

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA**

**ESTUDO DA INTERNALIZAÇÃO DE CANAIS PARA
SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM UTILIZANDO
TITYUSTOXINA FLUORESCENTE**

Mariele Oliveira de Andrade

Belo Horizonte

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Mariele Oliveira de Andrade

**ESTUDO DA INTERNALIZAÇÃO DE CANAIS
PARA SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM
UTILIZANDO TITYUSTOXINA FLUORESCENTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, ICB - UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini

Belo Horizonte
2009

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**)
- Programa de Núcleos de Excelência (**PRONEX**)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (**FAPEMIG**)
- Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (**PRPq**)
- **Programa Institutos do Milênio 2005-2008**. Instituto do Milênio para o Desenvolvimento de Fármacos Baseados em Toxinas Peptídicas.

Ao meu pai.

Toda coincidência
Tende a que se entenda
E toda lenda
Quer chegar aqui

A ciência não se aprende
A ciência apreende
A ciência em si

Se toda estrela cadente
Cai pra fazer sentido
E todo mito
Quer ter carne aqui

A ciência não se ensina
A ciência insemina
A ciência em si

Se o que se pode ver, ouvir, pegar, medir, pesar
Do avião a jato ao jaboti
Desperta o que ainda não, não se pôde pensar
Do sono eterno ao eterno devir
Como a órbita da terra abraça o vácuo devagar
Para alcançar o que já estava aqui
Se a crença quer se materializar
Tanto quanto a experiência quer se abstrair

A ciência não avança
A ciência alcança
A ciência em si

Arnaldo Antunes

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador André Ricardo Massensini pela paciência com uma iniciante na pesquisa, pela confiança e apoio e por transmitir tranquilidade nos momentos mais difíceis da jornada.

Ao professor Marco Antônio Máximo Prado por ter permitido a realização de grande parte do trabalho em seu laboratório.

Aos professores Márcio, Tasso, Maria Carolina, Grace, Juliana e Miguel pelos conselhos e apoio.

À Doutora Vilma Regina Martins por ter gentilmente fornecido as células SN56 para a realização dos experimentos.

Aos colegas e professores do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular (INCT-MM) Laboratório de Neurociência -Faculdade de Medicina- pela acolhida durante a fase final dos meus experimentos.

À Fabi, por ter guiado meus passos no laboratório de Neurofarmacologia com muito carinho e paciência.

À Lú, grande amiga e companheira de longa data e de todos os momentos.

À Gioconda, cuja amizade foi um grande e inesperado presente.

Às eternas amigas Dani, Maira e Su, pelos risos, choros, desabafos e conselhos.

À Pat e Maura, exemplos de dedicação e competência.

Aos amigos do NNC: Daniel, Flávio, Hércules e Fumega, pra quem sempre me senti à vontade para pedir ajuda e conselhos. Ao Dan também sou grata pelas controvérsias, longas conversas e intermináveis debates a respeito da vida.

À minha irmã Marina cuja presença mais próxima me faz mais feliz.

Á minha irmã Mariana, cuja distância nos aproximou ainda mais, nos tornando grandes amigas.

Á minha mãe Icleia, a quem sou eternamente grata por seu amor e por seu esforço sem medidas para me proporcionar sempre o melhor.

À vida, que me torna ávida de querer ir longe, para ficar mais perto.

SUMÁRIO

APOIO FINANCEIRO	III
AGRADECIMENTOS.....	VI
SUMÁRIO	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CANAIS PARA SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM	3
1.2 TITYUSTOXINA.....	7
1.3 INTERAÇÃO ENTRE CSDVs E NEUROTOXINAS.....	8
1.3.1 <i>Interação entre CSDVs e Tityustoxina</i>	10
1.4 A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 TITYUSTOXINA.....	16
3.2 MARCAÇÃO DA TOXINA	16
3.3 CULTURA DE CÉLULAS	17
3.4 ESPECIFICIDADE DA LIGAÇÃO DA TsTX-AF ₄₈₈ AOS CSDVs	18
3.5 INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF ₄₈₈ EM CÉLULAS SN56	18
3.6 ATIVIDADE DA TsTX E A INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF ₄₈₈	19
3.7 DEPENDÊNCIA DO Ca ²⁺ NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF ₄₈₈	19
3.8 INFLUXO DE SÓDIO ATRAVÉS DOS CSDVs E A INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF ₄₈₈	19
3.9 ATIVIDADE DA MEMBRANA E A INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF ₄₈₈	20
3.10 AQUISIÇÃO DE IMAGENS	20
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
4 RESULTADOS	22
4.1 ESPECIFICIDADE DA LIGAÇÃO DA TsTX-AF ₄₈₈ AOS CSDVs	23
4.2 INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF ₄₈₈	26
4.3 DEPENDÊNCIA DA TEMPERATURA DO MEIO NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF ₄₈₈	30
4.4 DEPENDÊNCIA DA ATIVIDADE DA TsTX PARA A INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF ₄₈₈	30
4.5 DEPENDÊNCIA DO Ca ²⁺ NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF ₄₈₈	34
4.6 DEPENDÊNCIA DO INFLUXO DE SÓDIO NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF ₄₈₈	36
4.7 DEPENDÊNCIA DA ATIVIDADE DA MEMBRANA NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF ₄₈₈	39
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	48
7 BIBLIOGRAFIA	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUTURA DOS CSDVs.....	5
FIGURA 2: SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE NEUROTOXINAS EM CSDVs DE MAMÍFEROS.....	10
FIGURA 3: COMPETIÇÃO ENTRE TSTX E TSTX-AF ₄₈₈	24
FIGURA 4: COMPETIÇÃO ENTRE BSA E TSTXAF ₄₈₈	25
FIGURA 5: INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TSTX-AF ₄₈₈ EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO.	28
FIGURA 6: AUTOFLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS SN56.	29
FIGURA 7: INIBIÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TSTX-AF ₄₈₈ COM A DIMINUIÇÃO DA TEMPERATURA.....	32
FIGURA 8: INIBIÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TSTX-AF ₄₈₈ COM A DENATURAÇÃO DA TOXINA.....	33
FIGURA 9: PARTICIPAÇÃO DO CÁLCIO EXTRACELULAR NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TSTX-AF ₄₈₈	35
FIGURA 10: PARTICIPAÇÃO DO INFLUXO DE ÍONS SÓDIO NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TSTX-AF ₄₈₈	37
FIGURA 11: INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TSTXAF ₄₈₈ COM A SUBSTITUIÇÃO DO SÓDIO POR COLINA.	38
FIGURA 12: PARTICIPAÇÃO CONCOMITANTE DO INFLUXO DE SÓDIO E DO CÁLCIO EXTRACELULAR NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TSTXAF ₄₈₈	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AF ₄₈₈	Alexa fluor™ ₄₈₈
BSA	Soro albumina bovina (bovine serum albumin)
CSDVs	Canais para sódio dependentes de voltagem
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
EGTA	Ácido etileno glicol-bis (βaminoetil éter) N,N,N',N'- tetracético
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IFM	Interleucina, fenilalanina, metionina
KRH	Krebs ringer hepes
Nav	Isoforma do canal de sódio
PM	Peso molecular
S	Segmento
TiTX - γ	Toxina gama
TsTX	Tityustoxina
TTX	Tetrodotoxina
[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de cálcio
[Na ⁺] _i	Concentração intracelular de sódio

RESUMO

Os canais para sódio dependentes de voltagem (CSDVs) exercem papel fundamental na geração e propagação do potencial de ação em células excitáveis e também são importantes para modulação sináptica. O estudo da internalização dos CSDVs pode auxiliar a compreensão dos mecanismos de regulação da expressão e atividade destes canais. O presente estudo investigou a internalização dos CSDVs em células SN56, utilizando como ferramenta a tityustoxina (TsTX) marcada com Alexa Fluor 488 (AF₄₈₈), uma sonda fluorescente. A ação específica desta toxina em CSDVs permite sua utilização como marcador e agente despolarizante. A marcação intracelular observada revelou a internalização dos CSDVs pela ligação da TsTX-AF₄₈₈ em células SN56. A marcação intracelular foi detectada após 5 minutos de incubação e não houve diferença significativa nos tempos subsequentes até o período de 60 minutos de incubação com a toxina marcada. Foi possível detectar diminuição significativa da marcação intracelular quando as células foram incubadas com TsTX-AF488 à 4C, quando a toxina foi desnaturada e finalmente quando a incubação da TsTX- AF488 ocorreu com adição de TTX (tetrodotoxina) na ausência de cálcio. Os resultados mostram a internalização da TsTX-AF488, sugerindo a internalização dos CSDVs. Este processo parece depender do metabolismo celular, do estado de ativação do canal e do cálcio extracelular.

ABSTRACT

Voltage-dependent sodium channels (VDSC) play an essential role in the generation and propagation of action potential in excitable cells. They are also important in the synaptic modulation. The study of VDSC internalization may help the comprehension of the mechanisms that regulate the expression and activity of these channels. The present study investigated the internalization of VDSC in SN56 cells using tityustoxin labeled with Alexa Fluor 488 (TsTX-AF₄₈₈) as a tool. The specific action of this toxin in VDSC allows its use as a marker and depolarizing agent. The intracellular staining observed has revealed the internalization of VDSC bound to TsTX-AF₄₈₈ in SN56 cells. The intracellular staining was detected after five minutes of incubation and there was no relevant difference in the subsequent time gaps until sixty minutes. It was possible to detect significant decrease in the intracellular staining when the cells were incubated with TsTX- AF₄₈₈ at 4°C; when the toxin was denaturated and finally when the incubation of TsTX- AF₄₈₈ happened with the addition of TTX (tetrodotoxin) in the absence of calcium. The results demonstrate the internalization of TsTX- AF₄₈₈, suggesting the internalization of CSDVs. This process seems to depend on the cellular metabolism, the state of channel activation, and extracellular calcium.

1 INTRODUÇÃO

O estudo da distribuição dos canais para sódio dependentes de voltagem (CSDVs) em células vivas é relevante para a compreensão da excitabilidade celular. A microscopia confocal é capaz de determinar a distribuição deste tipo de canais em membranas inteiras e em organelas citoplasmáticas de amostras vivas. A tityustoxina (TsTX) se liga especificamente aos CSDVs, se tornando uma ferramenta importante no estudo destes canais. Por prolongar o período de atividade do canal, seu efeito despolarizante possibilita sua utilização como marcador dos canais através da conjugação com uma sonda fluorescente. O emprego de toxinas como ferramentas para o estudo dos CSDVs tem sido descrito em estudos anteriores (Dargent and Couraud 1990; Dargent, Jullien et al. 1995; Paillart, Boudier et al. 1996). Além disso, as técnicas existentes que podem ser utilizadas para o estudo da localização dos CSDVs apresentam limitações para tal finalidade. A técnica de imunofluorescência, assim como a autoradiografia associada à microscopia eletrônica não permitem o estudo em tempo real da distribuição dos CSDVs por exigir fixação da amostra. A utilização da “green fluorescent protein” não permite a avaliação de canais próprios da célula, uma vez que é necessária a transfecção do canal conjugado à proteína fluorescente. A técnica de “patch clamp” permite o monitoramento da atividade do canal em determinadas regiões da membrana plasmática, mas não possibilita o seu monitoramento em toda extensão da membrana integralmente. A utilização da TsTX permite o estudo não invasivo e em tempo real da distribuição dos canais para sódio, constituindo uma dupla ferramenta: marcador e agente celular despolarizante. Portanto, o conhecimento da interação da TsTX com os CSDVs, através da microscopia confocal, apresenta grande relevância no estudo funcional da localização destes canais em células excitáveis.

1.1 CANAIS PARA SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM

A excitabilidade celular e a propagação do impulso elétrico dependem da regulação da expressão e da função dos canais iônicos dependentes de voltagem na membrana celular (Armstrong and Hille 1998).

Os canais para sódio dependentes de voltagem (CSDVs) são responsáveis pela geração e propagação dos potenciais de ação. Eles se abrem e se fecham rapidamente em resposta a mudança no potencial de membrana. Através da técnica de “voltage-clamp”, Hodgkin e Huxley demonstraram, pela primeira vez, as três chaves que posteriormente caracterizaram os canais para sódio: ativação sensível à voltagem, rápida inativação e condutância iônica seletiva (Hodgkin and Huxley 1952).

Os canais para sódio foram os primeiros canais dependentes de voltagem a serem clonados e seqüenciados. O primeiro estudo a respeito, mostrou que RNAm transcrito a partir de cDNA clonado direciona a formação de CSDVs funcionais em oócitos de *Xenopus* (Noda, Ikeda et al. 1986). Nove genes que codificam as subunidades alfa já foram funcionalmente expressos. Suas isoformas apresentam aproximadamente 75% de aminoácidos homólogos e podem ser diferenciadas pelos diferentes padrões de desenvolvimento, de localização nos sistemas nervoso, esquelético e cardíaco e também por sua sensibilidade à tetrodotoxina (Gellens, George et al. 1992). As isoformas predominantes no SNC são Na_v 1.1, 1.2, 1.3 e 1.6. A expressão da isoforma Na_v 1.1 começa a aumentar após o nascimento e atinge níveis mais altos no colículo e ponte do cérebro adulto. Já a isoforma Na_v 1.2 é expressa durante o desenvolvimento intra-uterino humano, com níveis mais altos no córtex, hipocampo e mesencéfalo. A isoforma Na_v 1.3 atinge expressão máxima próxima ao nascimento, com decréscimo ao longo da vida adulta. Por último, a expressão da isoforma Na_v 1.6 não se difere de forma significativa nas estruturas cerebrais (Whitaker,

Faull et al. 2001). A sua distribuição é variável não somente ao nível celular, mas também subcelular. A isoforma Na_v 1.2 tem localização predominantemente axonal, indicando sua participação na propagação do potencial de ação. Ao contrário, as isoformas Na_v 1.1, 1.3 e 1.6 se distribuem ao longo dos corpos e dendritos, indicando sua participação na integração sináptica (Whitaker, Faull et al. 2001). As isoformas expressas no SNC são inibidas por concentrações nanomolares de tetrodotoxina (TTX). Além disso, a isoforma Na_v 1.1 está presente tanto em neurônios quanto em células da glia (Vacher, Mohapatra et al. 2008). A isoforma Na_x apresenta estrutura diferenciada, incluindo menores quantidades de carga nos segmentos sensores de voltagem e ausência da seqüência curta de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos: isoleucina, fenilalanina e metionina (IFM), essencial para a inativação rápida do canal (Goldin 2001).

Os CSDVs são estruturas glicoprotéicas transmembrânicas com regiões definidas para o poro e para os sensores de voltagem (Figura 1). A forma do canal para sódio mais importante no cérebro de ratos é um complexo heterotrimérico com uma subunidade α (260 kDa), uma subunidade β_1 ligada de forma não covalente (36 kDa) e uma subunidade β_2 ligada por pontes dissulfídicas (33 kDa) (Catterall 1984; Catterall 1992; Catterall 2000). A subunidade principal α , formadora do poro, é composta por quatro domínios homólogos (I-IV), cada um contendo seis segmentos transmembrânicos (S1-S6) com uma alça interna que conecta os segmentos 5 e 6 (Catterall 1992; Marban, Yamagishi et al. 1998). A subunidade contém todos os elementos estruturais necessários para formar o poro através da membrana e garantir a seletividade iônica (Noda, 1986). As subunidades β auxiliares são responsáveis pela modulação do canal e também por suas propriedades cinéticas (Isom, De Jongh et al. 1992; Isom, Ragsdale et al. 1995; Isom, Scheuer et al. 1995). O segmento 4 de cada domínio apresenta resíduos de aminoácidos carregados positivamente e exerce papel chave na ativação do canal.

Os segmentos 5 e 6, juntamente com a alça interna entre eles, formam a cobertura do poro e a alça curta entre os domínios III e IV forma a comporta de inativação, em particular a seqüência IFM. A inativação do canal ocorre em um ou dois milissegundos após sua abertura, com bloqueio da porção interna do poro. Os domínios intracelulares maiores são alvos de modulação do canal pela sua fosforilação (Catterall 2000; Yu and Catterall 2003).

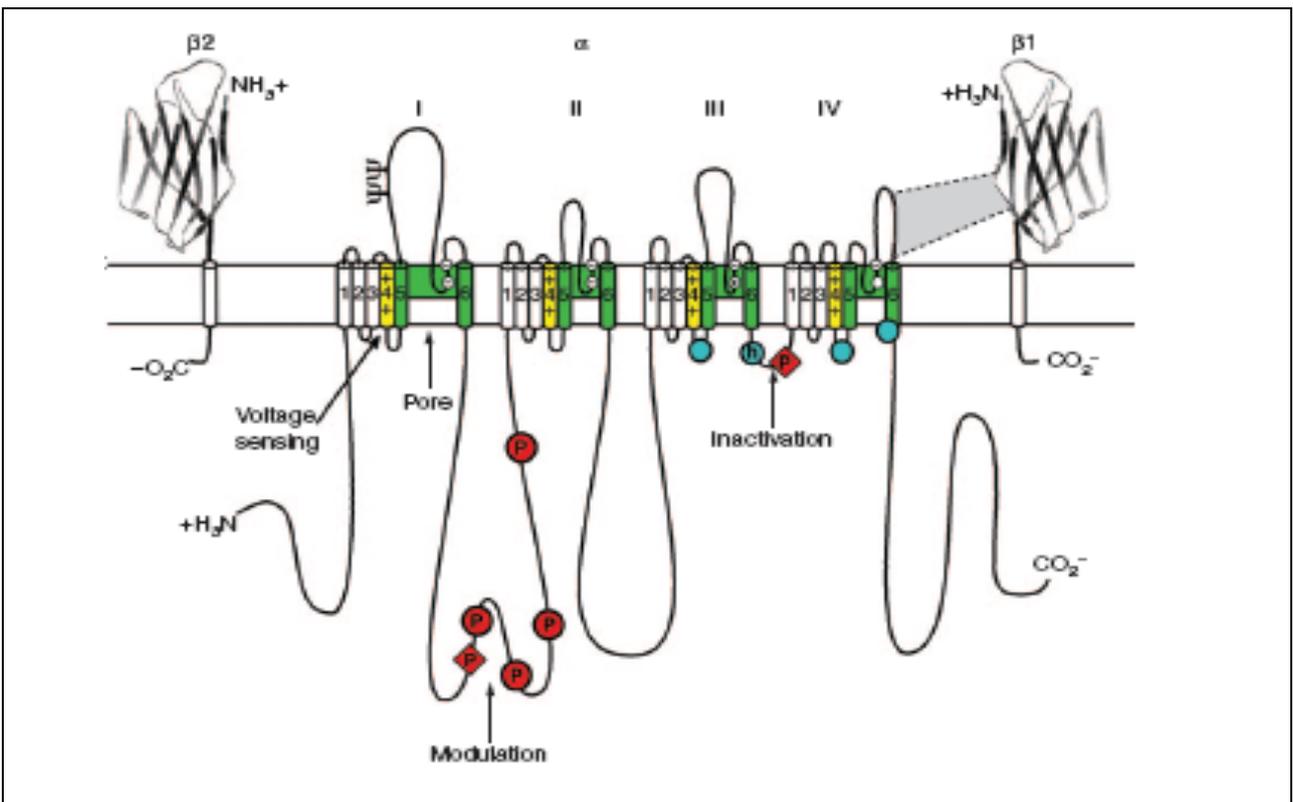


Figura 1: Estrutura dos CSDVs.

Esquema da estrutura dos CSDVs. As subunidades α apresentam quatro domínios repetidos (I a IV). Cada domínio consiste de 6 segmentos transmembrânicos. Os segmentos 5 e 6 delimitam o poro do canal, enquanto o segmento 4 é o sensor de voltagem. Os círculos nas alças intracelulares dos domínios III e IV indicam o segmento IFM da comporta de inativação (h-comporta de inativação) e P os sítios de fosforilação do canal (Yu and Catterall 2003).

A distribuição diferenciada dos CSDVs é essencial para as propriedades funcionais de um neurônio. Considerando que uma das principais funções dos CSDVs é gerar potenciais de ação na porção inicial do axônio, verifica-se maior densidade desses canais nesse segmento neuronal (Garrido, Fernandes et al. 2003). Essas observações têm dirigido pesquisas para a distribuição destes canais e para a modulação da excitabilidade dos neurônios pelos mesmos.

Enquanto a relação entre estrutura e função dos CSDVs está bem estabelecida, a sua importância na modulação da transmissão sináptica ainda não foi esclarecida. Os CSDVs não só participam da despolarização, mas também estão envolvidos na atividade elétrica neuronal sublimiar; através de correntes de Na^+ persistentes (Raman, Sprunger et al. 1997), o que aponta para uma nova perspectiva na qual os CSDVs podem integrar disparos neuronais. Trabalhos desenvolvidos em nosso grupo sugerem que os CSDVs possuem papel importante nesta modulação. Estudos demonstraram efeitos diferenciados na $[\text{Na}^+]_i$, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e na liberação de glutamato, provocados por toxinas que atuam em CSDVs, em sinaptosomas de córtex cerebral de ratos (Romano-Silva, Ribeiro-Santos et al. 1994; Massensini, Moraes-Santos et al. 1998).

Distúrbios na atividade dos CSDVs são responsáveis pela geração de inúmeras patologias. Doenças musculares podem ser provocadas por mutações em isoformas $\text{Na}_v1.4$; enquanto mutações nos canais $\text{Na}_v1.5$ são responsáveis pela síndrome do complexo QT longo, uma anormalidade cardíaca. Isoformas $\text{Na}_v1.3$, 1.7, 1.8 e 1.9 estão envolvidas na sinalização da dor (Krafte and Bannon 2008), enquanto as isoformas $\text{Na}_v1.1$ estão associadas à epilepsia (Ito, Nagafuji et al. 2002).

1.2 TITYUSTOXINA

Com o objetivo geral de aumentar sua chance de sobrevivência, milhares de espécies vivas produzem toxinas que são usadas para modificar a fisiologia de outras espécies. Toxinas podem apresentar grande complexidade química ou serem apenas moléculas simples. Algumas são inespecíficas, mas muitas são particulares para moléculas selecionadas. Sendo produtos de uma longa coevolução das espécies produtoras de toxinas com as espécies alvo, as toxinas têm sido freqüentemente moldadas em torno destas, o que nos fornece uma importante ferramenta no estudo de características fisiológicas das espécies alvo (Schiavo, Matteoli et al. 2000).

Diante disso, não é surpresa que a maioria das toxinas conhecidas seja seletiva para moléculas do tecido nervoso. Essas neurotoxinas têm exercido um papel chave na neurofisiologia ainda desconhecida.

Venenos escorpiônicos consistem em uma mistura complexa de proteínas neurotóxicas acídicas e básicas, farmacologicamente ativas, somada a outros componentes que incluem sais e compostos orgânicos. Apesar disso, estudos com venenos de diferentes espécies têm demonstrado algumas propriedades em comum, principalmente a presença de componentes tóxicos ao homem. Essas toxinas são principalmente proteínas básicas, de baixo peso molecular, formadas por 60-70 resíduos de aminoácidos, com pontos isoelétricos na faixa de 8,0 a 9,0. Devido ao alto número de grupos ionizáveis, estas toxinas são capazes de formar associações moleculares com outras proteínas (Sampaio, Laure et al. 1983; Barhanin, Pauron et al. 1984).

O veneno do escorpião *Tityus serrulatus* é composto por uma mistura de peptídeos tóxicos e não tóxicos, além de serotonina, nucleotídeos, aminoácidos, enzimas líticas (hialuronidase) e lipídios. Algumas de suas toxinas têm sido isoladas e

caracterizadas. Originalmente o veneno foi dividido em duas frações, através de cromatografia em gel de filtração (Gomez and Diniz 1966); uma delas, a tityustoxina, foi parcialmente caracterizada. Estudos subseqüentes levaram à modificação do método proposto e as frações obtidas passaram a ser purificadas por cromatografia de troca iônica (Toledo and Neves 1976; Sampaio, Laure et al. 1983).

As toxinas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* podem ser classificadas em dois tipos, α e β , de acordo com sua ligação específica a sítios determinados dos canais para sódio dependentes de voltagem (Barhanin, Giglio et al. 1982; Kirsch, Skattebol et al. 1989)

As frações tóxicas das toxinas do tipo α podem interagir com diferentes canais iônicos: canais para sódio (Catterall, Morrow et al. 1979) canais para potássio (Carbone, Wanke et al. 1982) canais para cloreto (DeBin, Maggio et al. 1993) e canais para cálcio (Valdivia, Kirby et al. 1992).

A tityustoxina, também chamada por alguns autores de T₂III, corresponde ao terceiro pico da recromatografia do segundo pico tóxico (T₂) do veneno bruto, obtido em coluna de troca iônica. Ela é uma proteína, parcialmente seqüenciada, composta de 63 aminoácidos e peso molecular (PM) igual a 7216 (Sampaio, Laure et al. 1983).

1.3 INTERAÇÃO ENTRE CSDVs E NEUROTOXINAS

Neurotoxinas que atuam em canais para sódio têm sido amplamente utilizadas como ferramentas no estudo de mecanismos sinápticos sob condições fisiopatológicas. Elas modificam a atividade do canal e pelo menos seis sítios de ligação das toxinas foram identificados (Figura 2).

Tetrodotoxina, a guanidina heterocíclica solúvel em água, age no lado extracelular dos CSDVs, bloqueando a condutância ao sódio (Narahashi 2008). Veratridina é um alcalóide extraído de plantas liliáceas, que se liga ao sítio 2 dos canais e causa ativação persistente, em potencial de repouso, via um mecanismo alostérico que bloqueia a inativação e muda a dependência da voltagem da ativação para potenciais mais negativos (Catterall 1980). Toxinas de anêmonas do mar, algumas toxinas de aranha, além de toxinas de escorpião como a TsTX, são exemplo de toxinas que se ligam ao sítio 3, inibindo ou retardando sua a inativação (Couraud, Rochat et al. 1978; Couraud, Jover et al. 1982; Pauron, Barhanin et al. 1985; Lazdunski, Frelin et al. 1986). Outra toxina purificada do veneno do *Tityus serrulatus*, Tityus gama (TiTX - γ) é um exemplo de toxina que se liga ao sítio 4 dos canais mudando a dependência de voltagem destes para potenciais mais negativos e reduzindo a corrente de pico (Vijverberg, Pauron et al. 1984). As brevetoxinas e as ciguatoxinas, solúveis em lipídios, ligam-se ao sítio 5 e provocam mudança na ativação dos canais para potenciais de membrana mais negativos e bloqueio de sua inativação (Lombet, Bidard et al. 1987). Conotoxinas levaram à identificação do sítio 6. Elas causam prolongamento dos potenciais de ação devido à inibição específica da inativação dos canais (Hasson, Fainzilber et al. 1993).

O sítio 1 dos canais para sódio no cérebro está localizado no segmento SS2 do lado N-terminal do sexto segmento transmembrânico em cada um de seus quatro domínios. O sítio 2 dos canais é formado pelos domínios transmembrânicos hidrofóbicos IS6 e IVS6 da subunidade alfa. O sítio 3 está localizado nas alças extracelulares entre os segmentos transmembrânicos 5 e 6 nos domínios I e IV do canal e o sítio 4 compreende resíduos de aminoácidos na alça S3-S4, no final extracelular do sensor de voltagem S4, no domínio IV da subunidade α (Cestele and Catterall 2000).

nervoso, em fatias e sinaptosomas de córtex cerebral (Henriques and Gomez 1981), sendo capaz também de induzir a fosforilação de proteínas (Ribeiro and Gomez 1986). Moss e cols., em 1974 e Silveira e cols., em 1991 mostraram que a liberação de catecolaminas induzidas pela toxina de escorpião ocorre por um mecanismo similar ao produzido pelo estímulo elétrico (Moss, Thoa et al. 1974; Silveira, Moraes-Santos et al. 1991). Os efeitos da TsTX são dependentes do tempo de incubação, do pH e da fonte de energia no meio de incubação (Gomez, Dai et al. 1973). Utilizando a microscopia fluorescente para visualização dos CSDVs em células vivas, pesquisadores atualmente vêm aplicando a TsTX marcada com sondas fluorescentes para estudá-la em modelos de células em cultura (Massensini, Suckling et al. 2002).

1.4 A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs

Ao contrário do amplo conhecimento sobre a eletrofisiologia dos CSDVs, a internalização e o tráfego desses canais ainda é um assunto ainda pouco compreendido.

A complexidade morfológica e funcional dos neurônios, com ramificações dendríticas e axonais, além de múltiplas conexões, é responsável pelas diferenças na localização e densidade dos canais iônicos e proteínas em geral (Nusser 2009). Para compreender melhor a função dos diferentes tipos neuronais é necessário determinar a localização desses canais, bem como de suas isoformas, tanto na membrana celular quanto nos espaços subcelulares. A localização dos CSDVs na membrana celular de neurônios foi investigada, utilizando toxina escorpiônica marcada com iodo radioativo (Catterall 1981).

Os efeitos de ativadores de CSDVs (batracotoxina, toxina escorpiônica α e veratridina) na densidade destes em cérebro de ratos neonatos, *in vitro*, foram descritos (Dargent and Couraud 1990). O estudo sugere que um aumento na concentração

intracelular de sódio, provocado pelos ativadores pode induzir uma diminuição da densidade de canais na superfície celular. A participação de um compartimento endosomal ou lisosomal após a internalização dos canais também é possível. O estudo sugere que os canais não retornam à membrana após a retirada de um ativador. Além disso, a internalização foi inibida por uma base acidotrópica fraca, que bloqueia a degradação protéica em lisosomos (Dargent, Jullien et al. 1995). Através de microscopia eletrônica foi demonstrada a distribuição de uma toxina marcada, com afinidade pelos CSDVs, nos diferentes compartimentos subcelulares (Paillart, Boudier et al. 1996). Outro estudo mostrou que a ativação da PKA causa redistribuição de CSDVs cardíacos em células vivas, apoiando a existência de múltiplos locais de estocagem dos canais que podem ser mobilizados após estímulos fisiológicos (Hallaq, Yang et al. 2006).

Portanto, o controle da densidade de CSDVs na superfície celular representa um potencial mecanismo para a regulação da excitabilidade neuronal, apontando para a necessidade de se investigar a internalização de tais canais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a internalização de canais para sódio dependentes de voltagem em células SN56 usando tityustoxina fluorescente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Investigar se a interação da TsTX-AF₄₈₈ com os CSDVs ocorre através de ligação específica ao seu sítio nestes canais.

-Investigar a internalização dos CSDVs ligados à TsTX-AF₄₈₈ em diferentes períodos de incubação.

-Investigar se a internalização dos CSDVs ligados à TsTX-AF₄₈₈ é dependente de parâmetros fisiológicos necessários aos processos endocíticos como temperatura, cálcio extracelular e especificidade da proteína ligante.

-Investigar se a internalização dos CSDVs ligados à TsTX-AF₄₈₈ depende do influxo de íons sódio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TITYUSTOXINA

A neurotoxina utilizada neste estudo, a TsTX, foi obtida a partir do veneno bruto do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*, de acordo com metodologia descrita por Sampaio et al.(1983). A toxina foi fornecida pelo Prof. Dr. Tasso Moraes-Santos, da Faculdade de Farmácia da UFMG.

A toxina foi repassada na forma liofilizada, sendo diluída em salina para posterior utilização. Sua concentração foi determinada através da espectrofotometria, com absorbância medida em 280nm, em duplicatas, para diluições de 1/50 e 1/100. A constante de conversão utilizada foi 0,48 sendo obtida pelo método de dosagem de proteínas descrito por Lowry, em 1951. (Lowry, Rosebrough et al. 1951) A toxina foi separada em alíquotas de 5 µl e mantida congelada a -20°C até a data dos experimentos.

3.2 MARCAÇÃO DA TOXINA

Toxinas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* foram purificadas como descrito previamente (Sampaio et al., 1983). O indicador Alexa Flúor₄₈₈ (AF₄₈₈) reage com as amins primárias das proteínas de acordo com o manual do fabricante ("Molecular Probes, Alexa Flúor Protein Labelling Kit Manual", catálogo nº A-10235). Em resumo, 500 µl de uma solução com 3,5 mg/ml de proteína pura (TsTX) foram adicionados a 50 µl de uma solução de bicarbonato de sódio a 1,0 M. Esta solução foi transferida para um frasco contendo quantidade suficiente de indicador para reagir com a proteína e deixado sob leve agitação por 1 hora à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para a remoção do indicador livre, as proteínas marcadas foram purificadas usando

uma membrana para exclusão de moléculas com massa molecular menor que 5000 D, em tampão fosfato pH 7,2 por 24 horas, a 4°C e ao abrigo da luz.

O conjugado de proteína purificado, TsTX-AF₄₈₈, é estável por vários meses à -20°C. Portanto, as soluções foram divididas em alíquotas de 5 µl e armazenadas no freezer à -20°C, protegidas da luz direta. A funcionalidade do conjugado foi avaliada através da liberação de glutamato em sinaptosomas de córtex cerebral de ratos, conforme descrito em trabalhos anteriores (Nicholls, Sihra et al. 1987; Romano-Silva, Ribeiro-Santos et al. 1994).

3.3 CULTURA DE CÉLULAS

Células SN56 foram gentilmente cedidas pelo professor Bruce Wainer, do Departamento de Patologia da Escola de Medicina da Universidade de Emory, Atlanta, GA, EUA. As células foram cultivadas em garrafas de 50 ml com 10 ml meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (“Gibco Life Technologies”), 2 mM de L-glutamina, 1% de estreptomicina e penicilina e o pH foi corrigido para 7,4. Também foram mantidas em estufa sob atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C. Para diferenciação, as células foram plaqueadas em lamínulas e mantidas no mesmo meio, porém sem soro fetal bovino e acrescidas de 1mM de dibutilil AMP-c (Sigma) por no mínimo 48 h. O meio das células foi trocado a cada 48 h, exceto durante a diferenciação, quando a troca de meio foi feita a cada 24 h. Durante a incubação, as placas foram mantidas em KRH (12 mM de NaCl mM, 4 mM de KCl ,1,2 mM de MgSO₄ , 25 mM de HEPES ,10 mM de C₆H₁₂O₆ e 1 mM de CaCl₂) e em estufa, sob atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂ , a 37°C. A exceção se aplica aos experimentos de avaliação da dependência da temperatura, onde as células foram incubadas a 4°C. Após incubação, as células foram lavadas 3x, rapidamente, com o mesmo meio. Cada experimento foi

realizado pelo menos três vezes, em dias diferentes, e os parâmetros de aquisição de imagem foram os mesmos em todos os experimentos.

3.4 ESPECIFICIDADE DA LIGAÇÃO DA TsTX-AF₄₈₈ AOS CSDVs

As células foram plaqueadas e diferenciadas como citado anteriormente e incubadas em KRH, com 10 μ M de TsTX não marcada por 5 min., a 37°C. Após este período, as mesmas células foram incubadas em KRH com 1 μ M de TsTX-AF₄₈₈ por mais 55 min. As células foram lavadas com o mesmo meio e suas imagens capturadas por microscopia confocal.

Para verificação de ligações inespecíficas da TsTX-AF₄₈₈ à membrana das células, outro ensaio foi realizado incubando-as primeiramente com 10 μ M de albumina bovina (Sigma) durante 5 min. a 37°C, e em seguida com 1 μ M de TsTX-AF₄₈₈ por mais 55 min. a 37°C.

3.5 INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF₄₈₈ EM CÉLULAS SN56

Após diferenciação, as células foram incubadas com 1 μ M de TsTX-AF₄₈₈ em KRH por intervalos de tempo crescentes, a 37°C. Ou seja, cada placa foi incubada por 5, 15, 30 e 60 min. Após o período de incubação as células foram lavadas com KRH e suas imagens capturadas por microscopia confocal.

A autofluorescência das células foi avaliada através de sua incubação apenas com KRH por 60 min., a 37°C. Os parâmetros para obtenção dessas imagens foram idênticos aos parâmetros utilizados para as demais aquisições.

Para verificação da dependência da temperatura na internalização dos CSDVs, as células também foram incubadas com 1 μ M de TsTX-AF₄₈₈, a 4°C, por 60 min., seguindo

o plaqueamento e a diferenciação descritos. Após incubação, as células foram lavadas com KRH, também a 4°, e suas imagens capturadas no microscópio confocal.

3.6 ATIVIDADE DA TsTX E A INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF₄₈₈

Outro experimento foi realizado com a finalidade de se avaliar a dependência de atividade da toxina para sua ligação aos CSDVs e conseqüente internalização dos mesmos. Para tal, procedeu-se a desnaturação da TsTX-AF₄₈₈ utilizando um agente desnaturante, β-mercaptoetanol (5%), adicionado a um eppendorf contendo 1 μM de TsTX-AF₄₈₈. A mistura foi exposta a uma temperatura aproximada de 100°C por 3 minutos e após resfriamento à temperatura de 37°C, seu conteúdo foi adicionado às células que ficaram incubadas por 60 min., a 37°C. Logo após, suas imagens foram capturadas no microscópio confocal.

3.7 DEPENDÊNCIA DO Ca²⁺ NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF₄₈₈

A dependência do cálcio extracelular na internalização dos CSDVs foi avaliada através da utilização de KRH sem cálcio adicionado de 2 mM de EGTA. As células foram incubadas neste meio com TsTX-AF₄₈₈ 1 μM durante 60 min., a 37°C. Após o período de incubação as células foram lavadas com KRH e suas imagens capturadas no microscópio confocal.

3.8 INFLUXO DE SÓDIO ATRAVÈS DOS CSDVs E A INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF₄₈₈

A dependência do influxo de íons sódio através do canal foi avaliada por meio da incubação das células em KRH com 1μM de TTX por 5 min. a 37°C e subseqüente incubação com TsTX-AF₄₈₈ por mais 55 min. a 37°C. Além disso, em outro experimento,

NaCl foi substituído por 124 mM de cloreto de colina. Após o período de incubação, as células foram lavadas com KRH e suas imagens capturadas no microscópio confocal.

3.9 ATIVIDADE DA MEMBRANA E A INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF₄₈₈

A fim de verificar o efeito da atividade da membrana celular sobre a internalização dos CSDVs, foi realizado um experimento no qual as células foram incubadas durante 60 min. a 37°C em KRH sem cálcio, contendo 2mM de EGTA e 1µM de TTX. Após o período de incubação as células foram lavadas com KRH e suas imagens capturadas no microscópio confocal.

3.10 AQUISIÇÃO DE IMAGENS

A aquisição das imagens foi realizada à temperatura ambiente. Lamínulas de 60x15 mm, com as células, foram transferidas para uma câmara de perfusão. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio confocal, Leica TCS SP5, equipado com objetivas de imersão em água (63x). As preparações foram excitadas com laser de argônio na linha de 488nm e a luz emitida foi captada por um filtro 510-555nm. As imagens capturadas foram processadas e analisadas utilizando os programas Adobe® Photoshop® 7.0 (Adobe Systems Inc.) e ImageJ 1.39 (NIH, USA). Os parâmetros de aquisição das imagens comparadas foram sempre os mesmos. Nos experimentos com TsTX-AF₄₈₈+BSA, com TsTX-AF₄₈₈ desnaturada e com TsTX-AF₄₈₈ sem Ca²⁺ foi utilizado ganho de 800 v ; nos demais experimentos foi utilizado ganho de 850 v.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM) e valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise

estatística foi realizada utilizando o método *one-way* ANOVA, seguido de contraste ortogonal.

4 RESULTADOS

4.1 ESPECIFICIDADE DA LIGAÇÃO DA TsTX-AF₄₈₈ AOS CSDVs

A especificidade da ligação da TsTX em células GH3 foi verificada por Massensini e cols., em 2002. O ensaio de competição entre proteína marcada e não marcada já foi descrito (Gekle, Mildemberger et al. 1995; Habich, Baumgart et al. 2002) e baseia-se no bloqueio de uma proteína marcada pelo pré-bloqueio de seu alvo ligante com excesso da mesma proteína não marcada. O pré-bloqueio parece não ter ocorrido, uma vez que foi detectada fluorescência no interior da célula, sem diferença significativa em relação à marcação dos experimentos com toxina marcada (TsTX-AF₄₈₈: $43,5 \pm 3,2$; TsTX-AF₄₈₈+TsTX: $51,2 \pm 7,6$) (Figura 3).

A albumina é uma proteína de 69 KDa envolvida no transporte de moléculas hidrofóbicas (Gekle, Mildemberger et al. 1995). A pré-incubação com albumina tem como objetivo bloquear ligações inespecíficas, ou seja, bloquear sítios aos quais se ligam moléculas da ordem de 60 KDa. Não houve diferença significativa entre a marcação com (30,6 \pm 0,6) e sem BSA (28,5 \pm 1,3), conforme mostra a figura 4.

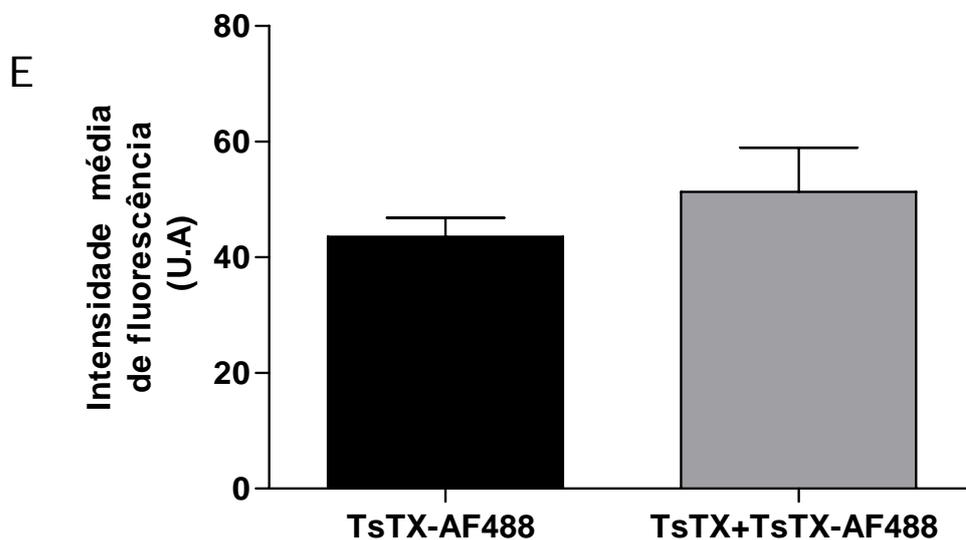
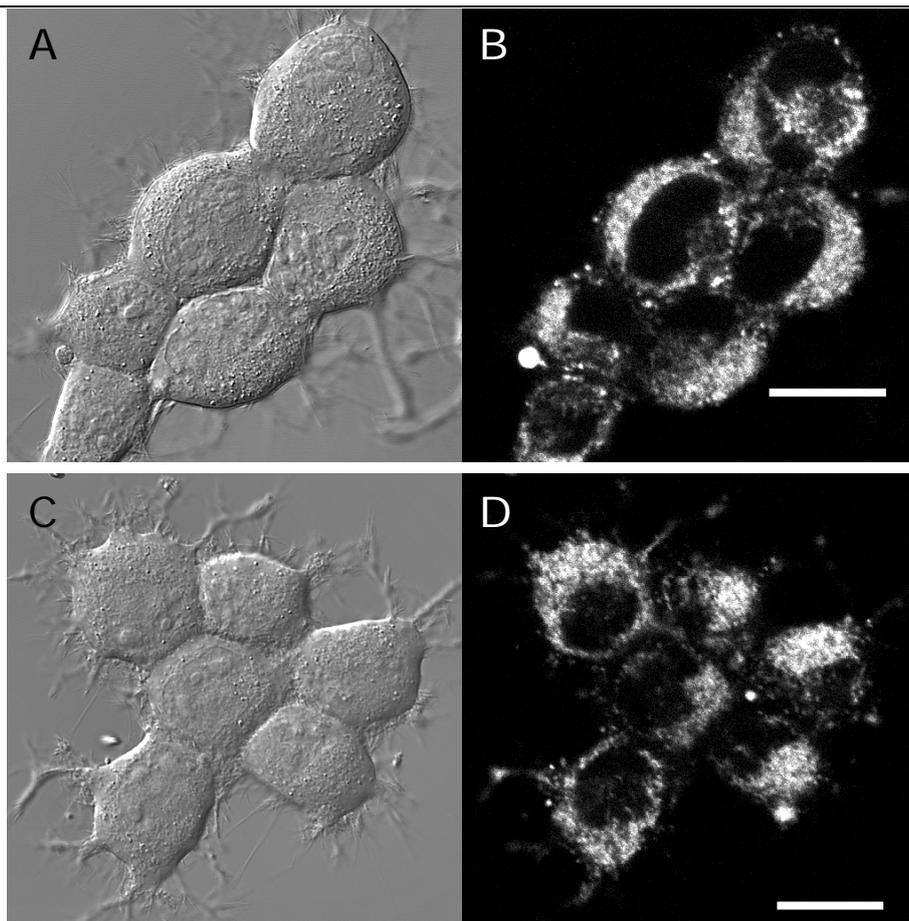


Figura 3: Competição entre TsTX e TsTX-AF₄₈₈.

A e C são imagens de luz transmitida. Em B as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min. Em D as células foram pré-incubadas com TsTX 10 μ M e após 5 min. com TsTX-AF₄₈₈ 1 μ M por mais 55 min. O gráfico E mostra que não foi possível detectar diferença na intensidade de marcação entre estes experimentos. Barras de escala correspondem a 20 μ m.

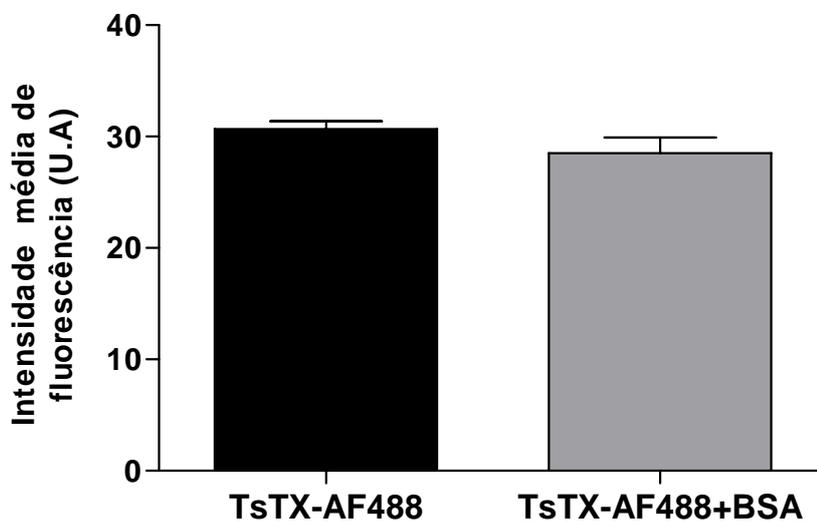
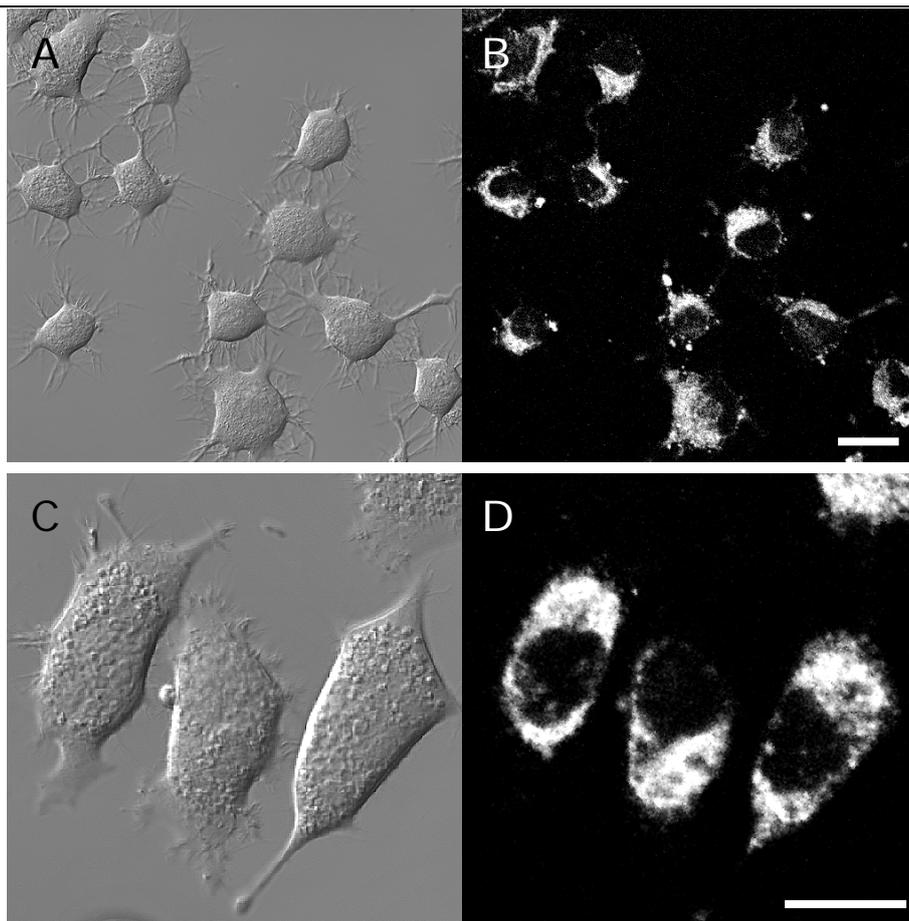


Figura 4: Competição entre BSA e TsTXAF₄₈₈.

A e C são imagens de luz transmitida. Em B as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min. Em D as células foram pré-incubadas com BSA e após 5 min. com TsTX-AF₄₈₈ 1 μ M por mais 55 min. O gráfico E mostra que não houve diferença significativa na intensidade de marcação entre estes experimentos, sugerindo internalização específica dos CSDVs-TsTX-AF₄₈₈. Barras de escala correspondem a 20 μ m.

4.2 INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF₄₈₈

A internalização dos CSDVs-TsTX-AF₄₈₈ foi avaliada através da incubação das células SN56 com TsTX-AF₄₈₈ nos intervalos de tempo de 5, 15, 30 e 60 min. O intervalo de 60 min., no qual se verificou marcação mais intensa, foi utilizado na comparação dos demais experimentos (Figura 5).

Após 5 min. de incubação com TsTX-AF₄₈₈ observou-se marcação no interior das células com uma intensidade de fluorescência média de $38,7 \pm 5,2$. O aumento da intensidade de fluorescência não foi linear nos tempos subseqüentes, com $43,7 \pm 3,8$ para 15 min. de incubação; $36,4 \pm 2,9$ para os 30 min. e $43,5 \pm 3,2$ para o intervalo de 60 min., não sendo detectada diferença significativa entre os intervalos. O intervalo de 60 min. foi escolhido para a realização dos demais experimentos, porque as imagens revelaram um padrão de fluorescência no citoplasma mais concentrado; enquanto que a fluorescência nos demais intervalos mostrou-se difusamente distribuída no interior da célula (Figura 5).

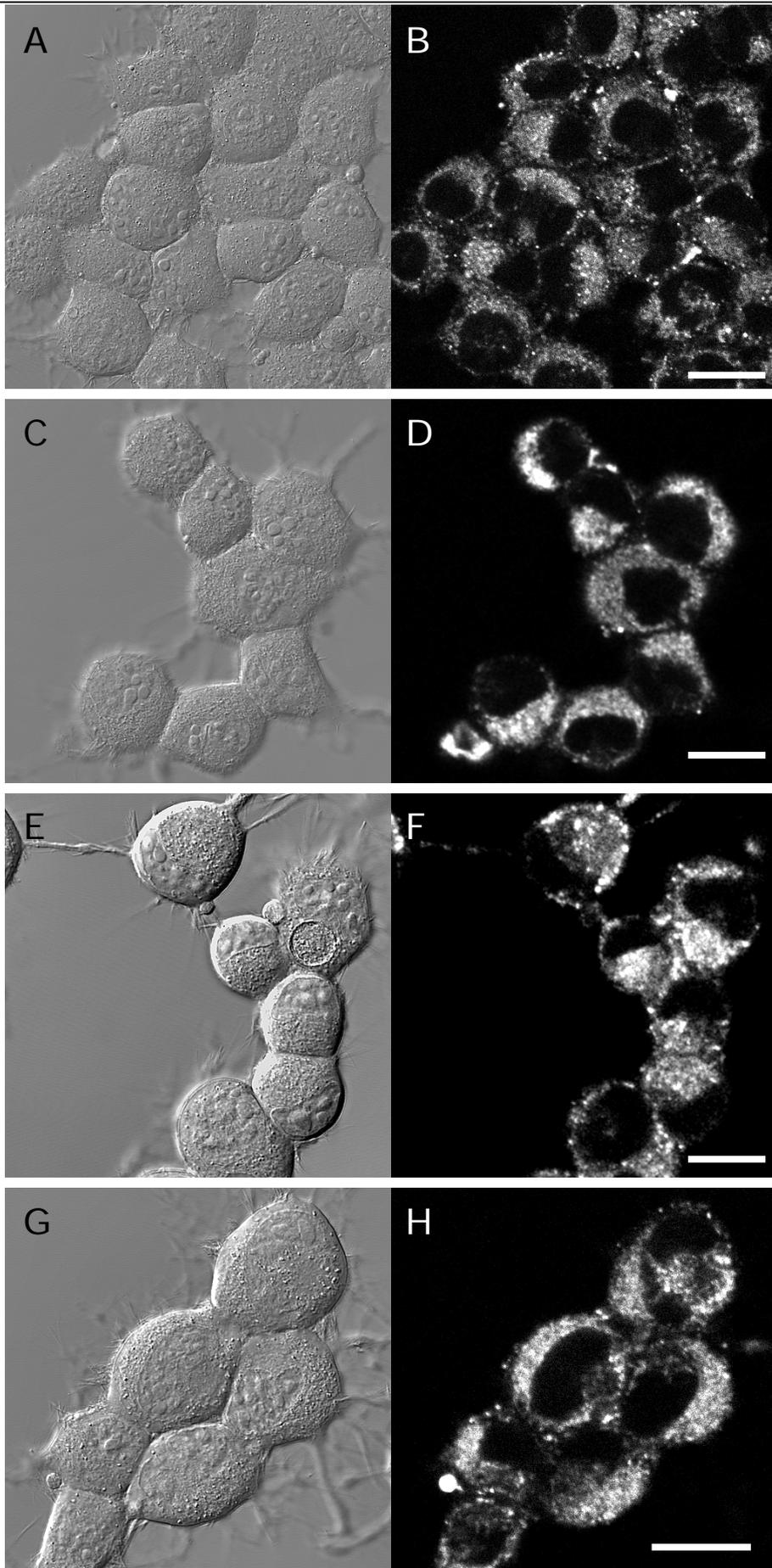


Figura 5

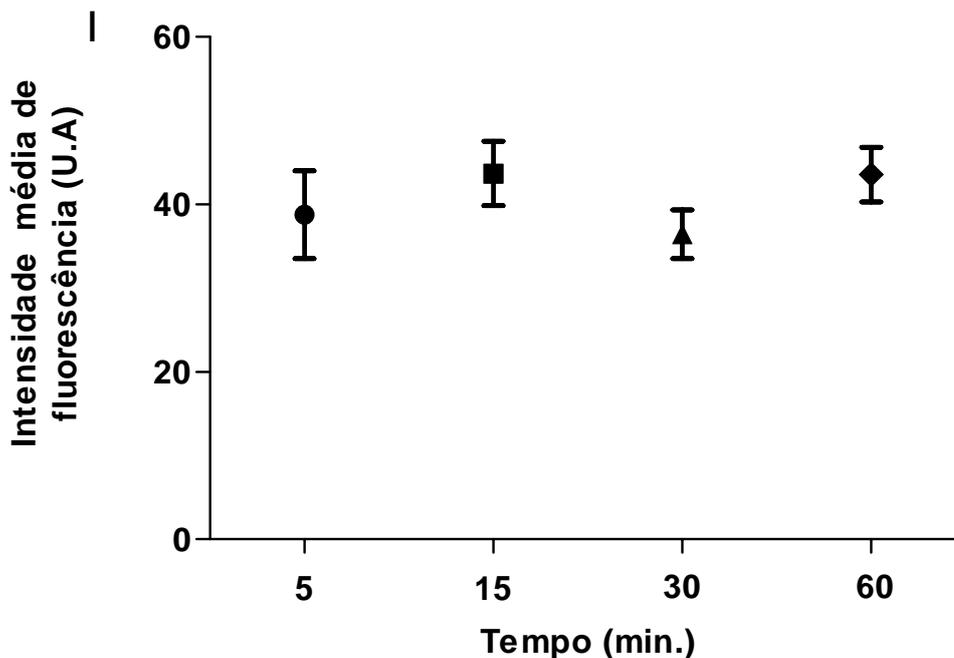


Figura 5: Internalização dos CSDVs-TsTX-AF₄₈₈ em diferentes intervalos de tempo.

A, B, C e D são imagens de luz transmitida (DIC). Em E, F, G e H as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 5, 15, 30 e 60 min., respectivamente. É possível observar marcação citoplasmática a partir do menor intervalo, sugerindo a internalização dos CSDVs-TsTX-AF₄₈₈. O gráfico I representa a intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (U.A), nos respectivos intervalos. Barras de escala correspondem a 20 μ m.

O experimento controle verificou a autofluorescência das células com os parâmetros de aquisição de imagens utilizados nos demais experimentos (Figura 6). As imagens de autofluorescência permitem diferenciar a marcação resultante de moléculas celulares, que são fluorescentes quando excitadas com luz UV/VIS, da marcação proveniente da TsTX-AF₄₈₈. A emissão de fluorescência surge de fluoróforos endógenos, encontrados em mitocôndrias e lisossomos, como NADPH (Monici 2005). Foi observado aumento significativo na intensidade média de fluorescência das células incubadas por 60 min. com TsTX-AF₄₈₈ ($43,56 \pm 3,2$) em relação ao controle sem toxina ($30,38 \pm 1,5$).

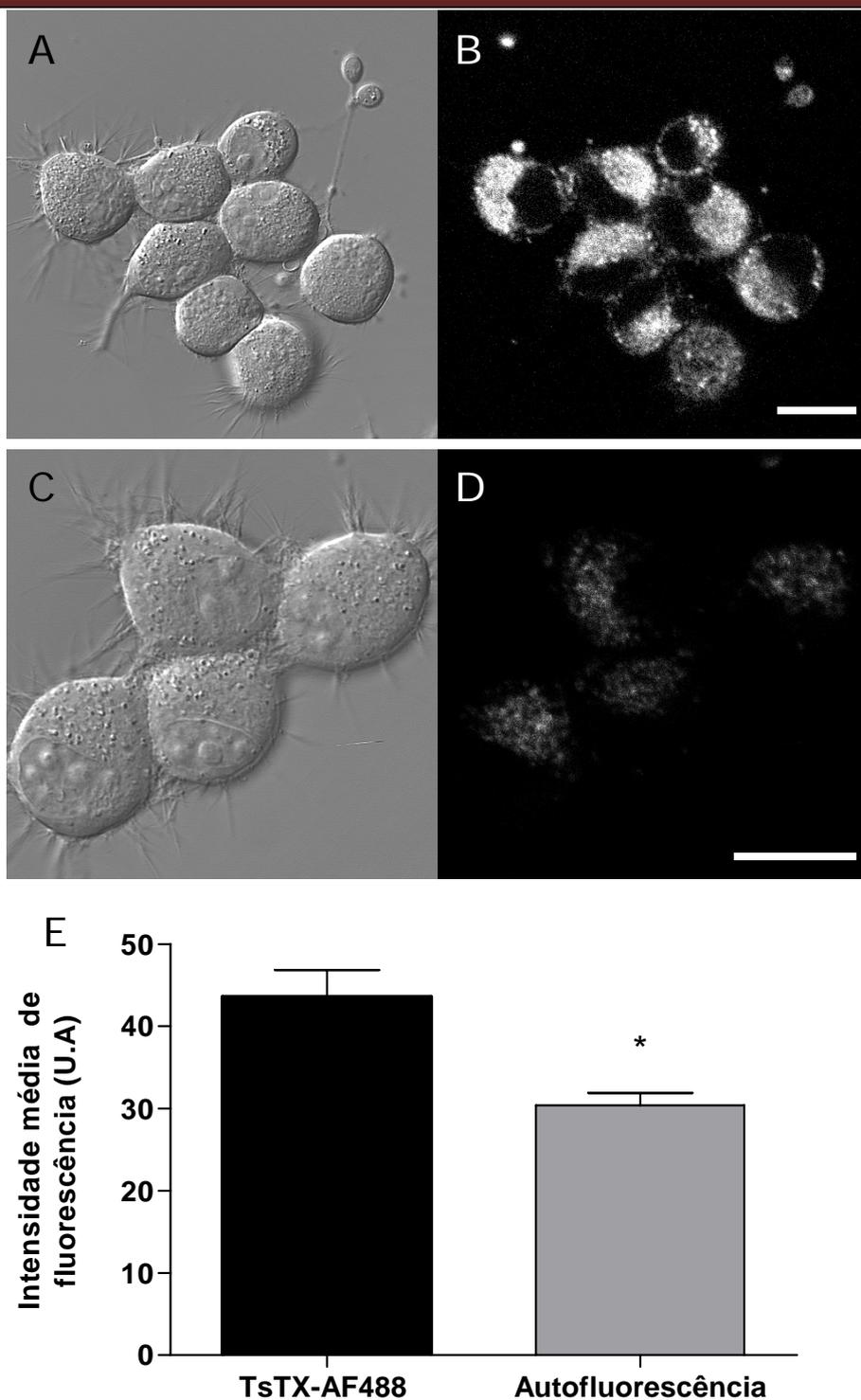


Figura 6: Autofluorescência das células SN56.

A e C são imagens de luz transmitida. Em B as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min. Em D as células foram incubadas apenas com meio de cultura. É possível observar um nível de fluorescência basal das células cuja quantificação é mostrada em E. Entretanto a intensidade de autofluorescência é significativamente inferior à intensidade observada quando a TsTX-AF₄₈₈ foi incubada por 60 min. * $p < 0,05$. Barras de escala correspondem a 20 μm.

4.3 DEPENDENCIA DA TEMPERATURA DO MEIO NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF₄₈₈

Neste experimento as células SN56 foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ a 4°C por 60 min. A esta temperatura, com a diminuição do metabolismo celular, ocorre inibição dos processos endocíticos (Dunn, Hubbard et al. 1980) uma vez que maioria das moléculas são internalizadas a 37°C (Nichols 2002; Glebov, Bright et al. 2006). Nossos resultados mostram que ocorreu redução significativa da marcação citoplasmática quando a temperatura foi diminuída (TsTX-AF₄₈₈ a 4°C: 33,5 ± 1,3) em relação ao controle (TsTX-AF₄₈₈ a 37°C: 43,5 ± 3,2), como mostrado na figura 7.

4.4 DEPENDÊNCIA DA ATIVIDADE DA TsTX PARA A INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF₄₈₈

A TsTX é uma proteína parcialmente seqüenciada, composta de 63 aminoácidos (Sampaio e cols., 1983). Como outras proteínas ela apresenta estrutura terciária cuja estabilidade é conferida, entre outros, por pontes dissulfídicas. O processo de desnaturação das proteínas ocorre quando há perda da estrutura protéica (exceto da estrutura primária) pela ação de um agente externo, como calor ou agentes químicos. A maioria das proteínas perde a sua função biológica quando desnaturadas.

A fim de verificar se a perda de função da TsTX seria capaz de alterar a dinâmica de internalização dos CSDVs-TsTX-AF₄₈₈ foi realizado um experimento no qual um agente desnaturante, β-mercaptoetanol, foi utilizado. Este agente provoca ruptura das pontes dissulfídicas, causando perda funcional da proteína. As imagens revelaram uma marcação intensa na região da membrana citoplasmática, diferente daquela observada em experimentos anteriores. Observou-se acúmulo de fluorescência em várias regiões

da membrana, sugerindo que os CSDVs-TsTXAF₄₈₈ não são internalizados quando a toxina perde sua função (Figura 8).

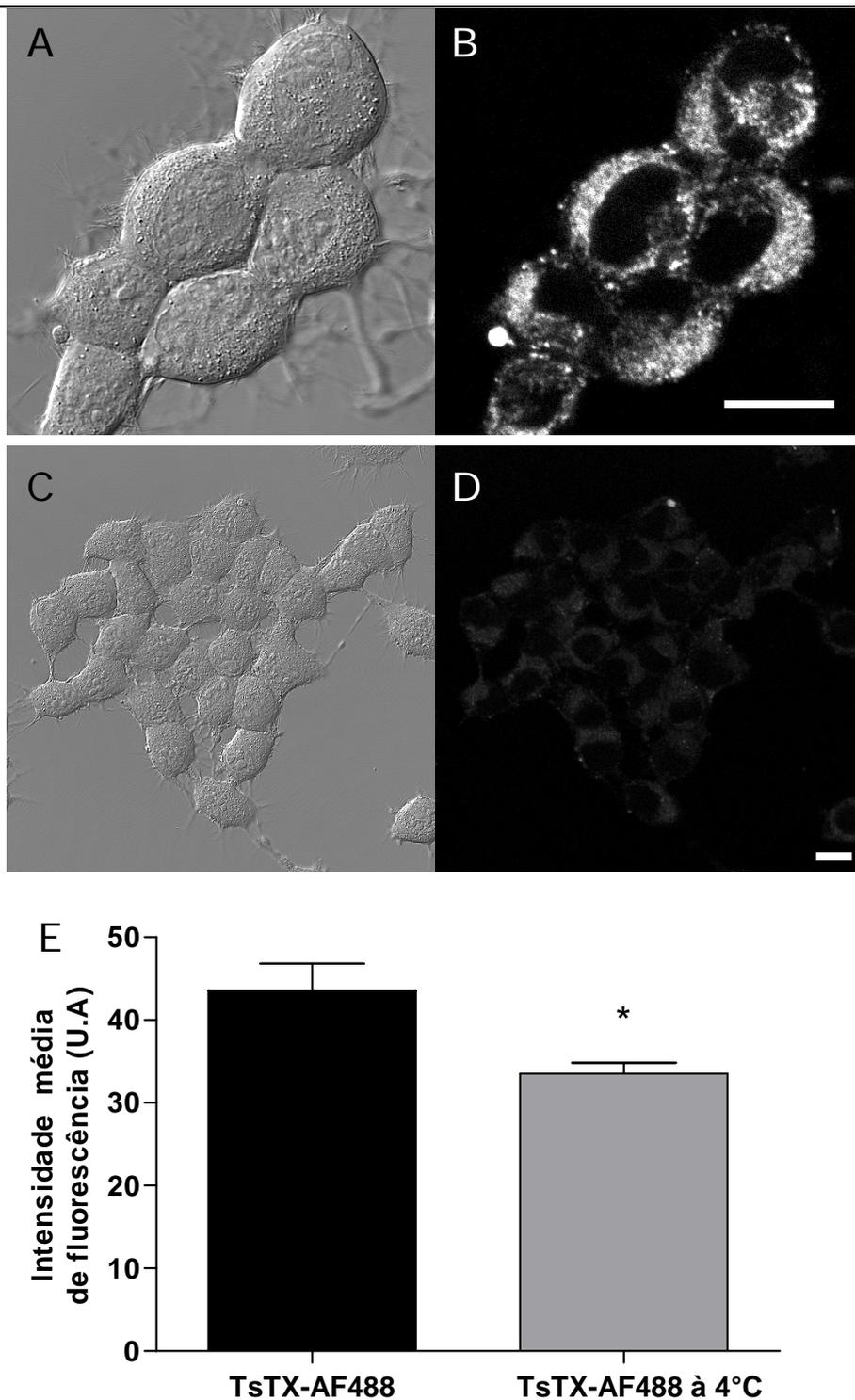


Figura 7: Inibição da internalização dos CSDVs-TsTX-AF₄₈₈ com a diminuição da temperatura.

A e C são imagens de luz transmitida. Em B as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min. Em D as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min., a 4°C. O gráfico E mostra que houve redução significativa na intensidade de marcação quando a temperatura foi reduzida, sugerindo dependência do metabolismo celular para a internalização dos CSDVs-TsTXAF₄₈₈. * p<0,05. Barras de escala correspondem a 20 µm.

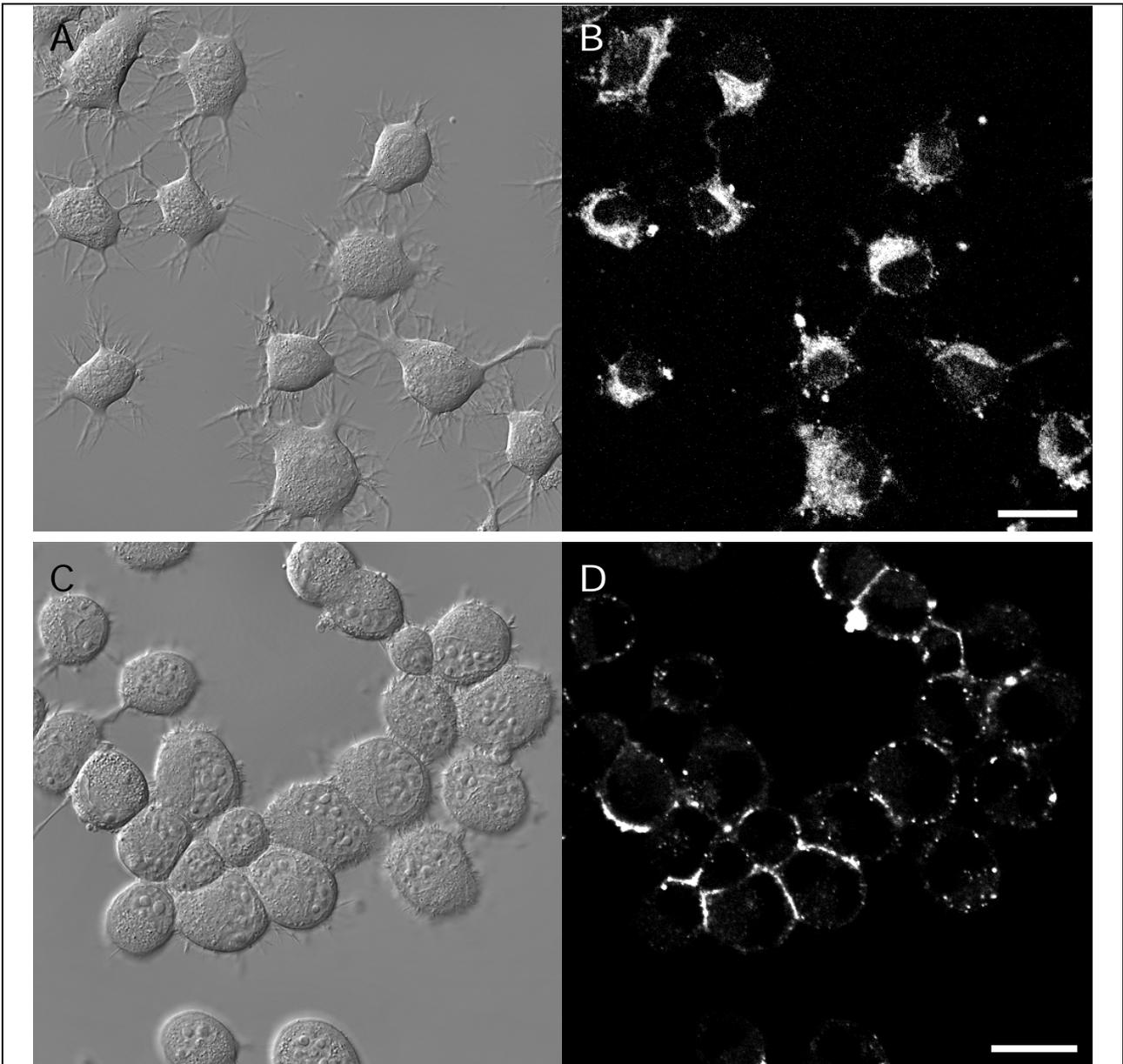


Figura 8: Inibição da internalização dos CSDVs-TsTX-AF₄₈₈ com a desnaturação da toxina.

A e C são imagens de luz transmitida. Em B as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min. Em D as células foram incubadas por 60 min. com TsTX-AF₄₈₈ previamente desnaturada com β -mercaptoetanol a uma temperatura de aproximadamente 100°C, minutos antes da incubação. A marcação concentrou-se na membrana citoplasmática das células, o que foi observado apenas neste experimento. Barras de escala correspondem a 20 μ m.

4.5 DEPENDÊNCIA DO Ca^{2+} NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF₄₈₈

Os canais para cálcio dependentes de voltagem exercem papel importante na endocitose de vesículas sinápticas (Chen, Deng et al. 2003). A redistribuição de canais para potássio em neurônios hipocámpais também requer o influxo de cálcio (Kim, Jung et al. 2007), porém, pouco se sabe sobre a importância do cálcio extracelular na internalização dos CSDVs. Quando as células foram incubadas em meio sem Ca^{2+} ocorreu redução significativa da marcação citoplasmática quando comparadas àquelas incubadas em meio com Ca^{2+} (TsTX-AF₄₈₈: $30,6 \pm 0,6$; TsTX-AF₄₈₈ sem Ca^{2+} : $26,8 \pm 0,6$), como mostrado na figura 9.

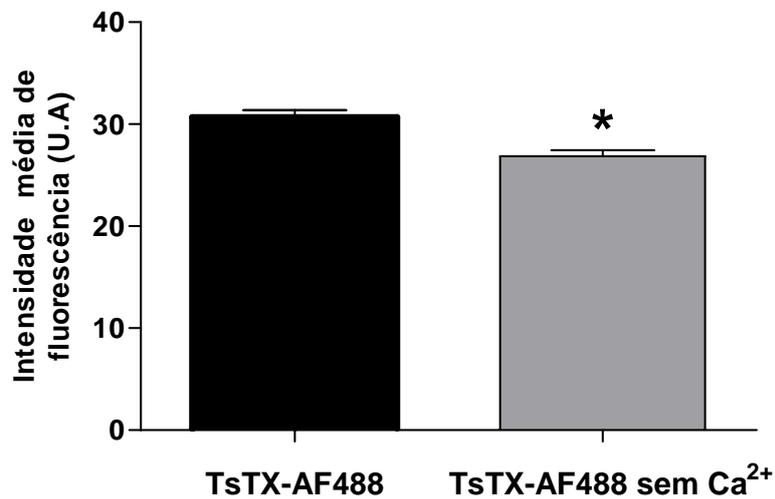
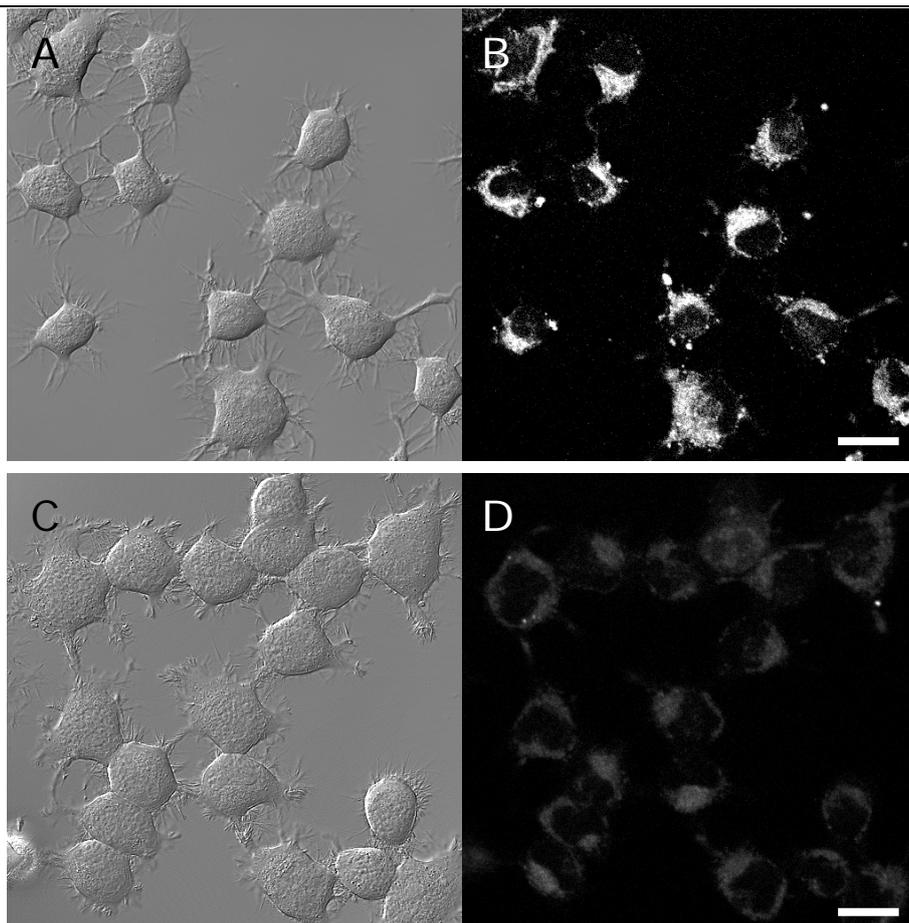


Figura 9: Participação do cálcio extracelular na internalização dos CSDVs-TsTX-AF₄₈₈.

A e C são imagens de luz transmitida. Em B as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min. Em D as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min. em meio de cultura sem cálcio e com EGTA. O gráfico E mostra que não foi possível detectar diferença na intensidade de marcação entre estes experimentos. Barras de escala correspondem a 20 μm. * p<0,05.

4.6 DEPENDÊNCIA DO INFLUXO DE SÓDIO NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF₄₈₈

Um estudo de Dargent e Couraud (1990) observou que a adição de ativadores de canais para sódio (veratridina e batracotoxina), ao meio de cultura, provocou o desaparecimento dos CSDVs da membrana celular. O desaparecimento induzido dos canais foi abolido por TTX, o que sugere que a sua internalização é dependente do Na⁺ extracelular. Além disso, a adição de colina (íon não permeante) também aboliu o desaparecimento dos canais.(Dargent and Couraud 1990)

Entretanto os resultados obtidos não corroboram os resultados descritos na literatura. As imagens, obtidas quando TTX foi adicionada ao meio, revelaram intensidade de marcação semelhante àquelas sem adição de TTX (TsTX-AF₄₈₈: 43,5 ± 3,2; TsTX-AF₄₈₈+TTX:38,4 ± 1,2)(Figura 10). As células, em cujo meio foi adicionado cloreto de colina, também não apresentaram intensidade de fluorescência significativamente diferente daquelas sem adição de cloreto de colina (TsTX-AF₄₈₈: 43,5 ± 3,2; TsTX-AF₄₈₈+cloreto de colina: 40,0 ± 2,2) (Figura 11).

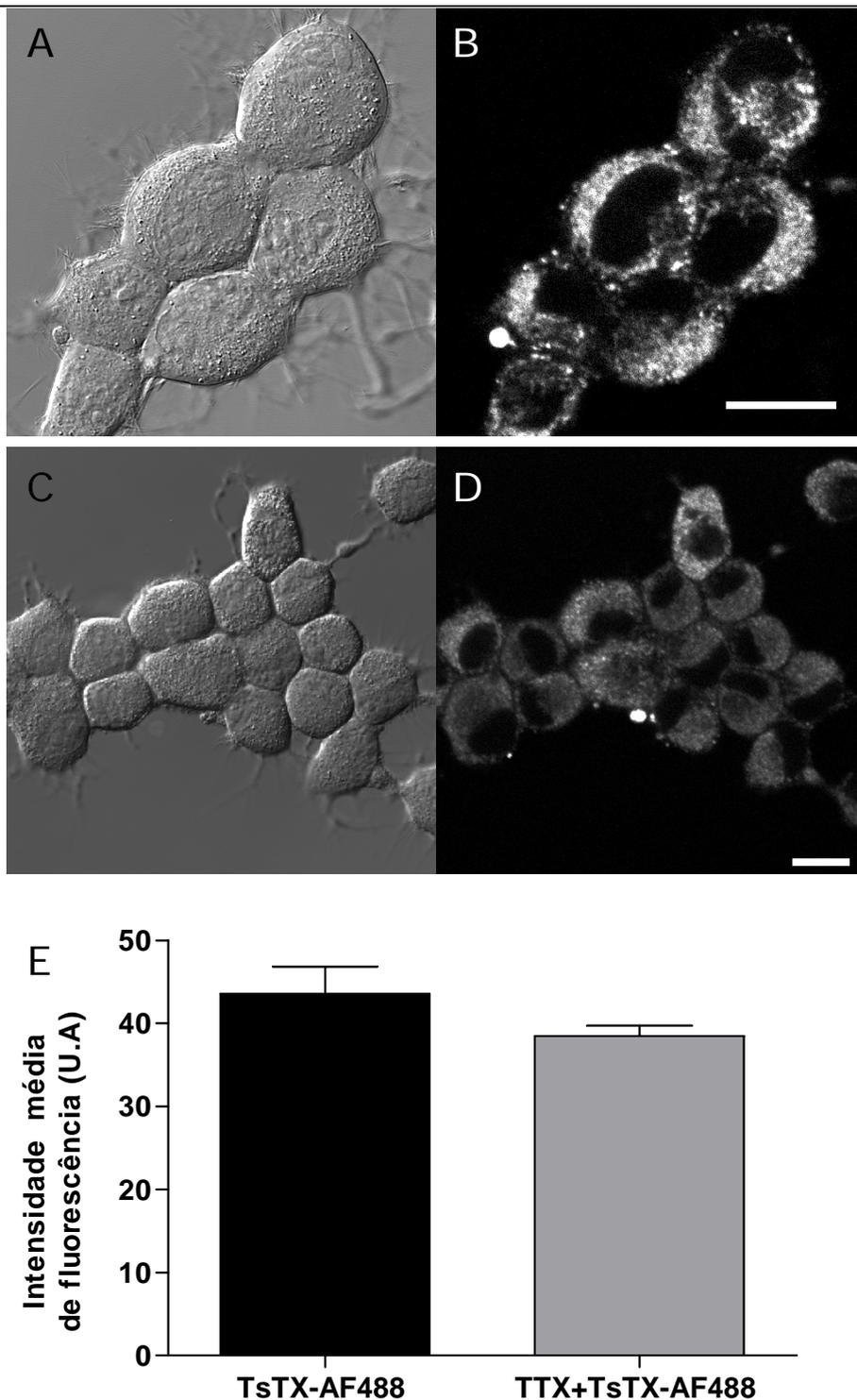


Figura 10: Participação do influxo de íons sódio na internalização dos CSDVs-TsTX-AF₄₈₈.

A e C são imagens de luz transmitida. Em B as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min. Em D as células foram pré-incubadas com TTX e após 5 min. com TsTX-AF₄₈₈ por mais 55 min. O gráfico E mostra que não foi possível detectar diferença na intensidade de marcação entre estes experimentos. Barras de escala correspondem a 20 μ m.

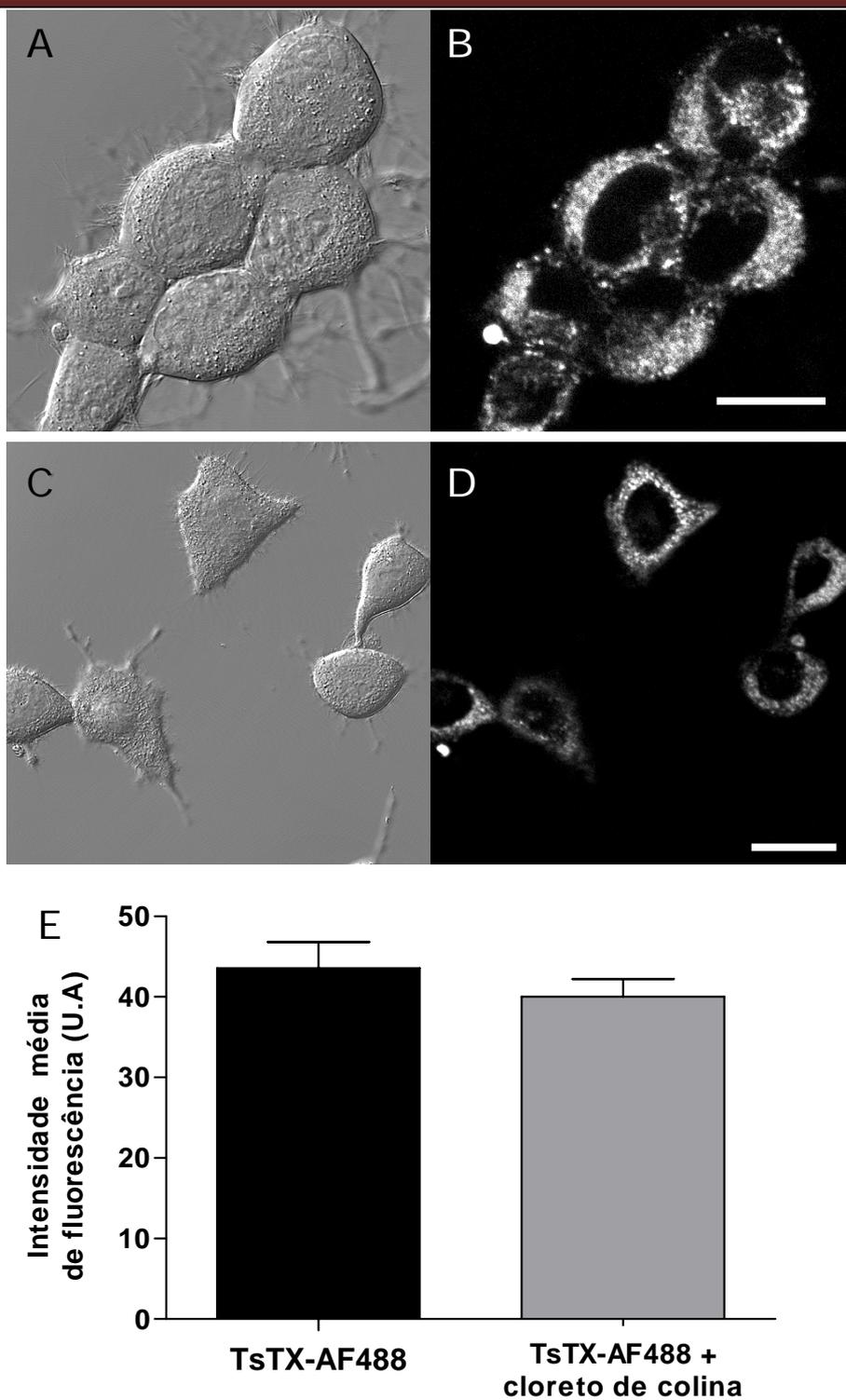


Figura 11: Internalização dos CSDVs-TsTXAF₄₈₈ com a substituição do sódio por colina.

A e C são imagens de luz transmitida. Em B as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min. Em D as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min. em meio de cultura onde cloreto de sódio foi substituído por cloreto de colina. O gráfico E mostra que não foi possível detectar diferença na intensidade de marcação entre estes experimentos. Barras de escala correspondem a 20 µm.

4.7 DEPENDÊNCIA DA ATIVIDADE DA MEMBRANA NA INTERNALIZAÇÃO DOS CSDVs-TsTX-AF₄₈₈

Os experimentos conduzidos onde as células foram incubadas com KRH sem Ca²⁺ contendo TTX 1μM e EGTA 2mM revelaram intensidades de marcação citoplasmática significativamente inferiores em relação àqueles onde havia somente TsTX-AF₄₈₈ (TsTX-AF₄₈₈: 43,5 ± 3,2; TsTX-AF₄₈₈+TTX sem Ca²⁺ :31,8 ± 2,2) (Figura 12).

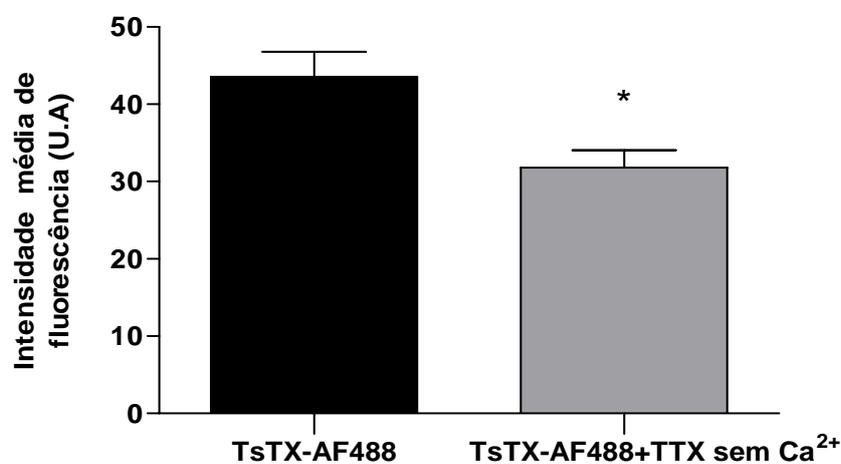
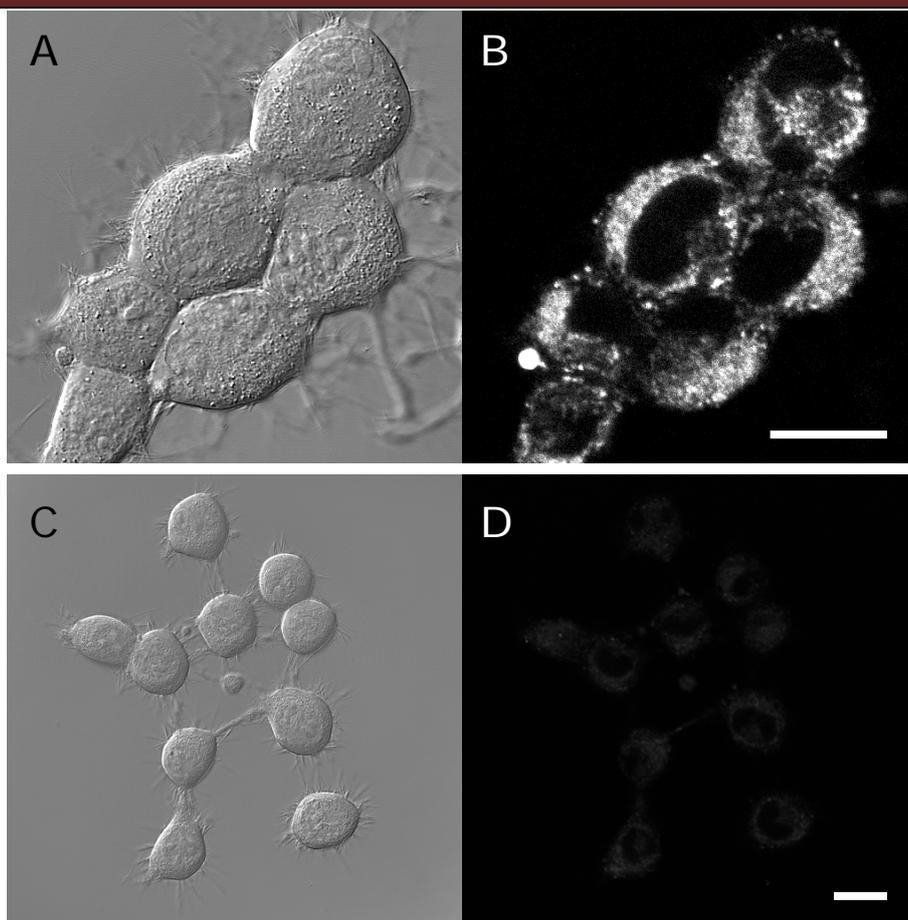


Figura 12: Participação concomitante do influxo de sódio e do cálcio extracelular na internalização dos CSDVs-TsTXAF₄₈₈.

A e C são imagens de luz transmitida. Em B as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min. Em D as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈ por 60 min. em meio de cultura na ausência de cálcio extracelular, com EGTA e com TTX pré-incubada nos 5 min. iniciais. Houve redução significativa da marcação em relação às células incubadas em meio com cálcio e sem TTX, sugerindo a possível dependência concomitante do influxo de sódio e do cálcio extracelular para a ocorrência da internalização dos CSDVs TsTXAF₄₈₈. Barras de escala correspondem a 20 μ m. * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Os CSDVs são amplamente conhecidos por gerarem potenciais de ação em células excitáveis, entretanto sua participação na modulação sináptica ainda permanece pouco esclarecida. Estudos sobre a sua distribuição, bem como sobre fatores responsáveis por sua regulação, na membrana plasmática, são essenciais para a compreensão da excitabilidade neuronal. Com a finalidade de investigar a internalização dos CSDVs foi utilizada a TsTX, uma ferramenta capaz de se ligar de forma específica a estes canais, além de provocar a despolarização do neurônio. Portanto a internalização da TsTX-AF₄₈₈ sugere a internalização dos canais.

Tendo em vista a avaliação indireta dos CSDVs com a técnica utilizada, os resultados sugerem a internalização dos canais ligados a TsTX-AF₄₈₈ por alguma via endocítica ou a internalização apenas da TsTXAF₄₈₈. Além disso, pode ser que os canais não estejam sendo internalizados de forma íntegra; a interação da TsTX-AF₄₈₈ pode provocar a ruptura de sua estrutura e, dessa forma, fragmentos dos canal poderiam estar sendo internalizados por um mecanismo não endocítico. Estudos realizados posteriormente poderão confirmar a hipótese inicial.

Ao se considerar a internalização dos CSDVs, esta deve ocorrer rapidamente uma vez que foi detectada marcação, no interior da célula, superior à marcação de autofluorescência. O estímulo despolarizante, provocado pela TsTX, pode ser o responsável pela ocorrência rápida desse evento. Nos intervalos de tempo subsequentes, a intensidade de fluorescência foi semelhante, embora seja possível visualizar um padrão mais intenso de marcação quando as células foram incubadas com TsTX-AF₄₈₈, por 60 min. É possível que neste intervalo os canais estejam agrupados dentro de vesículas endocíticas, enquanto que em intervalos de tempo inferiores eles estejam distribuídos difusamente pelo citoplasma. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de internalização apenas da TsTX-AF₄₈₈ e tampouco do canal não

íntegro ligado a ela. Este pode ocorrer via um mecanismo não endocítico cuja ocorrência também poderia ocorrer em intervalos de tempo menores.

A especificidade de ligação, descrita por Massensini e cols., em 2002, não pôde ser observada. Nesse estudo foram utilizadas células GH3, enquanto que o presente estudo utilizou células SN56. A expressão diferenciada nos tipos celulares e conseqüentemente a quantidade de CSDVs presentes na membrana plasmática podem ter contribuído para a diferença nos resultados. Além disso, é possível que os intervalos de tempo em que as células foram incubadas com a toxina fluorescente sejam responsáveis pelo fenômeno observado. Neste estudo o ensaio de competição durou 60 min., enquanto que no estudo citado acima o mesmo ensaio durou 5 min. Como a ligação da TsTX aos CSDVs é reversível, um tempo superior de incubação deve possibilitar um aumento na freqüência de ligação e de desligamento das toxinas, facilitando a ligação de mais toxina marcada e sua conseqüente internalização. As outras possibilidades referem-se à internalização apenas da TsTX-AF₄₈₈ ou ainda do canal não íntegro associado a ela, por um mecanismo não saturável e provavelmente não endocítico.

O pré-bloqueio com albumina não alterou a marcação intracelular da TsTX-AF₄₈₈. A albumina é a proteína plasmática mais abundante, sendo responsável pelo transporte de substâncias como bilirrubina, estradiol, cortisol, entre outras. O fato de ser inespecífica, em função do grande número de ligantes que a ela podem se associar (Kragh-Hansen 1981) permite sua utilização como ferramenta para investigar a especificidade do objeto em estudo. O resultado encontrado parece confirmar a ligação específica da TsTX-AF₄₈₈ aos CSDVs, de acordo com o estudo de Massensini e cols., em 2002. Ou então a TsTX-AF₄₈₈ estaria sendo internalizada também por um

mecanismo específico ou o mesmo poderia ocorrer com o canal não íntegro, associado a ela.

Quando a TsTX-AF₄₈₈ foi incubada a 4°C observou-se redução significativa da marcação intracelular. O resultado sugere que a internalização, possivelmente dos CSDVs, depende do metabolismo celular e também de alguma via endocítica, tendo em vista que a maioria dos processos endocíticos é ativo, dependente de energia e ocorre em temperaturas fisiológicas (37°C). Da mesma forma, a internalização tanto da TsTX-AF₄₈₈ sozinha quanto do canal não íntegro, associado a ela, poderia estar sendo inibida a esta temperatura.

A atividade da TsTX parece fundamental para sua internalização e dos CSDVs. A adição de um agente desnaturante, β-mercaptoetanol, à temperatura aproximada de 100°C, parece ter provocado sua perda funcional, com ruptura das pontes dissulfídicas e perda da estrutura protéica secundária e terciária. Resíduos específicos de aminoácidos são responsáveis pela interação das toxinas do tipo α, com os CSDVs (Kharrat, Darbon et al. 1989), portanto é possível que a manutenção da estrutura primária não tenha impedido sua ligação aos CSDVs uma vez que foi observada intensa marcação na região da membrana plasmática, o que não foi visto em nenhum outro experimento. Embora a TsTX tenha se ligado aos canais, a perda de sua estrutura secundária e terciária deve ter impedido sua ação. Portanto, com a inatividade da toxina, a entrada de Na⁺ na célula foi menor quando comparada quando a toxina estava ativa, pois nesta forma ela consegue retardar a inativação dos canais. Novamente outra possibilidade refere-se à internalização da TsTX-AF₄₈₈ sozinha. Ela pode não ter internalizado com sua perda funcional. Apesar de pouco provável, é possível que ela tenha outro ligante na membrana celular, porém a literatura descreve apenas sua interação com os CSDVs. Curioso é o fato da TsTX-AF₄₈₈ não ter sido lavada já que não estava em sua forma

ativa; sua estrutura protéica primária, com a conservação dos resíduos de aminoácidos parece suficiente para sua ligação. Essa conservação apóia a hipótese inicial, uma vez que os resíduos de aminoácidos são responsáveis pela interação com o sítio 3 dos CSDVs. A ação da TsTX pela inibição do movimento externo do segmento IV dos CSDVs poderia explicar os resultados encontrados. Quando a toxina está ativa, ocorre inibição das correntes de comporta (“gating currents”) evitando que ocorra a inativação rápida dos canais ainda que não haja fluxo de íons Na^+ . Entretanto quando ela está inativa, mesmo ligada, não deve ocorrer inibição das correntes de comporta. Dessa forma os canais se inativariam e não ocorreria sua internalização. Esta por sua vez poderia estar ocorrendo como um mecanismo “protetor” contra uma hiperexcitabilidade neuronal, ou seja, na iminência de um fluxo iônico mais prolongado, os CSDVs seriam internalizados a fim de evitá-lo.

A retirada do Ca^{2+} extracelular, com adição de um quelante -EGTA- inibiu a marcação intracelular. Portanto a internalização dos CSDVs parece depender do cálcio extracelular, provavelmente devido à sua participação nos processos endocíticos da membrana celular. De forma contrária, a internalização da TsTX-AF₄₈₈ ou do canal não íntegro, ligado a ela, poderia ocorrer sem a dependência do cálcio ou das vias endocíticas.

Os resultados obtidos com a adição de TTX e com a substituição do cloreto de sódio por cloreto de colina, no meio de incubação, foram semelhantes. Mais uma vez não ocorreu inibição da marcação. A TTX se liga aos CSDVs externamente, bloqueando o fluxo iônico. Entretanto o mecanismo de comporta do canal, ou seja, a ativação e a inativação funcionam normalmente sob estímulo despolarizante (Narahashi 2008). Esse comportamento foi demonstrado pela medida das correntes de ativação e inativação do canal que não foram afetadas pela TTX (Bezanilla and Armstrong 1974; Keynes and

Rojas 1974). Portanto os resultados do presente estudo sugerem que a possível internalização dos CSDVs não depende do fluxo iônico, mas sim do seu estado ativado, uma vez que a TsTX se liga preferencialmente a esse estado. O mesmo parece ocorrer com a substituição do cloreto de sódio por cloreto de colina. Neste caso o fluxo de íons também não ocorre, entretanto a TsTX deve estar ligada aos canais no estado ativado, permitindo que os mesmos sejam internalizados. A internalização da TsTX-AF₄₈₈ sem os canais ou do canal não íntegro, ligado a ela, poderia revelar o mesmo padrão de marcação, uma vez que estes não deve se dependentes de fluxo íons Na⁺

A concomitante retirada do Ca²⁺ extracelular e a adição de TTX ao meio provocaram redução significativa da marcação intracelular. O resultado foi semelhante àquele obtido com a redução da temperatura para 4°C. A esta temperatura, como o metabolismo celular está diminuído, tanto os mecanismos de endocitose quanto o influxo de Na⁺ são menores, o que é semelhante ao que ocorre com a retirada do Ca²⁺ e com a adição de TTX, respectivamente. Da mesma forma, o resultado poderia se aplicado à ocorrência da internalização da TsTX-AF₄₈₈ sem o canal ou do canal não íntegro.

A análise dos resultados também deve considerar a sensibilidade da técnica utilizada. É possível que exista diferença entre os experimentos realizados, porém o limite para detecção da fluorescência pode não ter permitido a observação dessas diferenças. A fluorescência só pôde ser detectada com parâmetros de aquisição muito altos, com isso a faixa de variação dos níveis de marcação entre os experimentos ficou bastante reduzida. A utilização de uma técnica complementar é necessária para confirmar tanto a internalização dos CSDVs como sua dependência dos parâmetros fisiológicos investigados. A próxima etapa deste estudo deve consistir em quantificar a proteína na membrana ou no citoplasma e determinar se seu peso molecular corresponde ao peso molecular dos CSDVs.

A relevância do atual estudo baseia-se da inovação da ferramenta utilizada. Este é o primeiro estudo que investiga a internalização dos CSDVs utilizando uma toxina fluorescente como marcador dos canais e como estímulo despolarizante, concomitantemente. Com a técnica empregada foi possível observar os eventos sem a fixação da amostra e sem outro estímulo externo além da própria TsTX.

6 CONCLUSÕES

-
- A marcação fluorescente relativa à TsTX-AF₄₈₈ no citoplasma de células SN56 sugere a internalização de CSDVs.
 - A internalização da TsTX-AF₄₈₈ com os CSDVs deve ocorrer por alguma via endocítica específica, tendo em vista a não competição entre TsTX-AF₄₈₈ e BSA.
 - A internalização de CSDVs-TsTX-AF₄₈₈ parece depender do metabolismo celular, tendo em vista a redução significativa da marcação intracelular com a diminuição da temperatura.
 - A internalização de CSDVs-TsTX-AF₄₈₈ parece depender do Ca²⁺ extracelular, tendo em vista a redução significativa da marcação intracelular com a adição de EGTA ao meio e concomitante retirada do cálcio extracelular.

7 BIBLIOGRAFIA

-
- Armstrong, C. M. and B. Hille (1998). "Voltage-gated ion channels and electrical excitability." Neuron **20**(3): 371-80.
- Barhanin, J., J. R. Giglio, et al. (1982). "Tityus serrulatus venom contains two classes of toxins. Tityus gamma toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na⁺ channel." J Biol Chem **257**(21): 12553-8.
- Barhanin, J., D. Pauron, et al. (1984). "New scorpion toxins with a very high affinity for Na⁺ channels. Biochemical characterization and use for the purification of Na⁺ channels." J Physiol (Paris) **79**(4): 304-8.
- Bezanilla, F. and C. M. Armstrong (1974). "Gating currents of the sodium channels: three ways to block them." Science **183**(126): 753-4.
- Carbone, E., E. Wanke, et al. (1982). "Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin." Nature **296**(5852): 90-1.
- Catterall, W. A. (1980). "Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes." Annu Rev Pharmacol Toxicol **20**: 15-43.
- Catterall, W. A. (1981). "Localization of sodium channels in cultured neural cells." J Neurosci **1**(7): 777-83.
- Catterall, W. A. (1984). "The molecular basis of neuronal excitability." Science **223**(4637): 653-61.
- Catterall, W. A. (1992). "Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels." Physiol Rev **72**(4 Suppl): S15-48.
- Catterall, W. A. (2000). "From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels." Neuron **26**(1): 13-25.
- Catterall, W. A., C. S. Morrow, et al. (1979). "Neurotoxin binding to receptor sites associated with voltage-sensitive sodium channels in intact, lysed, and detergent-solubilized brain membranes." J Biol Chem **254**(22): 11379-87.

-
- Catterall, W. A., R. Ray, et al. (1976). "Membrane potential dependent binding of scorpion toxin to action potential Na⁺ ionophore." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(8): 2682-6.
- Cestele, S. and W. A. Catterall (2000). "Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels." Biochimie **82**(9-10): 883-92.
- Chen, Y., L. Deng, et al. (2003). "Formation of an endophilin-Ca²⁺ channel complex is critical for clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis." Cell **115**(1): 37-48.
- Couraud, F., E. Jover, et al. (1982). "Two types of scorpion receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel." Toxicon **20**(1): 9-16.
- Couraud, F., H. Rochat, et al. (1978). "Binding of scorpion and sea anemone neurotoxins to a common site related to the action potential Na⁺ ionophore in neuroblastoma cells." Biochem Biophys Res Commun **83**(4): 1525-30.
- Dargent, B. and F. Couraud (1990). "Down-regulation of voltage-dependent sodium channels initiated by sodium influx in developing neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5907-11.
- Dargent, B., F. Jullien, et al. (1995). "Internalization of voltage-dependent sodium channels in fetal rat brain neurons: a study of the regulation of endocytosis." J Neurochem **65**(1): 407-13.
- DeBin, J. A., J. E. Maggio, et al. (1993). "Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion." Am J Physiol **264**(2 Pt 1): C361-9.
- Dunn, W. A., A. L. Hubbard, et al. (1980). "Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytotic vesicles and lysosomes during heterophagy of 125I-asialofetuin by the perfused rat liver." J Biol Chem **255**(12): 5971-8.
- Garcia, M. L., Y. Gao, et al. (2001). "Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure." Toxicon **39**(6): 739-48.
- Garrido, J. J., F. Fernandes, et al. (2003). "Dynamic compartmentalization of the voltage-gated sodium channels in axons." Biol Cell **95**(7): 437-45.
-

-
- Gekle, M., S. Mildenerger, et al. (1995). "Endosomal alkalization reduces J_{max} and K_m of albumin receptor-mediated endocytosis in OK cells." Am J Physiol **268**(5 Pt 2): F899-906.
- Gellens, M. E., A. L. George, Jr., et al. (1992). "Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(2): 554-8.
- Glebov, O. O., N. A. Bright, et al. (2006). "Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells." Nat Cell Biol **8**(1): 46-54.
- Goldin, A. L. (2001). "Resurgence of sodium channel research." Annu Rev Physiol **63**: 871-94.
- Gomez, M. V., M. E. Dai, et al. (1973). "Effect of scorpion venom, tityustoxin, on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain." J Neurochem **20**(4): 1051-61.
- Gomez, M. V. and C. R. Diniz (1966). "Separation of toxic components from the brazillian scorpion *Tityus serrulatus* venom." Mem Inst Butantan **33**(3): 899-902.
- Gomez, M. V., C. R. Diniz, et al. (1975). "A comparison of the effects of scorpion venom tityustoxin and ouabain on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain." J Neurochem **24**(2): 331-6.
- Habich, C., K. Baumgart, et al. (2002). "The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins." J Immunol **168**(2): 569-76.
- Hallaq, H., Z. Yang, et al. (2006). "Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells." Cardiovasc Res **72**(2): 250-61.
- Hasson, A., M. Fainzilber, et al. (1993). "Alteration of sodium currents by new peptide toxins from the venom of a molluscivorous *Conus* snail." Eur J Neurosci **5**(1): 56-64.
- Henriques, M. C. and M. V. Gomez (1981). "The effect of scorpion venom tityustoxin on the uptake of calcium in synaptosomes." Brain Res Bull **7**(3): 255-9.
-

-
- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*." J Physiol **116**(4): 497-506.
- Isom, L. L., K. S. De Jongh, et al. (1992). "Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel." Science **256**(5058): 839-42.
- Isom, L. L., D. S. Ragsdale, et al. (1995). "Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif." Cell **83**(3): 433-42.
- Isom, L. L., T. Scheuer, et al. (1995). "Functional co-expression of the beta 1 and type IIA alpha subunits of sodium channels in a mammalian cell line." J Biol Chem **270**(7): 3306-12.
- Ito, M., H. Nagafuji, et al. (2002). "Autosomal dominant epilepsy with febrile seizures plus with missense mutations of the (Na⁺)-channel alpha 1 subunit gene, SCN1A." Epilepsy Res **48**(1-2): 15-23.
- Keynes, R. D. and E. Rojas (1974). "Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon." J Physiol **239**(2): 393-434.
- Kharrat, R., H. Darbon, et al. (1989). "Structure/activity relationships of scorpion alpha-toxins. Multiple residues contribute to the interaction with receptors." Eur J Biochem **181**(2): 381-90.
- Kim, J., S. C. Jung, et al. (2007). "Regulation of dendritic excitability by activity-dependent trafficking of the A-type K⁺ channel subunit Kv4.2 in hippocampal neurons." Neuron **54**(6): 933-47.
- Kirsch, G. E., A. Skattebol, et al. (1989). "Modification of Na channel gating by an alpha scorpion toxin from *Tityus serrulatus*." J Gen Physiol **93**(1): 67-83.
- Krafte, D. S. and A. W. Bannon (2008). "Sodium channels and nociception: recent concepts and therapeutic opportunities." Curr Opin Pharmacol **8**(1): 50-6.
- Kragh-Hansen, U. (1981). "Molecular aspects of ligand binding to serum albumin." Pharmacol Rev **33**(1): 17-53.

-
- Lazdunski, M., C. Frelin, et al. (1986). "Polypeptide toxins as tools to study voltage-sensitive Na⁺ channels." Ann N Y Acad Sci **479**: 204-20.
- Lombet, A., J. N. Bidard, et al. (1987). "Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel." FEBS Lett **219**(2): 355-9.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Marban, E., T. Yamagishi, et al. (1998). "Structure and function of voltage-gated sodium channels." J Physiol **508 (Pt 3)**: 647-57.
- Massensini, A. R., T. Moraes-Santos, et al. (1998). "Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i." Neuropharmacology **37**(3): 289-97.
- Massensini, A. R., J. Suckling, et al. (2002). "Tracking sodium channels in live cells: confocal imaging using fluorescently labeled toxins." J Neurosci Methods **116**(2): 189-96.
- Monici, M. (2005). "Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications." Biotechnol Annu Rev **11**: 227-56.
- Moss, J., N. B. Thoa, et al. (1974). "On the mechanism of scorpion toxin-induced release of norepinephrine from peripheral adrenergic neurons." J Pharmacol Exp Ther **190**(1): 39-48.
- Narahashi, T. (2008). "Tetrodotoxin: a brief history." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **84**(5): 147-54.
- Nicholls, D. G., T. S. Sihra, et al. (1987). "Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry." J Neurochem **49**(1): 50-7.
- Nichols, B. J. (2002). "A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex." Nat Cell Biol **4**(5): 374-8.

-
- Noda, M., T. Ikeda, et al. (1986). "Expression of functional sodium channels from cloned cDNA." Nature **322**(6082): 826-8.
- Nusser, Z. (2009). "Variability in the subcellular distribution of ion channels increases neuronal diversity." Trends Neurosci **32**(5): 267-74.
- Paillart, C., J. L. Boudier, et al. (1996). "Activity-induced internalization and rapid degradation of sodium channels in cultured fetal neurons." J Cell Biol **134**(2): 499-509.
- Pauron, D., J. Barhanin, et al. (1985). "The voltage-dependent Na⁺ channel of insect nervous system identified by receptor sites for tetrodotoxin, and scorpion and sea anemone toxins." Biochem Biophys Res Commun **131**(3): 1226-33.
- Raman, I. M., L. K. Sprunger, et al. (1997). "Altered subthreshold sodium currents and disrupted firing patterns in Purkinje neurons of Scn8a mutant mice." Neuron **19**(4): 881-91.
- Ribeiro, A. M. and M. V. Gomez (1986). "The effect of calmodulin inhibitors on the release of acetylcholine and protein phosphorylation induced by tityustoxin, K⁺ and ouabain." Brain Res Bull **16**(5): 673-80.
- Romano-Silva, M. A., R. Ribeiro-Santos, et al. (1994). "Tityustoxin-mediated Na⁺ influx is more efficient than KCl depolarisation in promoting Ca²⁺-dependent glutamate release from synaptosomes." Neurosci Lett **169**(1-2): 90-2.
- Sampaio, S. V., C. J. Laure, et al. (1983). "Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*." Toxicon **21**(2): 265-77.
- Schiavo, G., M. Matteoli, et al. (2000). "Neurotoxins affecting neuroexocytosis." Physiol Rev **80**(2): 717-66.
- Silveira, N. P., T. Moraes-Santos, et al. (1991). "Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and one of its purified toxins (toxin gamma) on the isolated guinea-pig heart." Comp Biochem Physiol C **98**(2-3): 329-36.

-
- Toledo, D. and A. G. Neves (1976). "Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*." Comp Biochem Physiol B **55**(2): 249-53.
- Vacher, H., D. P. Mohapatra, et al. (2008). "Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons." Physiol Rev **88**(4): 1407-47.
- Valdivia, H. H., M. S. Kirby, et al. (1992). "Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel of skeletal and cardiac muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 12185-9.
- Vijverberg, H. P., D. Pauron, et al. (1984). "The effect of *Tityus serrulatus* scorpion toxin gamma on Na channels in neuroblastoma cells." Pflugers Arch **401**(3): 297-303.
- Whitaker, W. R., R. L. Faull, et al. (2001). "Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain." Brain Res Mol Brain Res **88**(1-2): 37-53.
- Yu, F. H. and W. A. Catterall (2003). "Overview of the voltage-gated sodium channel family." Genome Biol **4**(3): 207.

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](#)