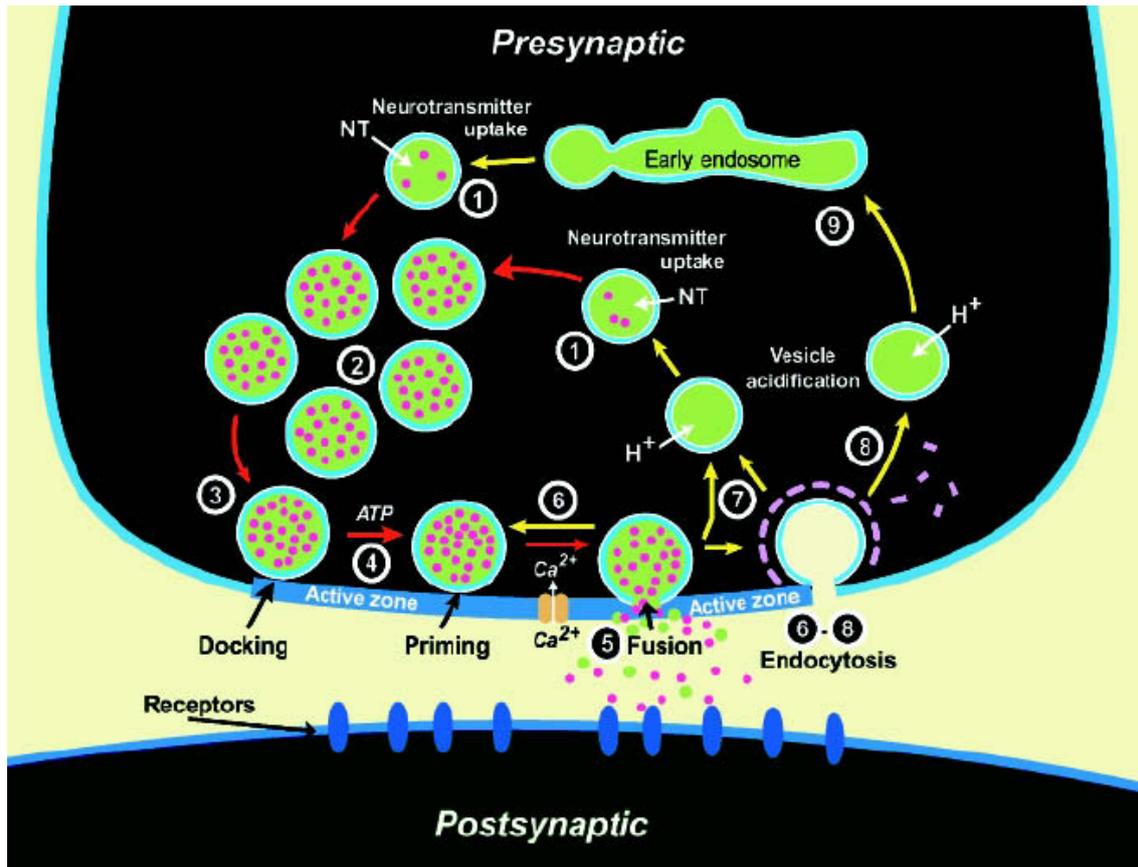
Sinapse química é uma junção célula-célula altamente especializada que é designada para a comunicação eficiente entre células nervosas e suas células-alvo, que podem ser um outro neurônio, uma célula muscular ou uma célula glandular (Gundelfinger et al., 2003). Apesar da existência de dois tipos de sinapses, a química e a elétrica, as sinapses químicas estão presentes em maior número do que as elétricas sendo aquelas, a principal forma de comunicação entre neurônios no SNC (Eccles, 1976). Através das sinapses químicas, a exocitose de uma única vesícula sináptica pode desencadear a abertura de milhares de canais iônicos pós-sinápticos o que caracteriza a propriedade de amplificação do sinal pré-sináptico nas sinapses químicas e ainda, devido à alterações na frequência e intensidade de uso dessas sinapses, elas se alteram respondendo de forma diferenciada a novos estímulos, caracterizando a plasticidade sináptica (Jessell and Kandel, 1993).

A transmissão sináptica se inicia com a geração do potencial de ação no axônio do neurônio pré-sináptico. Esse potencial se propaga ao longo do terminal e promove a abertura de canais de cálcio regulados por voltagem. O aumento transiente da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular induz a exocitose de vesículas sinápticas com consequente liberação do neurotransmissor na fenda sináptica. Após exocitose, as vesículas sinápticas sofrem endocitose, reciclagem e são novamente preenchidas com neurotransmissor para um novo ciclo de exocitose (Sudhof, 2004).

## 1.2 - O ciclo de vesículas sinápticas

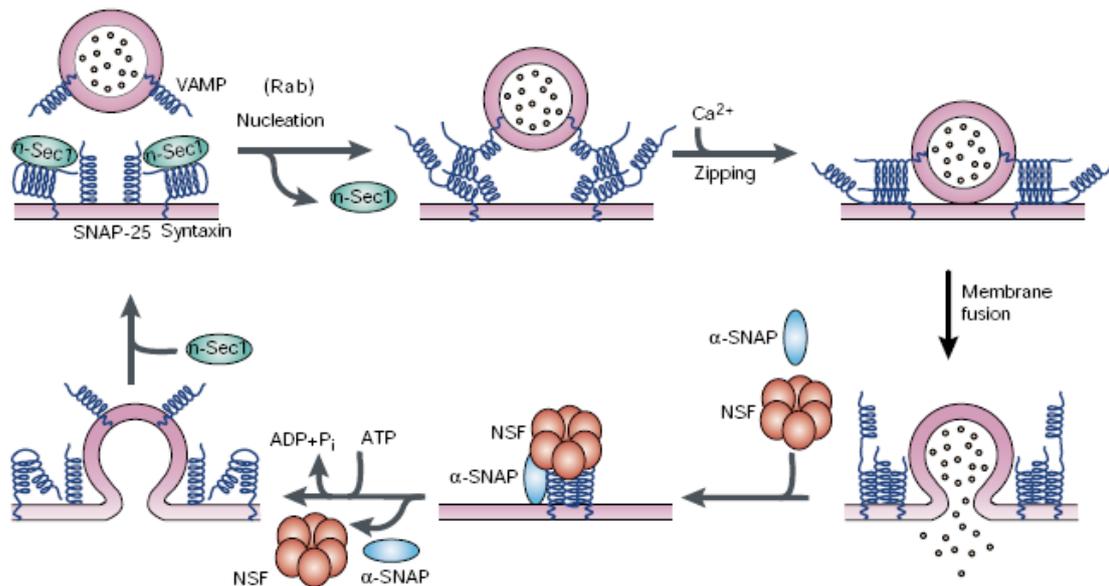
Os terminais nervosos podem ser considerados verdadeiras máquinas secretórias preparadas para repetidos ciclos de liberação de neurotransmissores. Quando a vesícula sináptica se funde com a membrana do terminal pré-sináptico, os constituintes da vesícula são reciclados para garantir a liberação de neurotransmissores sempre que necessária e consequentemente impedir a interrupção desse processo. Todas as funções pré-sinápticas, direta ou indiretamente, envolvem vesículas sinápticas. As vesículas sinápticas seguem uma rota de tráfego cíclica no terminal nervoso a qual pode ser dividida em passos sequenciais (para revisão Sudhof, 2004; Ryan, 2006).

Primeiro, os neurotransmissores são ativamente transportados para dentro das vesículas sinápticas e as vesículas formam aglomerados, em seguida migram para a zona ativa e após essa etapa, as vesículas passam para um estágio no qual são competentes para formar um poro de fusão em resposta a um estímulo de  $Ca^{2+}$ , estágio esse conhecido como amadurecimento ou *priming*. Após a abertura do poro de fusão, as vesículas sinápticas sofrem endocitose e reciclam através de três mecanismos prováveis: (a) as vesículas são reacidificadas e preenchidas com neurotransmissor sem desancorarem, permanecendo no pool de liberação rápida, passo chamado *Kiss-and-stay* (Barker et al., 1972); (b) as vesículas desancoram e reciclam localmente, passo chamado *Kiss-and-run*, onde são reacidificadas e preenchidas com neurotransmissor (Ceccarelli et al., 1973), voltando aos passos iniciais do ciclo; ou (c) as vesículas sofrem endocitose via clatrina e reacidificam e preenchem novamente com neurotransmissores tanto diretamente ou passando por um intermediário endossomal (Heuser and Reese, 1973) (Fig. 1).



**Figura 1: O ciclo de vesículas sinápticas.** As vesículas sinápticas são preenchidas com neurotransmissor através de transporte ativo (passo 1) e formam um agrupamento de vesículas (passo 2) que migram para a zona ativa, se ancorando (passo 3). Nas zonas ativas, as vesículas se tornam num estado competente para fusão, chamado *priming* (passo 4). Após a abertura do poro de fusão e exocitose disparado por  $\text{Ca}^{2+}$  (passo 5), as vesículas sinápticas sofrem endocitose e reciclagem por diversas vias: local (passo 6), reciclagem rápida sem formação de intermediário endossomal (passo 7) ou endocitose mediada por clatrina (passo 8) a qual pode passar pela formação de um intermediário endossomal (passo 9). Os passos da exocitose são indicados por setas vermelhas e os passos referentes à endocitose e reciclagem, setas amarelas (retirado de Sudhof, 2004).

A maquinaria exo-endocítica dos terminais nervosos dificilmente manteria sua atividade não fosse a existência de uma gama de proteínas com características e funções distintas, estrategicamente localizadas em regiões específicas dos terminais nervosos (Takamori et al., 2006) e várias delas já tem o seu papel elucidado. A ancoragem das vesículas é mediada por pequenas GTPases membros da família Rab, as quais agem em conjunto com várias proteínas efetoras Rab ou com fatores de ancoragem (Zerial and McBride, 2001). Isso é seguido pelo alinhamento específico de três proteínas conhecidas como SNAREs: v-SNAREs (sinaptobrevina/VAMP) e t-SNAREs (SNAP-25 e syntaxina) as quais estão ancoradas nas membranas da vesícula sináptica e do terminal nervoso, respectivamente. O entrelaçamento das proteínas do complexo SNARE promoverá a fusão das membranas da vesícula e da membrana plasmática em resposta a um aumento da concentração de cálcio (Jahn and Sudhof, 1999; Slepnev and De Camilli, 2000). A montagem do complexo SNARE-trans é regulada pelas proteínas Munc-18/Sec 1 e a desmontagem é regulada pela NSF e pela  $\alpha$ -SNAP. A proteína ligante de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolípidos sinaptotagmina é considerada como sendo o sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  no processo de fusão das vesículas disparado por  $\text{Ca}^{2+}$  (Chapman, 2002) (Fig. 2).



**Figura 2: Modelo molecular da exocitose de vesículas sinápticas.** A n-Sec1 está ligada à syntaxina antes da formação do complexo SNARE. As proteínas Rab podem facilitar a dissociação da n-Sec1 da syntaxina, permitindo a ligação subsequente (nucleação) entre as três SNARE's neuronais, syntaxina, SNAP-25 e VAMP.  $\text{Ca}^{2+}$  dispara o completo elovelamento do complexo SNARE e consequente fusão da membrana levando à liberação do conteúdo vesicular. Após o evento da fusão, o recrutamento de  $\alpha$ -SNAP e NSF do citoplasma e a consequente hidrólise de ATP pelo NSF, causam a dissociação do complexo SNARE. Syntaxina, SNAP-25 e VAMP se tornam então livres e prontas para um novo ciclo de exocitose (Chen and Scheller, 2001).

### 1.3 - Canais de $\text{Ca}^{2+}$ neurais

Não só em células neuronais mas em diferentes tipos celulares, canais de cálcio se ativam e medeiam influxo de cálcio após potenciais de ação ou após despolarizações sublimiáres de membrana. O cálcio que entra na célula através de canais de cálcio regulados por voltagem serve de segundo mensageiro na sinalização elétrica e na iniciação de eventos intracelulares como contração, secreção, transmissão sináptica e expressão gênica. Existe um grande número de diferentes canais de cálcio no sistema nervoso e é comum haver confusão entre as diferentes nomenclaturas desses canais. Há, usualmente, três diferentes classificações para esses canais: Classificação por voltagem, farmacológica e molecular.

Originalmente, assumia-se que existia somente um tipo de canal de cálcio. Entretanto, um trabalho pioneiro de Hagiwara et al. (1975) avaliando correntes de cálcio em ovos de estrela-do-mar, mostrou que poderia existir mais de um tipo de canal. Subsequentemente mostrou-se que essa distinção também era observada em muitas outras células de diferentes organismos. As diferentes correntes têm diferentes limiares de ativação, logo, canais ativados por baixa voltagem (do inglês LVA) são aqueles nos quais a ativação se dá em potenciais ligeiramente acima do potencial de repouso, e os canais ativados por alta voltagem (do inglês HVA) são aqueles nos quais o limiar de ativação é substancialmente acima do potencial de repouso (ultrapassa 0 mV). Além da voltagem de ativação, diferentes canais de cálcio também são distinguidos pelas propriedades de um único canal, cinética de ativação e de inativação.

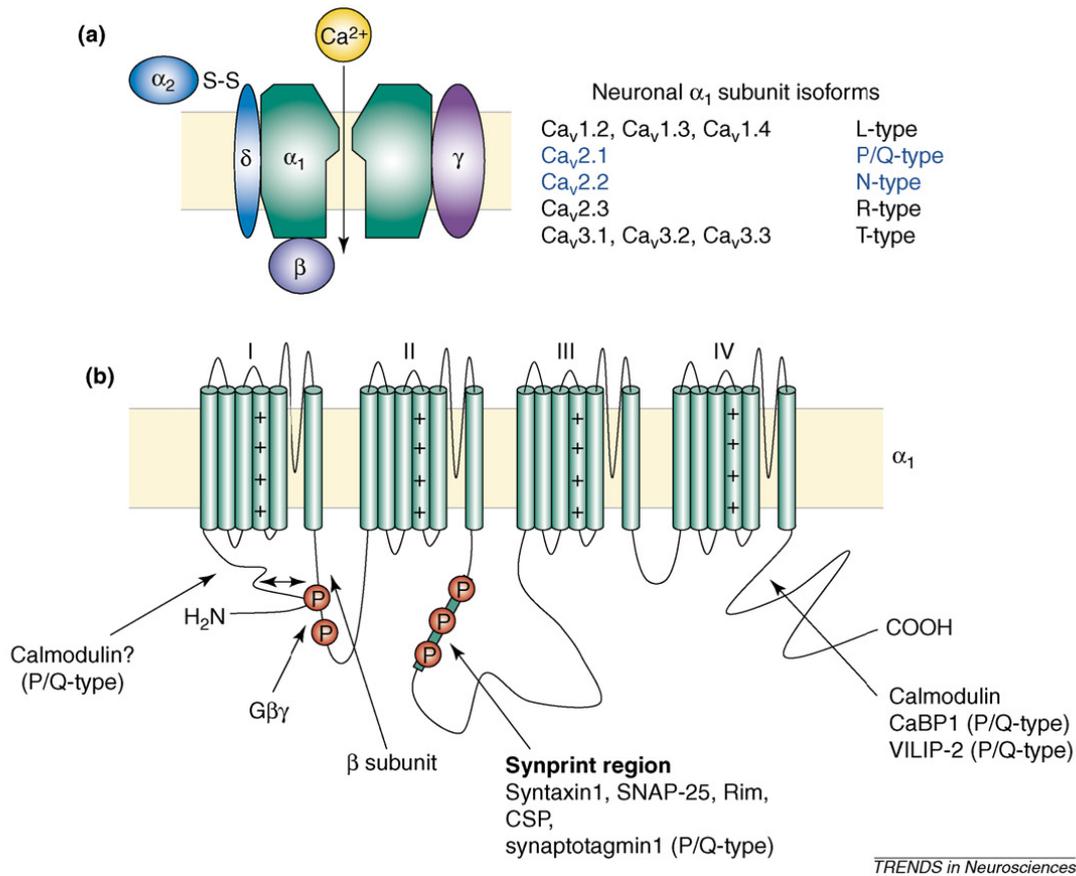
Pensando-se inicialmente na existência de somente dois tipos de canais de cálcio (HVA e LVA), começou então uma busca de agentes farmacológicos específicos para esses canais. Foi encontrada uma família de substâncias, as dihidropiridinas (DHP), que afetavam canais de cálcio HVA mas não canais LVA (Bean, 1985). Ao se analisar correntes de cálcio em DRG's de pintinhos, foi observado que as dihidropiridinas não afetam a atividade de todos os canais de cálcio HVA (Nowycky et al., 1985). Logo, baseado na sensibilidade às DHP's, os canais HVA foram em seguida subdivididos em canais DHP-sensíveis (canais de cálcio Tipo-L) e canais DHP-insensíveis (canais de cálcio

Tipo-N). Os canais de cálcio LVA foram denominados Tipo-T (T de transiente) (Nowycky et al., 1985).

Um tipo adicional de canal de cálcio HVA, originalmente encontrado em células cerebelares de Purkinge, é o canal de cálcio Tipo-P, o qual é inibido pela toxina peptídica  $\omega$ -agatoxina IVA (Scott et al., 1990). Quando canais de cálcio, expressos em oócitos, foram testados quanto à sua sensibilidade à  $\omega$ -agatoxina IVA, verificou-se que esses canais têm uma baixa sensibilidade à  $\omega$ -agatoxina IVA (~200 nM) (Sather et al., 1993), enquanto que a sensibilidade aos canais Tipo-P é bem maior (~2 nM). Isso levou à proposta que havia ainda um outro tipo de canal de cálcio HVA: o canal de cálcio Tipo-Q (Zhang et al., 1993). A distinção entre canais de cálcio Tipo-P e Tipo-Q nem sempre é óbvia, daí então eles são frequentemente agrupados como canais de cálcio Tipo-P/Q.

Se os tipos T, L, N e P/Q compreendessem todos os canais dependentes de voltagem que permitem a entrada de cálcio no terminal após despolarização, logo seria possível abolir por completo a entrada de cálcio causada por uma despolarização pequena e prolongada (para inativar correntes de cálcio Tipo-T) e na presença de um “coquetel” contendo concentrações inibitórias de DHP,  $\omega$ -conotoxina GVIA e  $\omega$ -agatoxina IVA. Isso nem sempre acontece e alguma atividade residual de canais de cálcio permanece. Foi então proposto que essa entrada residual de cálcio fosse atribuída à canais de cálcio denominados Tipo-R. Sua voltagem de ativação é intermediária entre os canais HVA e LVA e sua atividade é bloqueada por baixas concentrações de níquel (Zhang et al., 1993).

Atualmente já foram identificados nove canais de cálcio dependentes de voltagem (figura 3). Essa diversidade emana predominantemente da natureza da subunidade  $\alpha_1$  formadora do poro principal. Há três diferentes famílias de subunidades  $\alpha_1$  dos canais de cálcio: genes  $Ca_v1$  que codificam canais Tipo-L, genes  $Ca_v3$  que codificam canais Tipo-T e genes  $Ca_v2$  que codificam canais Tipo-N, P/Q e R, com os canais Tipo-P e Tipo-Q surgindo como um rearranjo alternativo do gene  $Ca_v2.1$  (Catterall, 2000).



**Figura 3: Aspectos estruturais dos canais de  $Ca^{2+}$  regulados por voltagem.** (a) composição das subunidades dos canais de  $Ca^{2+}$ . (b) Topologia transmembrana da subunidade  $\alpha_1$ . Sítios chave de interação protéica são indicados por setas. Os círculos vermelhos representam sítios importantes de fosforilação e os símbolos de adição denotam os sensores de voltagem nos domínios transmembrana. Subunidades  $\beta\gamma$  da proteína G podem interagir com um macrosítio formado pela ligação do N-terminal ao *loop* do domínio I-II. Esta figura enfatiza a estrutura dos canais  $Ca_v2.1$  e  $Ca_v2.2$  destacados de azul no texto de (a). (retirado de Evans and Zamponi, 2006).

## 1.4 - Antagonistas de canais de $\text{Ca}^{2+}$ neuronais como ferramentas para investigar a neurotransmissão

Dada a grande dificuldade prática de se fazer registros de correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  diretamente em terminais sinápticos com algumas exceções: (Stanley and Goping, 1991; Yawo and Chuhma, 1993; Borst and Sakmann, 1996), a maioria das informações sobre canais responsáveis pela liberação de neurotransmissores utilizam ferramentas farmacológicas específicas para bloquear ou ativar canais de cálcio sensíveis à voltagem.

Várias toxinas peptídicas obtidas de venenos animais bloqueiam diferentes tipos de canais de cálcio regulados por voltagem com diferentes seletividades (revisado por Olivera et al., 1994). Essas toxinas, comumente chamadas de  $\omega$ -toxinas, são extraídas principalmente do veneno de dois organismos: de moluscos marinhos do gênero *Conus* ( $\omega$ -conotoxinas) e da aranha *Agelenopsis aperta* ( $\omega$ -agatoxinas).

A especificidade dessas toxinas para diferentes subtipos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  fazem delas excelentes ferramentas investigatórias (Tab. 1). Por exemplo, a  $\omega$ -conotoxina-GVIA bloqueia, com grande potência, canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por alta voltagem (VGCC's) Tipo-N, dihidropiridina-resistentes mas não bloqueiam canais de  $\text{Ca}^{2+}$  Tipo-L (McCleskey et al., 1987; Aosaki and Kasai, 1989; Olivera et al., 1994). Já a  $\omega$ -agatoxina-IIIa tem ação mais ampla e bloqueia tanto canais de  $\text{Ca}^{2+}$  Tipo-L como Tipo-N (Mintz et al., 1991; Venema et al., 1992; Mintz, 1994). Alguns neurônios expressam canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por alta voltagem que são resistentes à  $\omega$ -agatoxina-IIIa e também a uma ação combinada de dihidropiridinas com  $\omega$ -conotoxina GVIA, sendo que uma fração significativa dessas correntes de cálcio ocorre por canais de  $\text{Ca}^{2+}$  Tipo-P/Q. Estes canais por sua vez são classicamente bloqueados pela  $\omega$ -conotoxina MVIIC e pela  $\omega$ -agatoxina-IVa. Esta última toxina apresenta maior especificidade para canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo P (Hillyard et al., 1992; Mintz and Bean, 1993).

Classe eletrofisiológica	Sensitividade à drogas
P/Q	AgalVA, MVIIC
N	GVIA, MVIIA, MVIIC
L	DHP
R	Baixas concentrações de Ni <sup>2+</sup>

**Tabela 1: Bloqueadores das diversas correntes de Ca<sup>2+</sup> neuronais.** AgalVA,  $\omega$ -agatoxina IVA de *Agelenopsis aperta*; MVIIC,  $\omega$ -conotoxina MVIIC de *Conus magnus* (também conhecida como SNX-230); GVIA,  $\omega$ -conotoxina GVIA de *Conus geographus* (SNX-124); MVIIA,  $\omega$ -conotoxina MVIIA de *Conus magnus* (SNX-111); DHP, dihidropiridina (adaptado de Miljanich and Ramachandran, 1995).

## 1.5 - Potencial terapêutico de neurotoxinas antagonistas de canais de Ca<sup>2+</sup>

A regulação da liberação de neurotransmissores é a base que rege o desenvolvimento de agentes terapêuticos seguros e eficazes, direcionados contra subtipos específicos de canais de Ca<sup>2+</sup> sensíveis à voltagem. A liberação de neurotransmissores no SNC depende de múltiplos subtipos de canais de Ca<sup>2+</sup> e a complementaridade de ação desses canais varia de uma população de sinapses para a outra (Wheeler et al., 1994).

A diversidade de genes que codificam canais de Ca<sup>2+</sup> gera diferentes subtipos de canais com diferentes funções fisiológicas. Isso sugere a possibilidade de uso de antagonistas subtipo-específicos para esses canais, como novos agentes no tratamento para algumas neuropatologias (Miljanich and Ramachandran, 1995). De fato, ações neuroprotetoras e analgésicas de bloqueadores de canais Tipo-N fortalecem essa hipótese. Essas propriedades levaram a estudos clínicos em humanos avaliando o efeito desses agentes na prevenção da degeneração neuronal oriúnda de traumas cerebrais isquêmicos e na persistência da dor.

Antagonistas clássicos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  da classe das dihidropiridinas, fenilalquilaminas e benzotiazepinas são usados com sucesso no tratamento de uma variedade de distúrbios cardiovasculares, devido às suas ações em VGCC's da musculatura lisa e cardíaca. Contudo esses antagonistas não são eficazes em proteger os neurônios das consequências da isquemia (Steen et al., 1984; Ohta et al., 1991). A partir daí, o surgimento de novos e mais seletivos antagonistas das diferentes classes de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  neuronais abriram caminhos para novos tratamentos de uma variedade de distúrbios patológicos neuronais nos quais os VGCC's possam estar envolvidos.

Sendo assim, várias linhas de pesquisa são direcionadas visando a aplicabilidade de antagonistas de VGCC's Tipo não-L na hipertensão, neuroproteção e isquemia. Antagonistas Tipo-N bloqueiam com elevada potência a liberação de norepinefrina de terminais nervosos simpáticos (Hirning et al., 1988; Clasbrummel et al., 1989), logo esses agentes seriam úteis em novas terapias em algumas formas de hipertensão (Bowersox et al., 1992). A ativação de receptores de neurotransmissores aminoácidos excitatórios e o acúmulo de cálcio intracelular são eventos que estão implicados no processo que leva à degeneração neuronal induzida pela isquemia cerebral. Assim, espera-se que bloqueadores de VGCC's, especialmente aqueles que bloqueiam a liberação de neurotransmissores excitatórios, possam exercer ação neuroprotetora após insultos isquêmicos, no cérebro. Experimentos recentes confirmam essa hipótese (Pinheiro et al., 2006). Antagonistas Tipo-N inibem a transmissão não só em sinapses centrais mas também periféricas. VGCC's tipo-N estão marcadamente localizados nas camadas superficiais do corno dorsal (lâminas I e II) as quais recebem densa inervação vinda de fibras aferentes A $\delta$  e C na medula espinhal. Essas observações sugerem que o bloqueio da neurotransmissão nessas terminações, por ex. por antagonistas de VGCC's Tipo-N terão efeitos antinociceptivos, além de gerar poucos efeitos adversos, especialmente se o antagonista for administrado via intraespinhal (Miljanich and Ramachandran, 1995). Consistente com essa hipótese, o antagonista de VGCC Tipo-N SNX-111 (derivado sintético da  $\omega$ -conotoxina MVIIA, ver tabela 1) foi recente registrado como o primeiro fármaco de uso humano derivado de uma neurotoxina animal a ser empregado no tratamento da dor (Brose et al., 1997).

Diversos estudos vem sendo feitos em nosso laboratório e em outros grupos de colaboração avaliando o efeito de uma nova classe de neurotoxinas, as toxinas isoladas do veneno da aranha brasileira *Phoneutria nigriventer*, sobre certas condições neuropatológicas como na isquemia, *in vitro*, e na nocicepção. Os resultados (Pinheiro et al., 2006 e dados ainda não publicados) apontam para novas toxinas eficazes do controle da degeneração neuronal após insultos isquêmicos e no controle da dor, vinda de diversos estímulos nóxicos.

## **1.6 - *Phoneutria nigriventer***

Aranhas do gênero *Phoneutria*, família Ctenidae, são amplamente distribuídas em regiões quentes da América do Sul. Várias espécies são descritas mas a *P. nigriventer* é a mais comum encontrada nas regiões centro e sul do Brasil. Essa espécie é também frequentemente envolvida em acidentes com picadas de aranha, em humanos. A *Phoneutria nigriventer* é uma aranha extremamente agressiva, de hábitos noturnos e erráticos, sendo predadora natural de uma variedade de insetos, outras aranhas, pequenos roedores, etc. Essa aranha não constrói teia e o seu sucesso como predadora pode, em parte, ser explicado pela diversidade de potentes toxinas presentes no seu veneno (Rezende Junior et al., 1991; Gomez et al., 2002). Seu nome popular, *Armadeira*, advém da postura corporal que a aranha assume quando é molestada ou antes de atacar a presa, quando ela mantém erguidas os 2 dois pares de patas dianteiras (Fig. 4).

A picada da *Phoneutria nigriventer* causa dor severa e irradiante e vários sintomas tóxicos incluindo espamos, tremores, convulsões tônicas, paralisia espástica, priampismo, cialorréia, disritmia, distúrbios visuais e sudorese fria (revisado por Lucas, 1988). Esses sintomas são usualmente mais severos em crianças e, se não tratados, podem levar à morte. Baseado nos sintomas observados em humanos e nos resultados de injeções intracérebro ventriculares em animais experimentais viu-se que o veneno de *Phoneutria* é, sobretudo, neurotóxico.

Parte do efeito neurotóxico do veneno parece estar relacionado à sua ação sobre canais de  $\text{Na}^+$  regulados por voltagem (Araujo et al., 1993; Romano-Silva et al., 1993). Entretanto, outras atividades farmacológicas, relacionadas à ação em canais iônicos, podem ser encontradas em todo o veneno. Essa observação pode ser mais facilmente comprovada pelo fracionamento do veneno, em que se separa as frações com ações farmacológicas distintas.

### **1.7 - Ação das toxinas purificadas do veneno da *Phoneutria nigriventer***

Rezende e cols. (1991) propuseram um método para o fracionamento do veneno da *Phoneutria nigriventer*, através do qual o veneno é processado através de uma combinação de filtração em gel e RFPLC gerando 3 frações neurotóxicas distintas (PhTx1 a PhTx3) (Fig. 5).

Em ratos, os sintomas neurotóxicos após injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de PhTx1 foram elevação da cauda, excitação e paralisia espástica das extremidades posteriores (Rezende Junior et al., 1991). Apesar da PhTx1 não causar despolarização nem hiperpolarização na junção neuromuscular, ela ainda é tóxica a um número restrito de fibras musculares e estruturas nervosas, possivelmente através de uma atuação no sarcolema e axolema (Mattiello-Sverzut et al., 1998). A fração PhTx2 produz sinais excitatórios em ratos após injeção intracerebroventricular, incluindo salivação, lacrimação, priapismo, convulsões e paralisia espástica dos membros inferiores e posteriores, além de contração do íleo em porquinho da índia (Rezende Junior et al., 1991). A fração PhTx2 é a principal responsável pela ação celular excitatória do veneno, ela diminui a inativação de canais de  $\text{Na}^+$  e aumenta a ativação desses canais (Araujo et al., 1993). Além do mais, a PhTx2 aumenta o influxo de sódio em sinaptosomas cérebro corticais, induzindo despolarização da membrana, influxo de cálcio e liberação de glutamato de uma maneira sensível à TTX (Romano-Silva et al., 1993).



Figura 4: aranha *Phoneutria nigriventer*

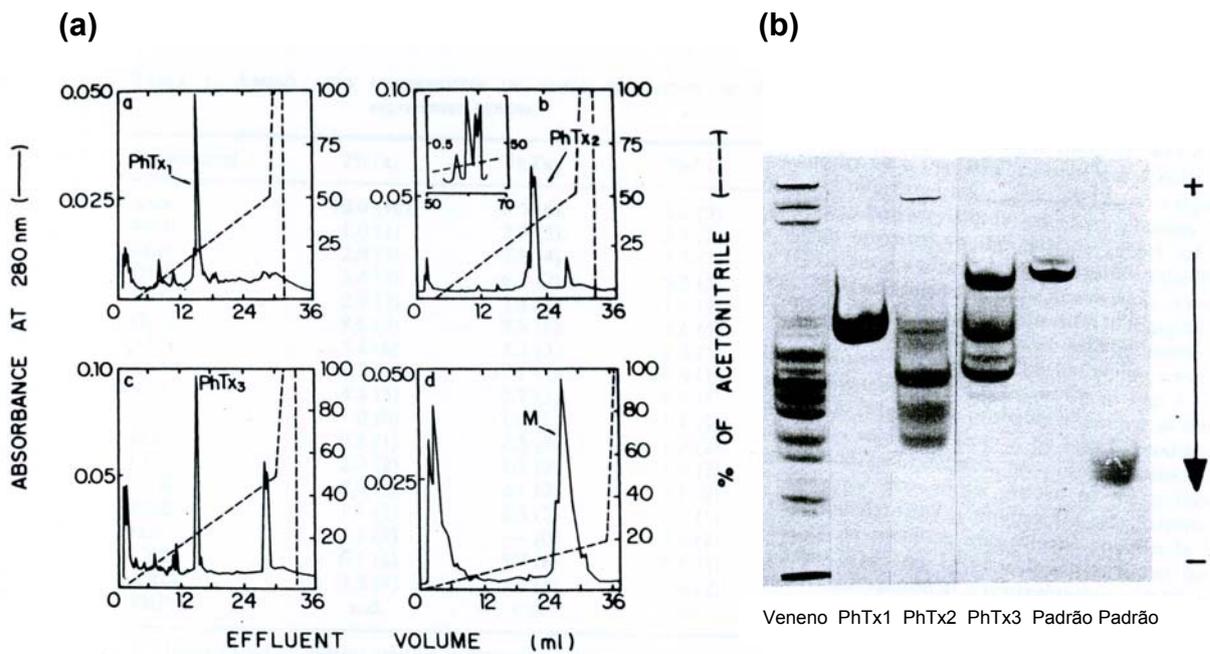


Figura 5: Purificação das frações Tx1 a Tx3 do veneno de *Phoneutria nigriventer*: (a) Cromatogramas de RFPLC das frações obtidas do veneno bruto de *Phoneutria nigriventer* após ser submetido a uma primeira etapa de purificação em filtração em gel. (b) Gel de eletroforese do veneno de *Phoneutria nigriventer* e das toxinas purificadas. (adaptado de Rezende Junior et al., 1991)

A outra fração tóxica, PhTx3, administrada i.c.v. em ratos causou paralisia flácida (Rezende Junior et al., 1991), possivelmente em consequência da ação inibitória sobre a liberação de neurotransmissores (Gomez et al., 1995; Prado et al., 1996). Seis diferentes toxinas (Tx3-1 a 6) foram purificadas a partir da fração PhTx3 (Cordeiro Mdo et al., 1993) e pelo menos 3 delas (Tx3-3, Tx3-4 e Tx3-6) bloquearam o influxo de  $Ca^{2+}$  induzido por KCl, em terminais nervosos (Prado et al., 1996; Guatimosim et al., 1997; Miranda et al., 1998), sugerindo que essas toxinas bloqueiam canais de  $Ca^{2+}$  e são, portanto, novas  $\omega$ -conotoxinas. Além de ter toxinas que interagem com canais de  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$ , uma das toxinas da *Phoneutria*, a toxina PhTx3-1 é uma bloqueadora potente e seletiva de canais de  $K^+$  Tipo-A, aumentando a frequência de oscilações de  $Ca^{2+}$  em células GH3 (Kushmerick et al., 1999). Outra toxina, a toxina PhTx3-2, é capaz de bloquear, ainda que parcialmente, canais de  $Ca^{2+}$  Tipo-L (Kalapothakis et al., 1998).

Das toxinas bloqueadoras de canais de  $Ca^{2+}$ , isoladas do *pool* PhTx3, a toxina PhTx3-3 foi uma das primeiras a ser estudada. Dados farmacológicos iniciais sugeriram que essa toxina inibe a liberação de acetilcolina em fatias de córtex e em neurônios do plexo gástrico mas essa ação não possuía um efeito aditivo com a  $\omega$ -agatoxina IVA na liberação de Ach (Gomez et al., 1995) além disso a PhTx3-3 é uma bloqueadora eficaz da liberação de glutamato (Prado et al., 1996). Através do uso dos marcadores fluorescentes Fura2-AM e FM1-43 em sinaptosomas cérebro-corticais, para monitorar medidas de  $Ca^{2+}$  interno e de liberação de vesículas, respectivamente, foi observado que a PhTx3-3 inibe com alta potência ( $IC_{50}$  0,9nM) canais de  $Ca^{2+}$  que regulam a entrada de  $Ca^{2+}$  em sinaptosomas e também bloqueia a exocitose de vesículas sinápticas, sendo que esse efeito se dá em canais de  $Ca^{2+}$  que também são inibidos pela  $\omega$ -agatoxina IVA (Guatimosim et al., 1997).

## 1.8 – PhTx3-4

A Toxina PhTx3-4 (também conhecida por outros autores como  $\omega$ -Phonetoxina IIA e por PF3) junto com a PhTx3-3 é a mais tóxica dentre aquelas do *pool* PhTx3 e quando injetada i.c.v. em ratos (5 $\mu$ g/rato) causa paralisia

flácida geral seguida de morte em 10-30 min (Cordeiro Mdo et al., 1993). Seu efeito parece estar associado à uma ação antagonista sobre canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , já que ela bloqueou o influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em sinaptosomas cérebro-corticais estimulados com tityustoxina (Miranda et al., 1998). Em neurônios do gânglio da raiz dorsal, onde há uma alta prevalência de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  Tipo-N, a PhTx3-4, em concentrações sub-nanomolares, bloqueou correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  disparadas por alta voltagem, já em células  $\beta$ -pancreáticas (canais Tipo-L), o bloqueio exercido pela toxina foi 40 vezes menos potente (Cassola et al., 1998).

Ensaio utilizando linhas celulares expressando canais de cálcio recombinantes (P/Q, N e R) mostraram que correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  geradas por canais tipo P/Q e N são bloqueadas quase que irreversivelmente pela PhTx3-4, enquanto que correntes Tipo-R são parcialmente bloqueadas e de forma reversível pela mesma toxina. Além disso, a PhTx3-4 se liga a sinaptosomas cerebrais em múltiplos sítios de ligação já que a  $\omega$ -conotoxina GVIA e  $\omega$ -conotoxina MVIIC foram capazes de deslocar apenas parcialmente a  $^{125}\text{I}$ -Toxina C do seu sítio de ligação (Dos Santos et al., 2002). Confirmando esses dados, (Troncone et al., 2003), em elegante experimento com junção neuromuscular de rã, mostraram que de fato a PhTx3-4 se liga aos canais Tipo-N em um sítio distinto daquele ao qual se liga a  $\omega$ -conotoxina GVIA e mostraram também que esse bloqueio é irreversível quando o meio contém baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (0,5mM).

Na liberação de neurotransmissores, a PhTx3-4 bloqueia tanto a liberação de glutamato dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  quanto a liberação independente, um efeito que nunca havia sido descrito para uma neurotoxina peptídica. Uma hipótese que explicaria esse efeito seria a de que a PhTx3-4 bloquearia carreadores de glutamato, além de VGCC's. De fato essa hipótese foi confirmada quando mostrou-se que a Toxina C bloqueia a captação de L- $^3\text{H}$ glutamato em sinaptosomas (Reis et al., 1999). Esses dados sugerem também que a inabilidade das  $\omega$ -conotoxinas GVIA e MVIIC em deslocar completamente a Toxina C, se dê em razão da ação da PhTx3-4 sobre carreadores de glutamato.

Mesmo diante dos relatos existentes que tentam explicar o efeito da PhTx3-4, o mecanismo de ação exato desse peptídeo ainda é intrigante e

complexo. Apesar da toxina C bloquear o influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em sinaptosomas (Miranda et al., 1998), ainda não é claro como esse influxo é acoplado a canais de  $\text{Ca}^{2+}$  que disparam a exocitose e que seriam abertos por potenciais de ação. Como os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  são considerados alvos em potencial direcionados para a terapêutica de vários distúrbios neuropatológicos, o estudo da farmacologia toxina-canal da PhTx3-4 se faz interessante tanto para perspectivas clínicas como também científicas.

## **2 - OBJETIVOS**

## 2.1 – Objetivo geral

Avaliar a ação da toxina PhTx3-4 do veneno de *Phoneutria nigriventer* sobre os níveis de cálcio e sobre a exocitose de vesículas sinápticas em terminais nervosos cérebro-corticais de ratos (sinaptosomas).

## 2.2 – Objetivos específicos

- Avaliar o efeito e a potência da Toxina sobre a exocitose de vesículas sinápticas em sinaptosomas despolarizados por KCl e marcados com FM2-10.

- Investigar o efeito da PhTx3-4 sobre os níveis de cálcio intracelular em sinaptosomas após despolarização com KCl.

- Comparar o efeito da toxina PhTx3-4 com o de outros bloqueadores clássicos de canais de cálcio regulados por voltagem, associados ou isoladamente, sobre a dinâmica de cálcio intra sinaptosomal após despolarização com KCl .

- Comparar o efeito da toxina PhTx3-4 com o de outros bloqueadores clássicos de canais de cálcio regulados por voltagem, associados ou isoladamente, sobre a exocitose de vesículas sinápticas em sinaptosomas despolarizados com KCl .

### **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 – Equipamentos

- Banho-maria regulado na temperatura de 35°C

Modelo: 1050/270 da Biomatic

- Homogeneizador

Modelo: Glass Col 099C

- Bomba peristáltica

Modelo 7533-80 – Cole Parmer

- Centrífuga refrigerada

Modelo: HIMAC CR 21E da HITACHI KOKI CO, LTDA, japão.

- Microcentrífuga refrigerada

Modelo 5415R, Eppendorf.

- Espectrofluorofotômetro

Modelo RF-5301 PC. Shimadzu.

### 3.2 - Soluções

#### -Solução de sacarose

Composição: Sacarose 0,32M, EDTA 1,0 mM, DTT (ditiotretol) 0,25 mM. O pH final foi ajustado para 7,4 com solução de NaOH 0,1N.

- Solução Krebs-Ringer-Hepes (KRH)

Composição: NaCl 124mM, KCl 4mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2mM, HEPES 25mM, Glicose 10 mM. O pH final foi ajustado para 7,4 com solução de NaOH 5M.

#### - Soluções Percoll

Composição: 3, 10, 15, 23% (v/v) de Percoll<sup>®</sup> diluídos em solução de sacarose.

#### - Solução KRH-albumina 1mg/mL

Composição: Albumina sérica bovina 1mg/ml diluída em solução KRH.

### 3.3 - Drogas e toxinas

Fura-2 acetoximetil éster (AM), sacarose, Percoll<sup>®</sup>, SDS, EGTA,  $\omega$ -conotoxina MVIIC,  $\omega$ -aga IVA e  $\omega$ -conotoxina GVIA foram adquiridos da Sigma Chemical Co., (Mo, USA). EGTA-AM foi adquirido da Calbiochem. FM2-10 da Molecular Probes (Oregon, USA). A PhTx3-4 foi purificada na FUNED de acordo com Cordeiro e cols. (1993).

### 3.4 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos ou fêmeas, pesando entre 180-200 gramas, tratados sob ciclo 14/10h luz/noite, alimentação e água livre, fornecidos pelo Biotério do departamento de farmacologia – ICB/UFMG. Para cada experimento, foi sacrificado um animal.

### 3.5 - Preparação de sinaptosomas

Os animais foram sacrificados por decaptação em guilhotina. O cérebro era removido de forma rápida, sendo logo em seguida colocado em solução de sacarose mantida em gelo. Os dois hemisférios cerebrais foram separados e dessecados sobre placa de petri contendo papel de filtro embebido com solução de sacarose, para remover o mesencéfalo e metencéfalo, meninges, hipocampo e o máximo possível de mielina, o que é particularmente importante porque a mielina em preparações sinaptosomais requer grandes quantidades de FM2-10 resultando em alta fluorescência no controle e portanto sinal muito ruidoso (Marks and McMahon, 1998). O córtex dessecado foi transferido para tubo Potter-Elvehjen contendo 8 mL de solução sacarose (ver Soluções). O tecido homogeneizado com pistilo de teflon acoplado num homogeneizador Glass Col modelo 099C fazendo-se 14 movimentos de homogeneização e em seguida o homogeinato centrifugado a 1000 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante dessa centrifugação foi coletado e volume completado para 8mL com a mesma solução de sacarose, sendo em seguida aplicado em um gradiente descontínuo de Percoll<sup>®</sup> (23, 15, 10 e 3% v/v em solução de sacarose) como previamente descrito (Dunkley et al., 1986) e submetido a

centrifugação a 37000 g a 4°C, por 15 min. As frações P3 e P4 (que constituem os sinaptosomas) foram recolhidas em conjunto e submetidas a outra centrifugação a 37000 g a 4°C, por 20 min, agora em solução KRH sem cálcio (ver Soluções) para a retirada do excesso de Percoll® e precipitação dos sinaptosomas. O precipitado (fração sinaptosomal purificada) foi ressuspensionado e aliquoteado em volumes que variaram conforme o tipo de experimento realizado, seja de exocitose ou seja de captação de cálcio. Para ensaios de exocitose de vesículas sinápticas, o precipitado foi ressuspensionado e homogeneizado em 4 mL de solução KRH e dividido em alíquotas de 500 µL cada. Para ensaios de cálcio intracelular o precipitado foi ressuspensionado e homogeneizado em 2400 µL de KRH sem cálcio e em seguida dividido em alíquotas de 200 µL. Em ambos os experimentos, as alíquotas eram transferidas para tubos cônicos de micro-centrífuga e mantidas no gelo até a realização dos experimentos (máximo 3 horas). Amostras de aproximadamente 50 µL eram reservadas e congeladas a -20°C para posterior dosagem de proteínas segundo método de (Lowry et al., 1951).

### **3.6 - Ensaio de exocitose de vesículas sinápticas**

Os sinaptosomas (alíquotas de 500µL contendo aproximadamente 1mg/ml de proteína sinaptosomal) foram diluídos para 1mL com solução KRH e transferidos para uma cubeta de fluorímetro contendo um agitador magnético. Foi adicionado FM2-10 50µM (solução estoque a 25mM) às alíquotas e cloreto de cálcio 5mM (solução estoque a 1M) que depois eram incubadas a 37°C sob agitação e ao abrigo da luz, por 3 minutos, para a marcação dos sinaptomas com o FM2-10. Foi adicionado KCl 30mM (solução estoque a 3M) para estimular a captação do marcador e após 45 seg. o material foi transferido para tubo tipo eppendorf e centrifugado a 10000rpm por 15 seg, o sobrenadante era descartado e depois ressuspensionado com 1mL de solução KRH contendo albumina bovina 1mg/mL, sendo novamente centrifugado a 10000rpm/15seg. A albumina bovina contribui para a lavagem do excesso de FM2-10 que ficou ligado na membrana externa do sinaptosoma e que não foi internalizado após estímulo com KCl 30mM. O sobrenadante descartado e novamente

ressuspendido com 1mL de KRH-albumina e centrifugado a 10000rpm/15seg. Após desprezar o sobrenadante, os sinaptosomas eram ressuspendidos agora em 2mL solução KRH sem albumina, transferidos para a cubeta de fluorímetro contendo agitador magnético. Iniciou-se a leitura em um espectrofluorímetro SHIMADZU RF-5301 PC, com a excitação ajustada num comp. de onda de 488nm e a emissão em 570nm, taxa de aquisição 4 pontos por seg. e tempo total de leitura 500 seg.

### **3.7 - Medida do cálcio livre intrasinaptosomal**

Fura2-AM (solução estoque a 1mM em DMSO) foi adicionado à suspensão sinaptosomal para dar uma concentração final de 50 $\mu$ M, a mistura incubada a 37°C por 30min e em seguida diluída para 1200 $\mu$ L, seguida por mais 30min de incubação. O marcador Fura2-AM isolado dos terminais nervosos foi lavado através de centrifugação e o sinaptosoma foi ressuspenso com 2mL de solução KRH sendo imediatamente transferido para cubeta fluorimétrica e usado para a quantificação fluorimétrica do cálcio intracelular em espectrofluorímetro. A emissão de fluorescência foi detectada a 510 nm usando como faixa de excitação média 340/380 nm sob temperatura controlada a 37°C e sob constante agitação. CaCl<sub>2</sub> foi adicionado à suspensão sinaptosomal (1,0 mM concentração final) no início de cada doseamento fluorimétrico. Toxinas bloqueadoras específicas de canais de cálcio e a Toxina C foram adicionadas (separadamente ou em associação) à suspensão 6- segundos antes da despolarização dos sinaptosomas com KCl 30mM. O aumento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzido pela despolarização da membrana é estritamente dependente da presença de Ca<sup>2+</sup> nestas condições (Romano-Silva et al., 1993).

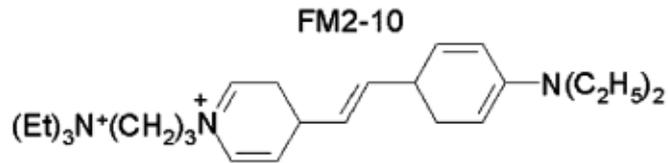
### **3.8 - Análise estatística dos resultados**

Os experimentos foram realizados em dias independentes e repetidos no mínimo três vezes. Os resultados foram analisados por análise de variância pelo programa Sigma plot versão 8.0 considerando diferenças entre grupos estatisticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ .

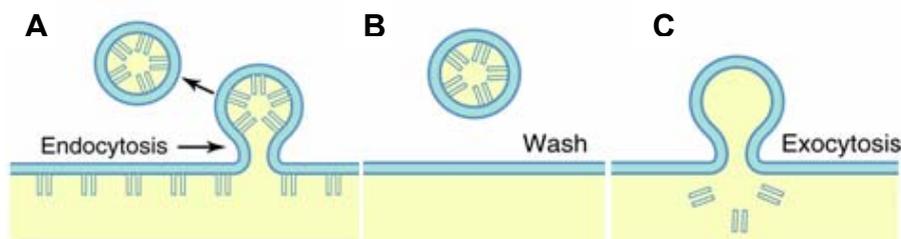
### 3.9 - Uso de FM2-10 para monitorar a exocitose

Com o desenvolvimento dos marcadores “FM”, tornou-se possível o estudo de vários aspectos da transmissão sináptica. Marcadores FM são comumente usados como indicadores da exocitose e, em associação com outras técnicas tal como indicadores fluorescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e técnicas eletrofisiológicas, ajudam a elucidar os mecanismos da homeostase pré-sináptica de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cochilla et al., 1999). Esses marcadores foram inicialmente desenvolvidos para serem sensores de potencial de membrana mas com o passar do tempo, foram se tornando úteis ferramentas no estudo da transmissão sináptica e da reciclagem de vesículas sinápticas. A grande utilidade dos FM's reside na observação de que essas moléculas se ligam reversivelmente a membranas, na inabilidade de não atravessarem as membranas e, principalmente, por emitir fluorescência consideravelmente maior estando ligadas do que quando desligadas das membranas (Betz et al., 1996). Moléculas FM tem caráter anfipático e consistem em uma calda lipofílica ligada (via uma ou múltiplas ligações duplas) a uma cabeça positivamente carregada (Fig. 6).

Em preparações neuronais como junção neuromuscular, neurônios em cultura ou em sinaptosomas o ciclo de vesículas sinápticas é monitorado da seguinte forma: o marcador presente no meio externo se liga à membrana extracelular. Após estimulação, a exocitose causa a fusão da membrana da vesícula com a membrana celular, então o FM se liga à membrana excitotica. A membrana marcada é então endocitada e, após lavagem do excesso de FM não internalizado, as vesículas endocitóticas podem ser desmarcadas por uma segunda rodada de estimulação (Betz and Bewick, 1992) (Fig. 7). Uma das grandes vantagens do uso de FM's é que esses corantes permitem distinguir a exocitose da endocitose com o mínimo de interferência de outros processos, apesar da curta fração temporal que separa esses dois eventos (revisado por Cousin and Robinson, 1999).



**Figura 6: Estrutura química da molécula FM2-10:** A cabeça da molécula é um determinante chave que impossibilita o marcador de atravessar membranas biológicas. O comprimento da calda lipofílica da molécula determina as propriedades da cinética de marcação das membranas. Marcadores com uma longa calda lipofílica marcam membranas com uma maior afinidade do que marcadores com calda curta. Por fim, as características espectrais de fluorescência desses marcadores é determinada pela quantidade de duplas ligações entre a cabeça e a calda (retirado de Brumback et al., 2004).



**Figura 7: Monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas por FM2-10.** (A) Marcação da membrana do terminal pré-sináptico com o FM2-10 adicionado ao meio externo. A membrana recebeu um estímulo despolarizante na presença do FM2-10. (B) Uma breve lavagem remove as moléculas de FM que não foram internalizadas. (C) Um segundo ciclo de exocitose induzido por estímulo despolarizante resulta na liberação da sonda que foi internalizada durante a endocitose. (Basic Neurochemistry, seventh edition. Edited by Siegel et. al., 2006).

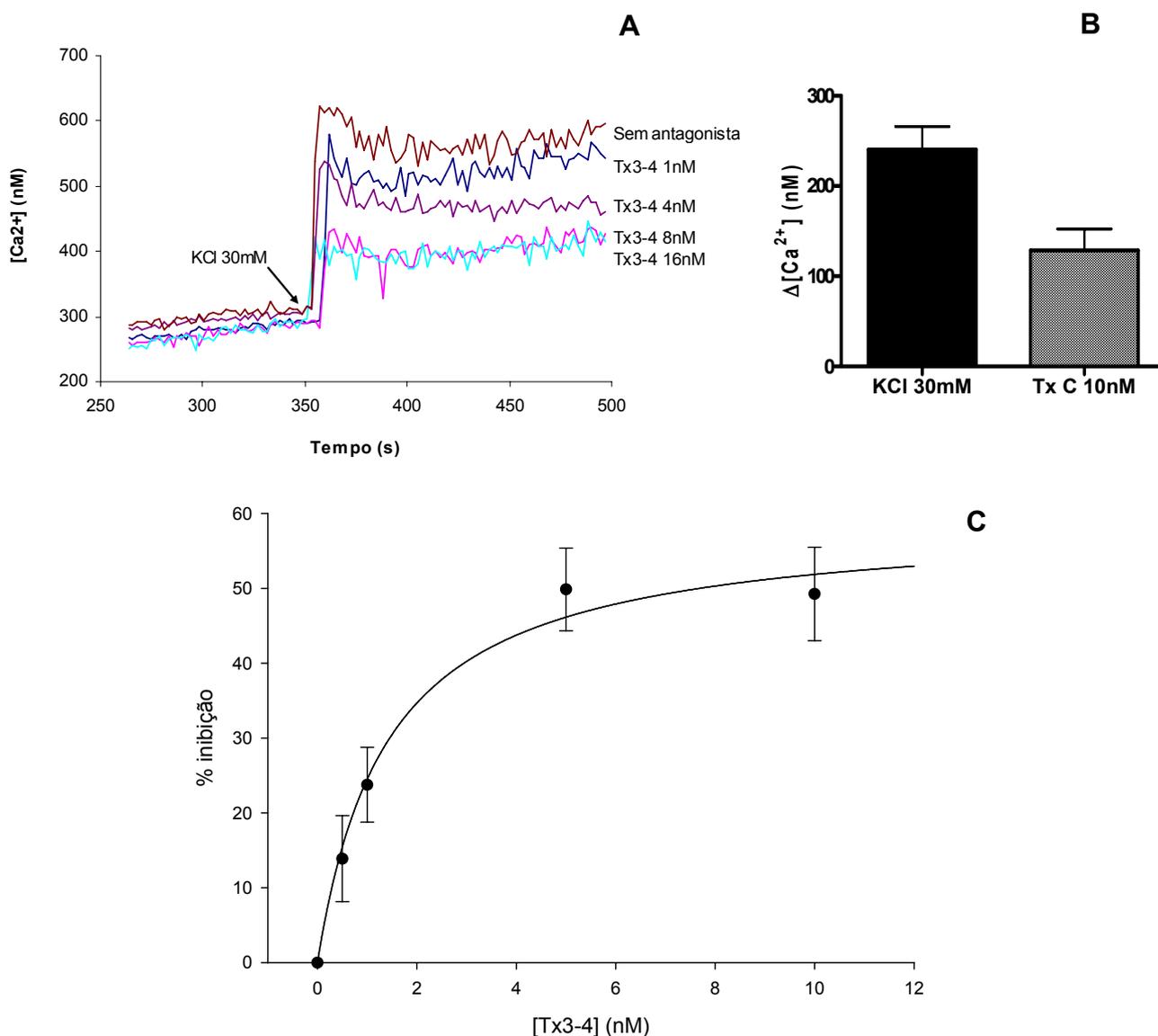
## **4 - RESULTADOS**

#### 4.1 – PhTx3-4 e medidas de cálcio intrasinaptosomal

Medidas de cálcio livre intrasinaptosomal foram realizadas utilizando o marcador fluorescente de cálcio Fura2-AM. Esta substância tem a propriedade de atravessar membranas celulares e, após a quebra da ligação éster do grupamento acetoximetil (AM) por esterases celulares inespecíficas, o Fura2 fica livre no citoplasma aumentando sua fluorescência em presença de cálcio (Romano-Silva et al., 1993). Nessa experiência, sinaptosomas foram pré-incubados por 1 hora com Fura2-AM 50 $\mu$ M e em seguida, despolarizados com KCl 30mM.

A adição de KCl 30mM causou um aumento de  $240 \pm 25$  nM na  $[Ca^{2+}]_i$  dos sinaptosomas corticais marcados com Fura-2 (Figura 8). A toxina PhTx3-4, incubada na suspensão sinaptosomal 60s antes da despolarização com KCl, diminuiu a  $[Ca^{2+}]_i$  induzida por KCl de uma maneira dependente da dose (Figura 8A). O  $IC_{50}$  de inibição da toxina PhTx3-4 no aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  induzido pelo KCl foi de 1,4 nM (Figura 8C) e não houve diferença estatisticamente significativa entre o efeito inibitório da toxina a 5 e 10 nM,  $P > 0,05$ .

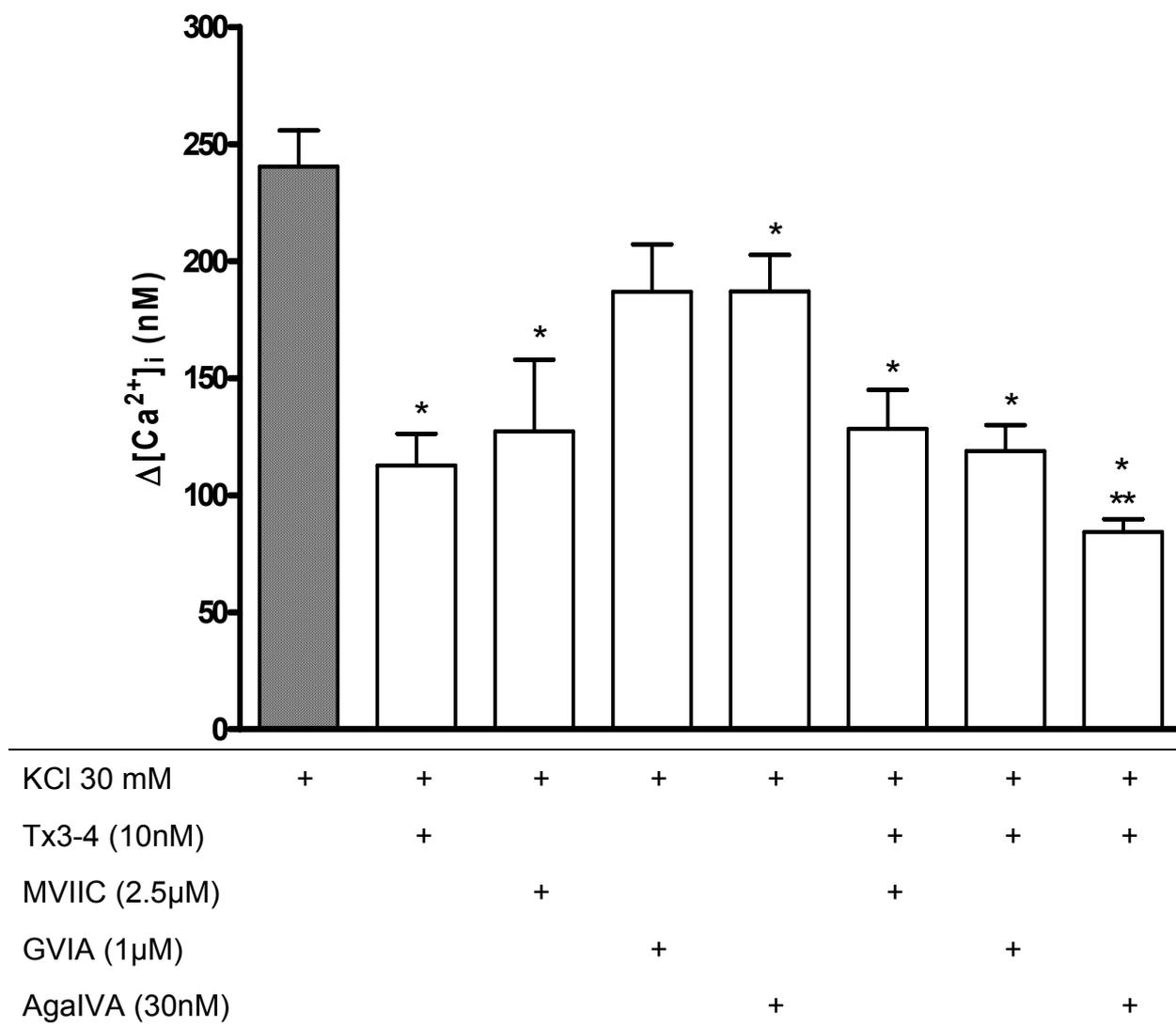
O próximo passo foi então comparar o efeito da toxina PhTx3-4 com outras toxinas bloqueadoras de canais de cálcio, visando obter informações sobre o possível canal de cálcio sobre o qual a toxina age.



**Figura 8: Efeito da PhTx3-4 na  $[Ca^{2+}]_i$  induzida por KCl 30mM:** Após marcação por 1 hora com Fura2-AM, os sinaptosomas eram despolarizados com KCl 30 mM na presença ou ausência da PhTx3-4 em várias concentrações. A toxina PhTx3-4 incubada 60 s antes da despolarização bloqueia o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  induzida por KCl de uma forma dose-dependente. Gráfico representativo de no mínimo 3 experimentos independentes para cada concentração testada (**A**). O gráfico em barras mostra a  $[Ca^{2+}]_i$  após adição de KCl subtraído da  $[Ca^{2+}]_i$  basal (média  $\pm$  EPM) (**B**). Os dados em cada ponto mostram a média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de inibição da  $[Ca^{2+}]_i$  em no mínimo três experimentos independentes para cada concentração testada de PhTx3-4. A linha representa o fitting da curva gerado por regressão não linear (**C**).

## 4.2 – Efeito comparativo da PhTx3-4 com o de toxinas bloqueadoras de canais de cálcio nas medidas de cálcio intracelular

Com o objetivo de testar se os canais de cálcio alvo da PhTx3-4 coincidem com conhecidas classes de canais de cálcio tais como aqueles bloqueados pelas  $\omega$ -toxinas MVIIC, GVIA e AgaIVA, nós medimos as mudanças na concentração de cálcio induzida por KCl em sinaptosomas, na presença dessas diferentes toxinas. A figura 9 mostra que PhTx3-4 (10 nM),  $\omega$ -CgTx MVIIC (2,5  $\mu$ M),  $\omega$ -CgTx GVIA (1  $\mu$ M) e  $\omega$ -Aga IVA (30 nM) diminuíram em aproximadamente 53, 47, 22 e 24% as mudanças da  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela despolarização por KCl. Para testar a sobreposição dos canais de  $Ca^{2+}$  inibidos pelas  $\omega$ -toxinas MVIIC, GVIA e AgaIVA, elas foram incubadas junto com a PhTx3-4 (10 nM) antes da despolarização da suspensão sinaptosomal com KCl 30 mM. A aplicação conjunta de PhTx3-4 (10 nM) com CgTx MVIIC (2,5  $\mu$ M) ou com  $\omega$ -CgTx GVIA (1  $\mu$ M) não causou uma inibição maior do que aquela observada com o uso da PhTx3-4 sozinha. Entretanto, PhTx3-4 (10 nM) aplicada junto à  $\omega$ -Aga IVA (30 nM), uma bloqueadora específica de canais de cálcio Tipo-P (Randal & Tsien, 1995), causou um efeito inibitório aditivo de  $66 \pm 2,3\%$  na variação da  $[Ca^{2+}]_i$  induzida por KCl nos sinaptosomas,  $P < 0,05$ .

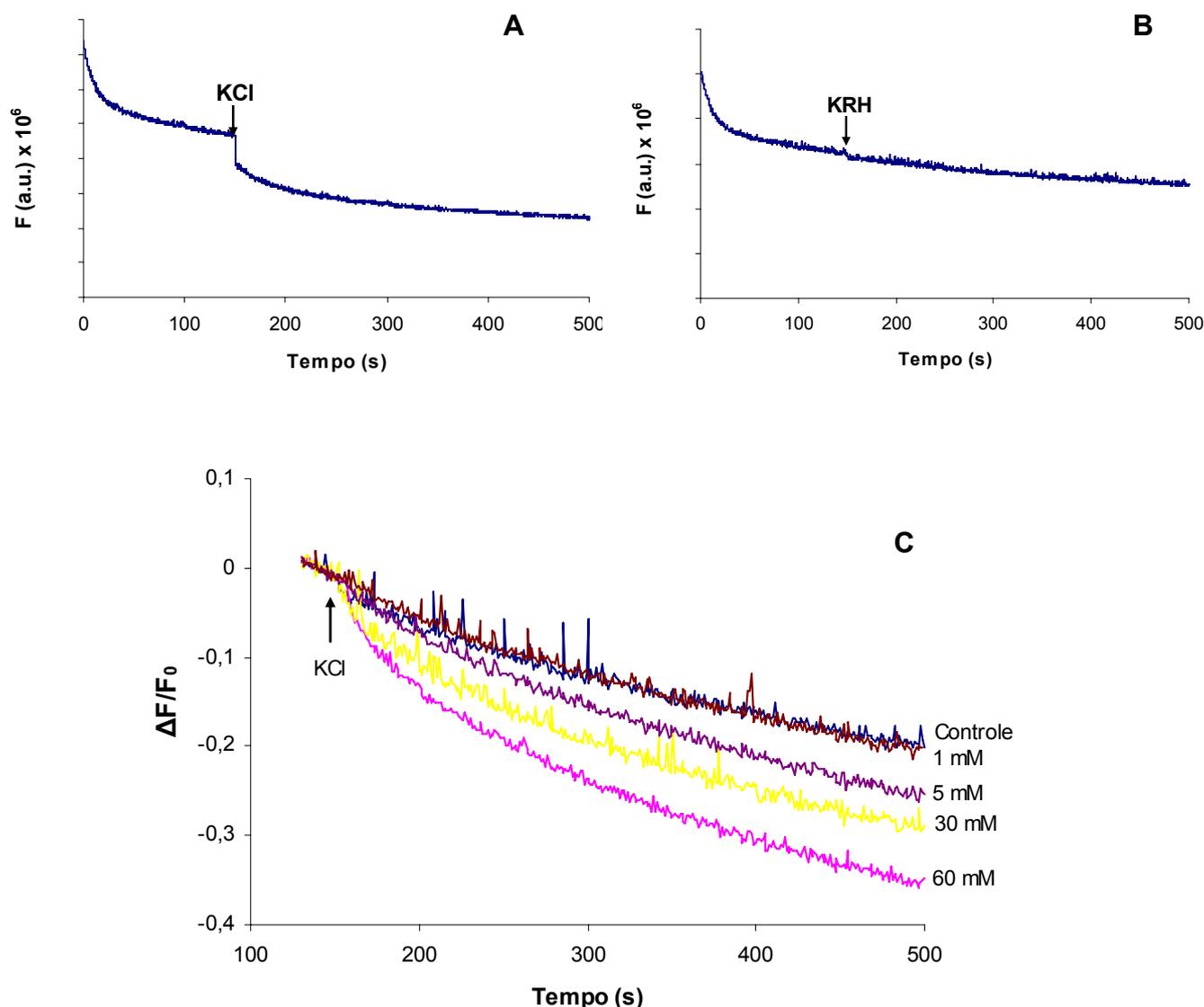


**Figura 9: Efeito das  $\omega$ -toxinas PhTx3-4,  $\omega$ -CgTx MVIIC,  $\omega$ -CgTx GVIA e  $\omega$ -AgaIVA no aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  induzido por KCl.** Sinaptosomas c3rebro-corticais de ratos foram marcados com Fura-2 tal como descrito em materiais e m3todos e em seguida incubados por 30 minutos na presen3a/aus3ncia das toxinas. Ap3s registrar a  $[Ca^{2+}]_i$  basal da por 6 minutos, a suspens3o sinaptosomal era despolarizada com KCl 30 mM.  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  significa a varia3o da concentra3o de c3lcio calculada pela subtra3o dos n3veis de c3lcio ap3s a adi3o de KCl menos os n3veis antes da adi3o de KCl. Colunas representam a m3dia  $\pm$  E.P.M. de pelo menos tr3s experimentos independentes. \* P < 0,05 comparado ao KCl; \*\* P < 0,05 comparado ao valor KCl mais PhTx3-4.

### 4.3 - Exocitose de vesículas sinápticas induzida por KCl

Inicialmente, padronizamos o método de liberação do corante fluorescente FM2-10 com o intuito de monitorar a exocitose de vesículas sinápticas em sinaptosomas cerebrocorticais. Para estes estudos usamos o FM2-10 ao invés do FM1-43 (Meffert et al., 1994; Guatimosim et al., 1997). Essa escolha baseia-se no fato do FM2-10 ser mais hidrofílico que o FM1-43 e portanto mais facilmente lavável de membranas (Betz et al., 1996) gerando linha de base de fluorescência menor (Marks and McMahon, 1998).

Após a marcação dos sinaptosomas com o FM2-10 durante o estímulo despolarizante e subsequente lavagem do FM2-10 não internalizado, os sinaptosomas eram novamente despolarizados com solução KCl 30 mM contendo cálcio 1.3mM sob monitoramento da fluorescência emitida em 570nm (excitação a 488nm). A adição de KCl (30 e 60nM) causou queda significativa ( $p < 0,05$ ) do sinal de fluorescência (Fig. 7). A intensidade dessa queda foi dependente da concentração de KCl empregada. A adição de KRH por sua vez, não causou redução da fluorescência, sugerindo que a queda de fluorescência era dependente do estímulo despolarizante. Com isso, nos experimentos seguintes, foi tomada como 0% de exocitose evocada, a queda da fluorescência causada pela adição de meio KRH (basal). A concentração de KCl escolhida para ser usada nos experimentos seguintes foi de 30mM (controle positivo, normalizado como 100% de liberação). Em todos os experimentos eram realizados controles com estímulo despolarizante (KCl 30mM) e sem estímulo (adição de meio KRH ao invés de KCl).



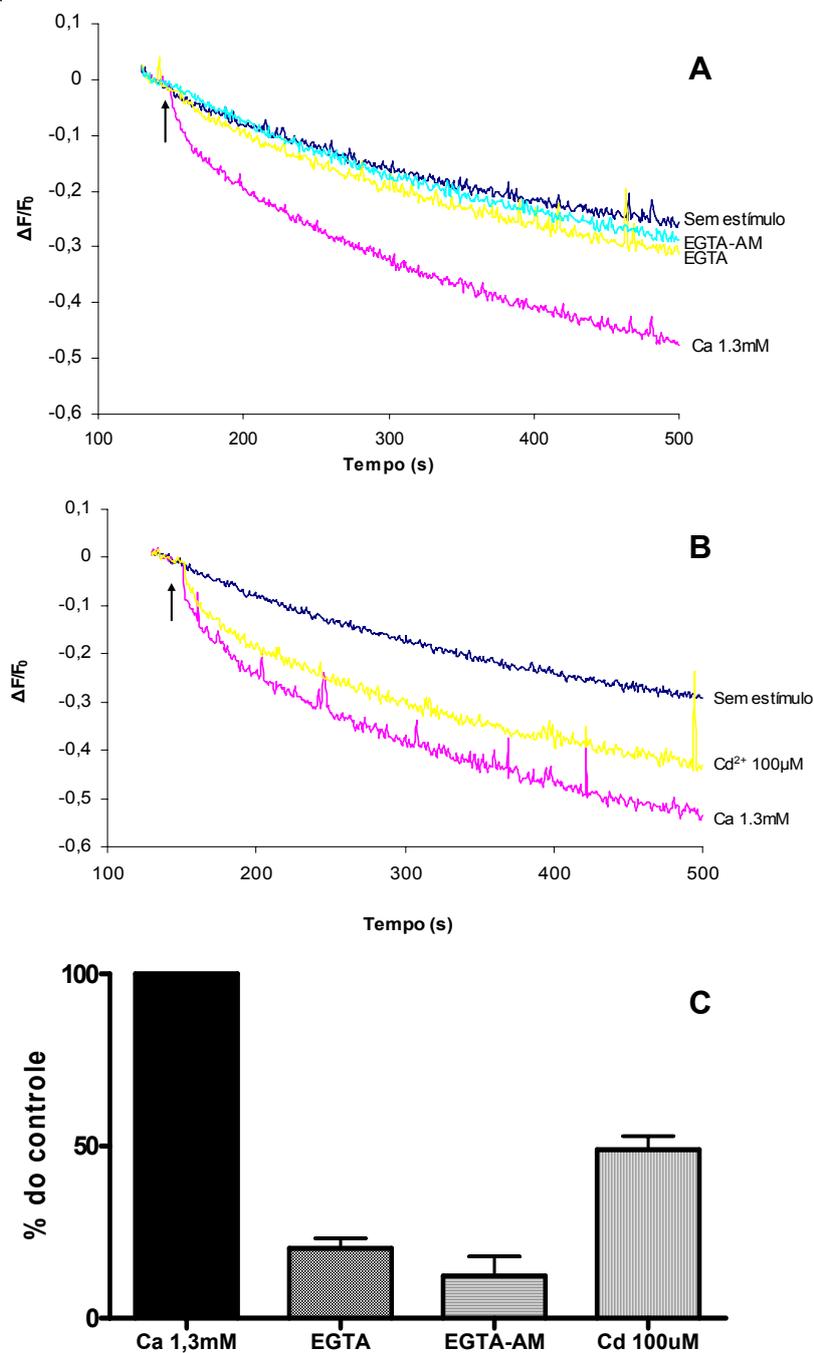
**Figura 10: Exocitose em sinaptosomas cérebrocorticais induzida por despolarização de membrana.** Sinaptosomas cérebro-corticais foram incubados na presença de FM2-10 (50 $\mu$ M) e Ca<sup>2+</sup> (5mM), despolarizados com KCl (30mM), lavados em meio livre de FM2-10 e transferidos para cubeta de fluorímetro para medidas de fluorescência (materiais e métodos). A liberação de FM2-10 foi monitorada após adição de solução de KCl (várias concentrações) (A e C) ou de meio KRH à suspensão de sinaptosomas, contendo cálcio 1,3mM (B). Gráficos representativos de no mínimo 3 experimentos independentes. Setas indicam o momento da adição de KCl ou de KRH. a.u. – unidade arbitrária de fluorescência,  $\Delta F/F$  – fluorescência normalizada.

#### 4.4 - Cálcio e exocitose

A queda da fluorescência induzida por KCl mostrou ser dependente da presença de cálcio no meio extra sinaptosomal. Em sinaptosomas despolarizados em meio sem cálcio e contendo EGTA 2mM, a queda da fluorescência foi de apenas  $20,8 \pm 2,4\%$ , quando comparada àquela na presença de cálcio 1.3 mM no meio de incubação (Fig. 3 - A e C). Logo, a maior fração da exocitose induzida por KCl está ligada à presença de um gradiente químico de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio externo.

Para testar o efeito do cálcio interno na exocitose disparada por KCl, sinaptosomas marcados com FM2-10 foram pré-incubados com EGTA-AM 50  $\mu\text{M}$  (um quelante de cálcio intracelular), 5 minutos antes do estímulo despolarizante com KCl. A queda da fluorescência foi drasticamente diminuída em relação à condição com cálcio no meio externo (Fig. 3 - A e C), contudo não foi mais acentuada que a queda dos experimentos com EGTA, e não mostrou diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos ( $P > 0,05$ ). Testamos também outro quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  interno, o BAPTA-AM. Esse quelante causou queda abrupta da fluorescência, sugerindo que o BAPTA-AM pode interferir com a fluorescência do FM2-10, invalidando, portanto, o experimento (dados não mostrados).

Para testar a entrada de cálcio no terminal pré-sináptico através dos canais de cálcio regulados por voltagem (VGCC's) usamos cádmio, um bloqueador inespecífico de VGCC's. Em sinaptosomas marcados com FM2-10 e previamente incubados com  $\text{Cd}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$ , a queda da fluorescência induzida por KCl foi de aproximadamente 49% em comparação ao controle sem  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 3 - A e C). Juntos, esses dados reafirmam a forte dependência do influxo de cálcio através de VGCC's para a exocitose de vesículas sinápticas.



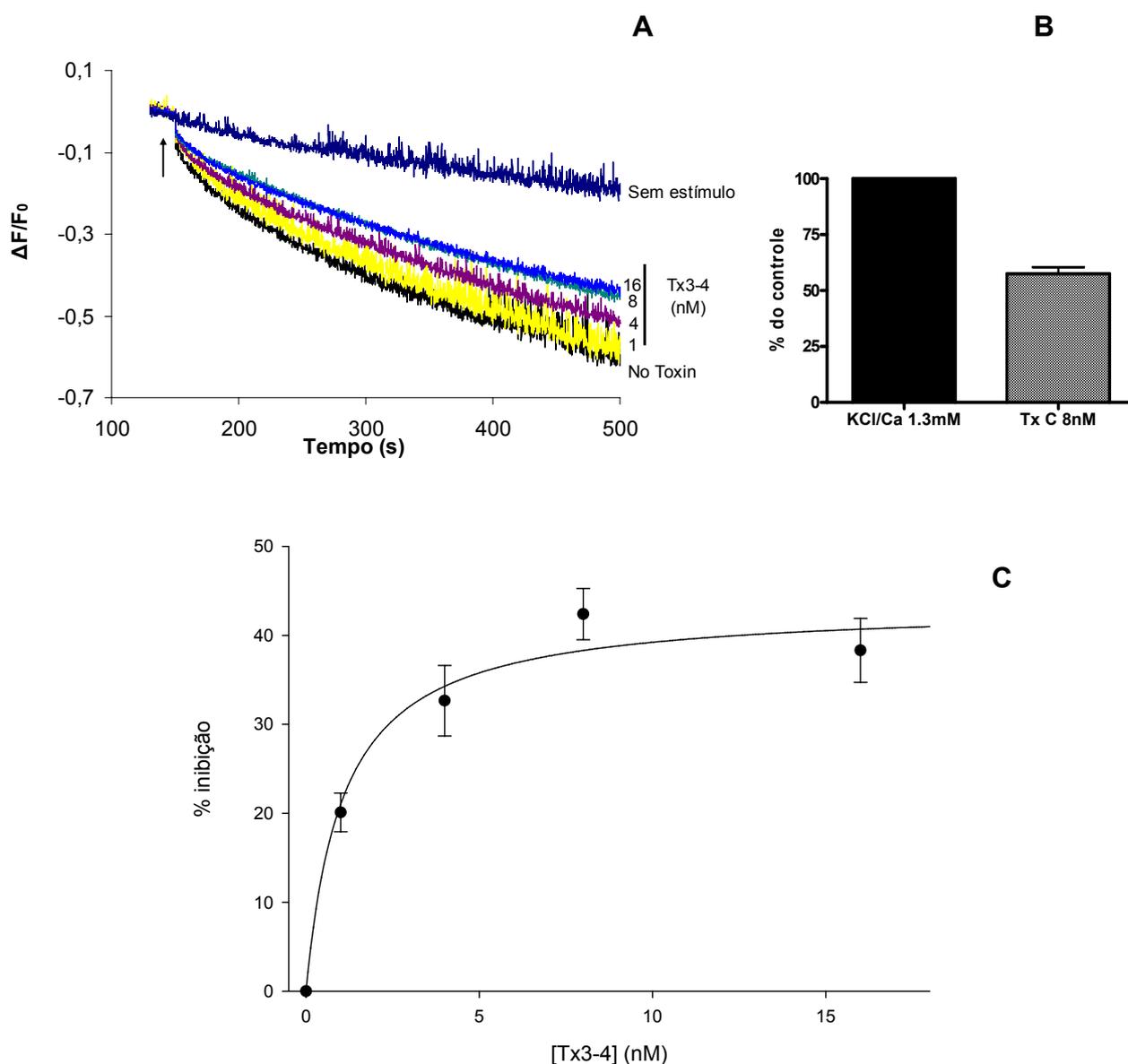
**Figura 11: Liberação de FM2-10 é cálcio-dependente:** Sinaptosomas marcados com FM2-10, foram despolarizados na presença ou na ausência de cálcio tanto no meio externo (EGTA) como no meio intra sinaptosomal (EGTA-AM) (A). Após marcação com FM2-10, a suspensão de sinaptosomas foi incubada por 5 min com Cd 100  $\mu$ M e em seguida despolarizada com KCl 30 mM. Setas indicam o momento da adição de KCl 30mM ou de meio KRH (sem estímulo) (B). Representação em barras da média de pelo menos 3 experimentos independentes mostrados em A e B. As linhas sobre as barras representam o erro padrão médio do conjunto de experimentos (C).

#### 4.5 - Efeito da toxina PhTx3-4 na exocitose

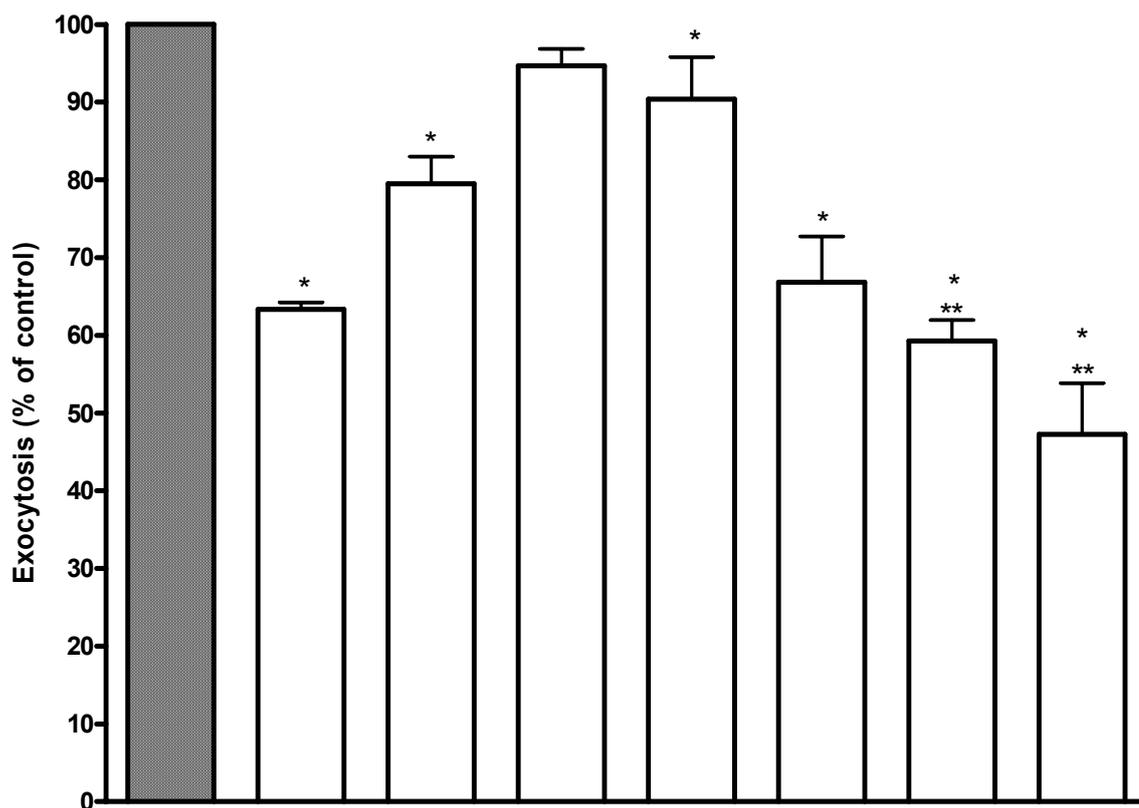
Com a finalidade de estudar o efeito da toxina PhTx3-4 na exocitose induzida por KCl, testamos concentrações de 0.1, 1, 4, 8 e 16nM da toxina incubadas 5 minutos antes do estímulo despolarizante, visando construir a curva de concentração da toxina. Em presença de 8 nM da toxina PhTx3-4, a queda de fluorescência induzida por KCl foi 37% menor (Fig. 10 – B) que o controle sem toxina. Não houve diferença no efeito inibitório da toxina entre as concentrações 8 e 16 nM ( $p > 0,05$ ) (Fig 10 – A).

Usando concentrações progressivamente menores da toxina (16, 8, 4, 1.0 e 0.1 nM), construímos a curva de concentração da toxina PhTx3-4 sobre o efeito inibitório da exocitose (Fig. 10 – C). O  $IC_{50}$  encontrado foi de 1,1nM.

Tal como foi feito para as medidas de cálcio intrasinaptosomal, comparamos o efeito da PhTx3-4 com o efeito das  $\omega$ -conotoxinas MVIIC, GVIA e AgalVA na exocitose. Os resultados são mostrados na (figura 13), PhTx3-4 (10 nM) reduziu em 37% a exocitose de vesículas sinápticas induzida por KCl, enquanto que a redução causada pela  $\omega$ -AgalVA (30 nM) e  $\omega$ -MVIIC (2,5  $\mu$ M) foram menores (21 e 22%, respectivamente,  $p < 0,05$ ). A  $\omega$ -conotoxina GVIA (1,0  $\mu$ M), bloqueadora de canais Tipo-N, causou efeito pequeno, não estatisticamente significativo na exocitose induzida por KCl ( $P > 0,05$ ). A aplicação conjunta. A aplicação conjunta de PhTx3-4 (10 nM) e AgalVA (30 nM) causou um efeito inibitório aditivo de  $53 \pm 3,9\%$  na exocitose induzida nos sinaptosomas ( $P < 0,05$ ) comparado ao efeito inibitório da PhTx3-4 sozinha. Por outro lado, a PhTx3-4 mais GVIA (1,0  $\mu$ M) causou inibição da exocitose ligeiramente maior porém não significativamente diferente ( $P > 0,05$ ) do que o efeito da PhTx3-4 sozinha.



**Figura 12: Efeito da PhTx3-4 na exocitose:** A suspensão sinaptosomal marcada com FM2-10 foi incubada com a PhTx3-4 (diferentes concentrações) 5 minutos antes da despolarização por KCl 30 mM. Concentrações diferentes de Toxina C causaram diferentes efeitos sobre a queda da fluorescência KCl-evocada e um efeito máximo já era observado quando a toxina era usada em 8 nM (**A**) (gráfico representativo de pelo menos 3 experimentos independentes para cada concentração testada). Em (**B**) representação em barra da média  $\pm$  EPM do efeito da Toxina C sobre a exocitose comparado à condições controle (sem antagonista). Em (**C**), curva dose-resposta do efeito inibitório da toxina C sobre a exocitose KCl-induzida ( $IC_{50} = 1,1$  nM), símbolos representam a média de no mínimo 3 experimetos independentes para cada concentração testada, linhas verticais denotam o EPM.



KCl 30 mM	+	+	+	+	+	+	+	+
Tx3-4 (10nM)		+				+	+	+
MVIIC (2.5µM)			+			+		
GVIA (1µM)				+			+	
AgaIVA (30nM)					+			+

**Figura 13: Efeito da PhTx3-4,  $\omega$ -Cgtx MVIIC,  $\omega$ -Cgtx GVIA e  $\omega$ -Aga IVA na exocitose induzida por KCl 30 mM.** Sinaptosomas marcados com FM2-10 tal como descrito em materiais e métodos foram despolarizados com KCl 30 mM contendo cálcio 1,3 mM. As barras representam a porcentagem de exocitose medida pelo decaimento da fluorescência causado pelo KCl sozinho ou na presença de diferentes  $\omega$ -contoxinas. Colunas denotam a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes. \* P < 0,05 comparado ao KCl; \*\* P < 0,05 comparado ao valor KCl mais PhTx3-4.

## **5 - DISCUSSÃO**

Sinaptosomas cérebro-corticais de ratos são modelos bem reconhecidos e largamente utilizados no estudo de mecanismos pré-sinápticos envolvidos no processo de liberação de neurotransmissores. Métodos que utilizam preparações sinaptosomais possuem tanto vantagens como desvantagens quando comparados à medidas eletrofisiológicas convencionais da transmissão sináptica. A exocitose em sinaptosomas não pode ser evocada por potenciais de ação, já que os terminais nervosos estão isolados de seus axônios; além do mais, a resolução temporal é de certa forma restrita. Por outro lado, o uso de sinaptosomas oferece vantagens como poder controlar melhor a intensidade da despolarização da membrana pré-sináptica e a concentração de peptídeos antagonistas além de contornar problemas de medidas de correntes sinápticas vinda de membranas pós-sinápticas (Turner and Dunlap, 1995). Com o advento dos marcadores fluorescentes FM, observa

Neste trabalho, foi investigado pela primeira vez a participação dos canais de cálcio sensíveis à PhTx3-4 no aumento interno da concentração de cálcio e na exocitose em sinaptosomas cérebro corticais. A toxina PhTx3-4 é uma potente bloqueadora das mudanças dos níveis intracelulares de cálcio e da exocitose, com valores de  $IC_{50}$  de 1,4 e 1,1 nM, respectivamente.  $\omega$ -conotoxinas, bloqueadores tradicionalmente conhecidos de canais de cálcio sensíveis à voltagem, também inibiram a exocitose, porém com concentrações maiores do que a evocada pela PhTx3-4.

O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* contém um coctel de toxinas que afetam os canais iônicos (revisado por Gomez et al., 2002) sendo que a maioria desses peptídeos são bloqueadores de canais de cálcio. Juntas, essas toxinas são eficazes na captura da presa pela aranha. A toxina PhTx3-4, também denominada por outros autores como Phonetoxin IIA (Cassola et al., 1998; Dos Santos et al., 2002; Troncone et al., 2003; Martin-Moutot et al., 2006) inibiu o influxo de  $^{45}Ca^{2+}$  em sinaptosomas cerebrais (Miranda et al., 1998), a liberação de glutamato dependente e independente de cálcio (Reis et al., 1999), bloqueou canais Tipo-N em neurônios do gânglio da raiz dorsal (Cassola et al., 1998) e em junção neuromuscular de rã (Troncone et al., 2003). Assim, Tx3-4 é uma toxina bloqueadora de canais de cálcio que inibe a liberação de neurotransmissores. Em junção neuromuscular de rã, a PhTx3-4 bloqueia a liberação induzida de neurotransmissores de uma forma reversível quando o

meio contém elevada concentração de cálcio (maior que 1,0 mM) porém quando meio contém baixa concentração de cálcio (menor que 0,5 mM), a inibição da liberação de transmissores, é irreversível. Ainda sobre junção neuromuscular, a PhTx3-4 exerce pouca ou nenhuma influência sobre a liberação espontânea de neurotransmissores (Troncone et al., 2003).

Em terminais nervosos, coexistem múltiplos tipos de canais de cálcio, os quais regulam não só a entrada de cálcio no terminal, mas também a exocitose de vesículas sinápticas. Os canais tipo N e P/Q além de suportar a transmissão sináptica, estão concentrados nos terminais nervosos. Os canais Tipo-P/Q são os de maior importância para a liberação de neurotransmissores nos terminais centrais (Takahashi and Momiyama, 1993; Guatimosim et al., 1997). Por outro lado, canais de cálcio Tipo-N são mais prevalentes em terminais nervosos periféricos e são fortemente responsáveis pela transmissão sináptica em terminais sensoriais e autonômicos (Mochida et al., 1996).

Com o intuito de determinar os tipos de canais de cálcio bloqueados pela PhTx3-4 nos terminais nervosos, nós testamos a ação de toxinas que interferem com o aumento intracelular dos níveis de cálcio induzidos por despolarização com KCl. A toxina  $\omega$ -AgaIVA (30 nM) afeta, predominantemente, canais de cálcio Tipo-P (Wheeler et al., 1994) e inibe em 24% o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  induzido por KCl em sinaptosomas cérebro-corticais (Meder et al., 1997). Nós confirmamos esses dados mostrando que a  $\omega$ -AgaIVA (30 nM) inibiu em 23% o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  induzido por KCl em sinaptosomas. Nós observamos também que a aplicação conjunta da PhTx3-4 (10 nM) com a Aga IVA (30 nM) induziu um efeito inibitório aditivo na  $[Ca^{2+}]_i$  e na exocitose nos terminais nervosos. Esses dados podem sugerir que a PhTx3-4 age em outros canais de cálcio diferentes do Tipo-P. A corrente de cálcio Tipo-Q é a principal corrente diferente da Tipo-P em células neuronais cerebelares e, junto às correntes de cálcio Tipo-P, representam quase metade do total das correntes de cálcio no sistema nervoso central (Randal & Tsien, 1995).

Ainda dependendo da concentração, a  $\omega$ -AgaIVA bloqueia não somente canais de cálcio Tipo-P mas também canais Tipo-Q (Sather et al., 1993; Randall and Tsien, 1995). O  $IC_{50}$  da  $\omega$ -AgaIVA para o bloqueio de correntes P e Q são 2,0 mM e 90 nM, respectivamente (Randal & Tsien, 1995). Assim, é

possível assumir que a inibição descrita para as respostas evocadas por KCl após o uso conjunto de  $\omega$ -AgaIVA e PhTx3-4 deve envolver também uma contribuição significativa de bloqueio em canais de cálcio Tipo-Q.

As correntes de cálcio Tipo-P (Mintz et al., 1992) e Tipo-Q são muito similares e ambas as correntes são completamente bloqueadas por concentrações saturantes da  $\omega$ -conotoxina MVIIC. A falta de efeito aditivo no bloqueio da exocitose e das mudanças na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por KCl após o uso de MVIIC e PhTx3-4 é compatível com a idéia de que a PhTx3-4 possa bloquear seletivamente canais de cálcio Tipo-Q em terminais nervosos.

As  $\omega$ -conotoxinas MVIIC e GVIA competem pelo mesmo sítio de ligação em canais de cálcio Tipo-N (McDonough et al., 2002) e a PhTx3-4 também pode afetar canais de cálcio Tipo-N. Dados obtidos de experimentos eletrofisiológicos prévios mostraram que a PhTx3-4 age em canais Tipo-N (Cassola et al., 1998; dos Santos et al., 2002; Troncone et al., 2003) além de canais Tipo-P/Q (dos Santos et al., 2002). Logo, é possível que a PhTx3-4 se ligue aos sinaptosomas em múltiplos sítios de ligação. A  $\omega$ -AgaIVA se liga a canais de cálcio nativos Tipo-P em sítios diferentes aos quais se ligam a  $\omega$ -AgaIIIA (Mintz et al., 1994) e a  $\omega$ -CgTxMVIIC (McDonough et al., 2002), sugerindo que esses canais de cálcio possuem mais de um sítio de ligação para  $\omega$ -conotoxinas. Logo, outra hipótese que não pode ser descartada é a de que a PhTx3-4 se ligue aos canais Tipo-P em um sítio diferente da  $\omega$ -AgaIVA.

Vale ressaltar que com os presentes experimentos, não é possível excluir a participação de mais de um canal de cálcio envolvido na inibição causada pela PhTx3-4 na exocitose e nas mudanças da  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por KCl nos terminais nervosos. Novos experimentos usando técnicas eletrofisiológicas serão necessários para explicar melhor o alvo de ação da PhTx3-4. É interessante notar que mesmo na presença de ambas, PhTx3-4 e  $\omega$ -conotoxinas, nem a exocitose nem a  $[Ca^{2+}]_i$  foram completamente bloqueadas, sugerindo a presença de canais de cálcio exocitóticos adicionais resistentes.

Medidas do decaimento de corantes FM's (Betz et al., 1992; Meffert et al., 1994; Guatimosim et al., 1997) fornecem uma boa indicação da liberação de transmissores em sinaptosomas. Em nosso trabalho usamos KCl despolarizante para avaliar a exocitose em sinaptosomas marcados com FM2-

10. A queda da fluorescência mostrou-se dependente da concentração de KCl. Experimentos anteriores confirmam a eficiência do KCl em induzir exocitose em terminais marcados com FM1-43 e também validam esse método como uma forma de obter medidas da secreção exocitótica em tempo real (Meffert et al., 1994). Nesse trabalho nós mostramos que o decaimento da marcação é marcadamente diminuído na ausência de um influxo de cálcio assim como na presença de  $\text{Cd}^{2+}$ , EGTA, EGTA-AM ou de bloqueadores de canais de cálcio, portanto é dependente de exocitose ativa. Por essa técnica, nós mostramos que a PhTx3-4 causa uma inibição dose-dependente da exocitose. Tanto a  $\omega$ -AgaIVA como a  $\omega$ -CgTx MVIIC inibiram também as respostas exocitóticas induzidas pela despolarização por KCl em terminais nervosos. O efeito pequeno e não significativo da  $\omega$ -CgTx GVIA sugere que os canais de cálcio Tipo-N tem pouco envolvimento com a exocitose em terminais nervosos.

Os dados obtidos para o bloqueio da exocitose com a PhTx3-4 apresentam alguma correspondência com a ação dessa toxina na liberação de glutamato. Tanto para o bloqueio da liberação de glutamato em sinaptosomas (Reis et al., 1999) como para o bloqueio da exocitose, o  $\text{IC}_{50}$  foi próximo de 1 nM. Embora a PhTx3-4 bloqueou 43% da exocitose ativa, ela bloqueou aproximadamente 75% da liberação de glutamato em sinaptosomas, tendo bloqueado não somente a liberação de glutamato dependente como também independente de cálcio (Reis et al., 1999), sugerindo que essa toxina bloqueia tanto a liberação exocitótica como não exocitótica de neurotransmissores.

Por fim, nós mostramos que a PhTx3-4 é uma nova e potente (age em concentrações nM) toxina eficaz no controle dos níveis de cálcio intracelular e da exocitose induzidos pela despolarização por KCl em sinaptosomas. PhTx3-4 pode representar uma nova ferramenta para o estudo da participação de canais de cálcio na dinâmica do cálcio intracelular bem como para o estudo da liberação de neurotransmissores do terminal nervoso.

Recentemente a PhTx3-4 vem encontrando aplicações farmacológicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Em modelos de isquemia *in vitro* a PhTx3-4 se mostrou eficaz em controlar a morte neuronal, adicionada antes como depois do insulto isquêmico (Pinheiro, dados não publicados). Em modelos *in vivo* de isquemia cerebral, a PhTx3-4, administrada intracérebro-ventricular, também

vem se mostrando eficaz no controle de alguns sintomas causados pela isquemia (dados não publicados).

Um número cada vez maior de evidências confirmam que a neurotoxicidade da Toxina PhTx3-4 é consequência da sua ação bloqueadora sobre canais de cálcio regulados por voltagem e que estão ligados à exocitose. A neurotoxicidade dessa toxina a torna, entretanto, em uma útil ferramenta farmacológica ou até mesmo em um novo protótipo para o desenvolvimento de fármacos, o que motiva ainda mais novas pesquisas sobre o mecanismo de ação preciso dessa toxina.

## **6 - CONCLUSÕES**

- A toxina PhTx3-4 bloqueia, com elevada potência ( $IC_{50} = 1,4$  nM) o aumento de cálcio interno induzido por despolarização por KCl em sinaptosomas cérebro-corticais.
- O efeito inibitório da Tx3-4 sobre o cálcio sinaptosomal é maior que o efeito das  $\omega$ -conotoxinas MVIIIC, GVIA e agatoxina IVA. Esta última mostrou efeito inibitório aditivo com a Tx3-4, sugerindo que essas duas toxinas agem em alvos diferentes.
- Tx3-4 inibe, com elevada potência ( $IC_{50} = 1,1$  nM) a exocitose induzida por KCl em sinaptosomas.
- Tx3-4 exerce bloqueio da exocitose comparativamente maior que o bloqueio da exocitose pelas  $\omega$ -conotoxinas MVIIIC, GVIA e agatoxina IVA, mostrando efeito inibitório aditivo somente com a  $\omega$ -AgaIVA.
- A PhTx3-4 é portanto uma potente bloqueadora do influxo de cálcio associado à exocitose em sinaptosomas cérebro-corticais.

## **7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aosaki T, Kasai H (1989) Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and omega-conotoxin GVIA. *Pflugers Arch* 414:150-156.
- Araujo DA, Cordeiro MN, Diniz CR, Beirao PS (1993) Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347:205-208.
- Barker LA, Dowdall MJ, Whittaker VP (1972) Choline metabolism in the cerebral cortex of guinea pigs. Stable-bound acetylcholine. *Biochem J* 130:1063-1075.
- Bean BP (1985) Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 86:1-30.
- Betz WJ, Bewick GS (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255:200-203.
- Betz WJ, Mao F, Smith CB (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:365-371.
- Borst JG, Sakmann B (1996) Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse. *Nature* 383:431-434.
- Bowersox SS, Singh T, Nadasdi L, Zukowska-Grojec Z, Valentino K, Hoffman BB (1992) Cardiovascular effects of omega-conopeptides in conscious rats: mechanisms of action. *J Cardiovasc Pharmacol* 20:756-764.
- Brose WG, Gutlove DP, Luther RR, Bowersox SS, McGuire D (1997) Use of intrathecal SNX-111, a novel, N-type, voltage-sensitive, calcium channel blocker, in the management of intractable brachial plexus avulsion pain. *Clin J Pain* 13:256-259.
- Brumback AC, Lieber JL, Angleson JK, Betz WJ (2004) Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis. *Methods* 33:287-294.
- Cassola AC, Jaffe H, Fales HM, Castro Afeche S, Magnoli F, Cipolla-Neto J (1998) omega-phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider *phoneutria nigriventer*. *Pflugers Arch* 436:545-552.
- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.

- Ceccarelli B, Hurlbut WP, Mauro A (1973) Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57:499-524.
- Chapman ER (2002) Synaptotagmin: a Ca<sup>2+</sup> sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:498-508.
- Chen YA, Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:98-106.
- Clasbrummel B, Osswald H, Illes P (1989) Inhibition of noradrenaline release by omega-conotoxin GVIA in the rat tail artery. *Br J Pharmacol* 96:101-110.
- Cochilla AJ, Angleson JK, Betz WJ (1999) Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. *Annu Rev Neurosci* 22:1-10.
- Cordeiro Mdo N, de Figueiredo SG, Valentim Ado C, Diniz CR, von Eickstedt VR, Gilroy J, Richardson M (1993) Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon* 31:35-42.
- Cousin MA, Robinson PJ (1999) Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes. *J Neurochem* 73:2227-2239.
- Dos Santos RG, Van Renterghem C, Martin-Moutot N, Mansuelle P, Cordeiro MN, Diniz CR, Mori Y, De Lima ME, Seagar M (2002) *Phoneutria nigriventer* omega-phonetoxin IIA blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with omega-conotoxin-binding sites. *J Biol Chem* 277:13856-13862.
- Dunkley PR, Jarvie PE, Heath JW, Kidd GJ, Rostas JA (1986) A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res* 372:115-129.
- Eccles J (1976) From electrical to chemical transmission in the central nervous system. *Notes Rec R Soc Lond* 30:219-230.
- Evans RM, Zamponi GW (2006) Presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels--integration centers for neuronal signaling pathways. *Trends Neurosci* 29:617-624.
- Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MA (2002) *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol* 22:579-588.
- Gomez RS, Casali TA, Romano-Silva MA, Cordeiro MN, Diniz CR, Moraes-Santos T, Prado MA, Gomez MV (1995) The effect of PhTx3 on the

- release of 3H-acetylcholine induced by tityustoxin and potassium in brain cortical slices and myenteric plexus. *Neurosci Lett* 196:131-133.
- Guatimosim C, Romano-Silva MA, Cruz JS, Beirao PS, Kalapothakis E, Moraes-Santos T, Cordeiro MN, Diniz CR, Gomez MV, Prado MA (1997) A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Br J Pharmacol* 122:591-597.
- Gundelfinger ED, Kessels MM, Qualmann B (2003) Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:127-139.
- Heuser JE, Reese TS (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57:315-344.
- Hillyard DR, Monje VD, Mintz IM, Bean BP, Nadasdi L, Ramachandran J, Miljanich G, Azimi-Zoonooz A, McIntosh JM, Cruz LJ, et al. (1992) A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 9:69-77.
- Hirning LD, Fox AP, McCleskey EW, Olivera BM, Thayer SA, Miller RJ, Tsien RW (1988) Dominant role of N-type Ca<sup>2+</sup> channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 239:57-61.
- Jahn R, Sudhof TC (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68:863-911.
- Jessell TM, Kandel ER (1993) Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* 72 Suppl:1-30.
- Kalapothakis E, Penaforte CL, Beirao PS, Romano-Silva MA, Cruz JS, Prado MA, Guimaraes PE, Gomez MV, Prado VF (1998) Cloning of cDNAs encoding neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* 36:1843-1850.
- Kushmerick C, Kalapothakis E, Beirao PS, Penaforte CL, Prado VF, Cruz JS, Diniz CR, Cordeiro MN, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado MA (1999) *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K<sup>+</sup> currents controlling Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency in GH3 cells. *J Neurochem* 72:1472-1481.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

- Lucas S (1988) Spiders in Brazil. *Toxicon* 26:759-772.
- Marks B, McMahon HT (1998) Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr Biol* 8:740-749.
- Martin-Moutot N, Haro L, Santos RG, Mori Y, Seagar M (2006) Phoneutria nigriventer omega-Phonetoxin IIA: a new tool for anti-calcium channel autoantibody assays in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurobiol Dis* 22:57-63.
- Mattiello-Sverzut AC, Fontana MD, Diniz CR, da Cruz-Hofling MA (1998) Pathological changes induced by PhTx1 from Phoneutria nigriventer spider venom in mouse skeletal muscle in vitro. *Toxicon* 36:1349-1361.
- McCleskey EW, Fox AP, Feldman DH, Cruz LJ, Olivera BM, Tsien RW, Yoshikami D (1987) Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4327-4331.
- Meder W, Fink K, Gothert M (1997) Involvement of different calcium channels in K<sup>+</sup>- and veratridine-induced increases of cytosolic calcium concentration in rat cerebral cortical synaptosomes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356:797-805.
- Meffert MK, Premack BA, Schulman H (1994) Nitric oxide stimulates Ca<sup>2+</sup>-independent synaptic vesicle release. *Neuron* 12:1235-1244.
- Miljanich GP, Ramachandran J (1995) Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:707-734.
- Mintz IM (1994) Block of Ca channels in rat central neurons by the spider toxin omega-Aga-IIIa. *J Neurosci* 14:2844-2853.
- Mintz IM, Bean BP (1993) Block of calcium channels in rat neurons by synthetic omega-Aga-IVa. *Neuropharmacology* 32:1161-1169.
- Mintz IM, Venema VJ, Adams ME, Bean BP (1991) Inhibition of N- and L-type Ca<sup>2+</sup> channels by the spider venom toxin omega-Aga-IIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6628-6631.
- Miranda DM, Romano-Silva MA, Kalapothakis E, Diniz CR, Cordeiro MN, Santos TM, Prado MA, Gomez MV (1998) Phoneutria nigriventer toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes. *Neuroreport* 9:1371-1373.

- Mochida S, Sheng ZH, Baker C, Kobayashi H, Catterall WA (1996) Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 17:781-788.
- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- Ohta S, Smith ML, Siesjö BK (1991) The effect of a dihydropyridine calcium antagonist (isradipine) on selective neuronal necrosis. *J Neurol Sci* 103:109-115.
- Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME (1994) Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. In: *Annu Rev Biochem*, pp 823-867.
- Pinheiro AC, Gomez RS, Massensini AR, Cordeiro MN, Richardson M, Romano-Silva MA, Prado MA, De Marco L, Gomez MV (2006) Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Neurochem Int* 49:543-547.
- Prado MA, Guatimosim C, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Romano-Silva MA (1996) A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem J* 314 ( Pt 1):145-150.
- Randall A, Tsien RW (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15:2995-3012.
- Reis HJ, Prado MA, Kalapothakis E, Cordeiro MN, Diniz CR, De Marco LA, Gomez MV, Romano-Silva MA (1999) Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3-4) from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem J* 343 Pt 2:413-418.
- Rezende Junior L, Cordeiro MN, Oliveira EB, Diniz CR (1991) Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* 29:1225-1233.
- Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos R, Ribeiro AM, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Brammer MJ (1993) Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca<sup>2+</sup> entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem J* 296 ( Pt 2):313-319.

- Ryan TA (2006) A pre-synaptic to-do list for coupling exocytosis to endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 18:416-421.
- Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y, Adams ME, Tsien RW (1993) Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron* 11:291-303.
- Scott RH, Dolphin AC, Bindokas VP, Adams ME (1990) Inhibition of neuronal Ca<sup>2+</sup> channel currents by the funnel web spider toxin omega-Aga-IA. *Mol Pharmacol* 38:711-718.
- Slepnev VI, De Camilli P (2000) Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 1:161-172.
- Stanley EF, Goping G (1991) Characterization of a calcium current in a vertebrate cholinergic presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 11:985-993.
- Steen PA, Newberg LA, Milde JH, Michenfelder JD (1984) Cerebral blood flow and neurologic outcome when nimodipine is given after complete cerebral ischemia in the dog. *J Cereb Blood Flow Metab* 4:82-87.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.
- Takahashi T, Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366:156-158.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831-846.
- Troncone LR, Georgiou J, Hua SY, Elrick D, Lebrun I, Magnoli F, Charlton MP (2003) Promiscuous and reversible blocker of presynaptic calcium channels in frog and crayfish neuromuscular junctions from Phoneutria nigriventer spider venom. *J Neurophysiol* 90:3529-3537.
- Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Hathaway GM, Adams ME (1992) Antagonism of synaptosomal calcium channels by subtypes of omega-agatoxins. *J Biol Chem* 267:2610-2615.
- Wheeler DB, Randall A, Tsien RW (1994) Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264:107-111.

Yawo H, Chuhma N (1993) Preferential inhibition of omega-conotoxin-sensitive presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels by adenosine autoreceptors. *Nature* 365:256-258.

Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:107-117.

Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32:1075-1088.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)