

Célio José de Castro Junior

MECANISMOS MOLECULARES DAS ω -TOXINAS DA ARANHA *Phoneutria nigriventer*: PAPEL NA SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO EM VIAS NOCICEPTIVAS

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina – INCT Medicina Molecular

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular

**BELO HORIZONTE
2011**

Célio José de Castro Junior

MECANISMOS MOLECULARES DAS ω -TOXINAS DA ARANHA *Phoneutria nigriventer*: PAPEL NA SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO EM VIAS NOCICEPTIVAS

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular da Faculdade de medicina, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Marcus Vinícius Gomez

**BELO HORIZONTE
2011**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas; no Laboratório de Neurociências, Departamento de Saúde Mental da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; e no Lipscombe Lab, Departamento de Neurociências, Brown University, Providence-RI, EUA; com o auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Pronex-MG;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT)
- Instituto do Milênio;
- Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT) – Medicina Molecular.
- National Institute of Health (NIH).

“...porque o conhecimento para residir de fato no indivíduo, primeiro deve passar pela emoção. Quando ele passa pela emoção e se aninha na inteligência, a gente não esquece nunca mais.”

Bartolomeu Campos de Queiroz

“...the fruits of your success will be in direct ratio to the honesty and sincerity of your own effort; in keeping your own records, doing your own thinking, and reaching your own conclusions.”

Jesse Livermore

Agradecimentos

Maior dos agradecimentos ao mestre Professor Marcus Vinícius Gomez, pela nobre oportunidade de ser seu aluno, pelas incontáveis e sólidas lições; e pelo incomparável exemplo de força e de amor à ciência e ao trabalho.

Ao professor Dawidson Gomes, pelo exemplo, pelos conselhos e pela amizade.

À Dra. Diane Lipscombe, pela agradável acolhida e essencial suporte em seu laboratório e pelo grande exemplo de cientista e de pessoa.

Aos professores Cristina Guatimosin, Marco Prado, e Juliano Ferreira, por serem fonte de inspiração científica, pelo exemplo, conselhos e discussões científicas que tanto contribuíram para este trabalho.

À minha mãe, pelo mais puro amor e pelo exemplo de dignidade e luta. Aos meus irmãos Lílian e Fabrício, pela alegria e companheirismo constantes. Ao meu pai, exemplo de força, de trabalho e de determinação.

À Letícia, pelo amor, pela confiança, compreensão, carinho e companheirismo. Tornastes tudo muito mais prazeroso e ainda mais justificável.

Aos amigos: Bráulio, Xavier e Ana Cristina, pela amizade, pela alegria e pelos bons momentos.

Às amigas: Danuza, Alessandra, Luciene, Nancy, Juliana, Jomara, Geresa e Julie, por toda ajuda, pela alegria e bons momentos.

Aos amigos da antiga Farmaco: Fabiana, Cris Martins, Cris Menezes, Prof. Helton Reis, Magda, Bruno Resende, Melissa, Vinícius Magalhães, Bruno Leles, Adriane, Patrícia, Bento João, Ernani, Diogo, Ivana e Iacy, por toda ajuda e pela prazerosa convivência durante esses anos.

Aos amigos do Laboratório de Neurociências: Alexandre Barros, Gabriel, Alexandre Magno, Vitor, Patrícia, Karen, Daniela Valadão, Simone, Priscila, Rafael e Mauro; pela agradável convivência e pela ajuda.

Aos amigos do Lipscombe Lab: Arturo Andrade, Sylvia Genome, Spiro Marangoudakis, Kiauntee Munrae, Summer Ellen, Raquel, Cecilia Philips, Tomas Helton e Kristin Webster, pela acolhida, pelas lições, pelos grandes momentos e por toda a ajuda durante o estágio Sandwich.

Aos alunos de iniciação: Flávia Laje, Flávio Zambelli, Daniela Gontijo e Ananda, pela inestimável ajuda e pela inevitável amizade.

À UFMG pelo ensino gratuito e de qualidade, e ao CNPq por financiar a execução desse trabalho e por fomentar a pós-graduação em nosso país.

Aos animais utilizados na experimentação, um especial agradecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS E TABELA.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dor	2
1.2 Mecanismos neurais da dor.....	3
1.3 Nociceptores.....	6
1.4 Canais iônicos e nocicepção	10
1.5 Canais iônicos como alvos de novas substâncias analgésicas	12
1.6 Splicing alternativo de canais de cálcio tipo-N e nocicepção.....	15
1.7 Phoneutria nigriventer	19
1.8 Farmacologia das toxinas purificadas do veneno da Phoneutria nigriventer.....	20
1.9 Efeito antinociceptivo das ω -phonetoxinas	23
2 OBJETIVO	26
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Toxinas e Drogas	29
3.2 Animais.....	29
3.3 Cultura de neurônios de DRGs	29
3.3.1 Soluções	29
3.3.2 Superfícies de cultura	30
3.3.3 Dissecção.....	30
3.3.4 Dissociação.....	31
3.3.5 Plaqueamento	31
3.4 Inflamação crônica induzida por CFA.....	32
3.5 Imagens de cálcio em DRGNs	32

3.5.1	Marcação com Fluo-4	32
3.5.2	Imagens de Cálcio por microscopia confocal	32
3.6	Imagens de cálcio em células HEK293VR1	33
3.7	Expressão transiente de canais Cav2.2 em células TsA201	36
3.8	Preparação de cultura de neurônios DRGs em camundodos bb.....	36
3.9	Registros eletrofisiológicos	37
4	RESULTADOS.....	38
4.1	Medidas dos níveis de Ca²⁺ em DRGs.....	39
4.2	Efeito do cádmio sobre aumento dos níveis de cálcio em DRGs induzido por KCl.....	42
4.3	Efeito da ω-conotoxina MVIIA sobre aumento dos níveis de cálcio em DRGs induzido por KCl	44
4.4	Efeito das toxinas da fração Tx3 do veneno da P.nigriveneter sobre aumento dos níveis de cálcio em DRGs induzido por KCl	46
4.5	Phα1β inibe transientes de cálcio induzidos por KCl preferencialmente em DRGNs de pequeno diâmetro	50
4.6	Efeito da Phα1β e do SB366791 nos transientes de cálcio induzidos por capsaicina em DRGNs	52
4.7	Efeito da Phα1β nos transientes de cálcio induzidos por capsaicina em DRGs de animais tratados com CFA	54
4.8	Efeito das ω-phonetoxinas sobre o transiente da [Ca²⁺]_i induzido por capsaicina em células HEK293 transfectadas com o receptor vanilóide-1	57
4.9	Ação das toxinas..... Phα1β e Tx3-4 sobre isoformas de canais tipo-N contendo diferentes variantes de splicing do RNA mensageiro	61
4.9.1	Phα1β e Tx3-4 inibem canais tipo-N impedindo bloqueio adicional da ω-conotoxina GVIA... 61	
4.9.2	Tx3-4 exerce bloqueio mais significativo em canais tipo-N contendo 37a..... 64	
4.9.3	Relação dose-resposta do efeito inibitório de Phα 1β e Tx3-4 sobre 37a e 37b	68
4.9.4	Efeito da Tx3-4 sobre correntes de cálcio em DRG's de camundongos sem a isoforma 37a 71	
5	DISCUSSÃO	73
5.1	Estudos das medidas dos níveis de [Ca²⁺]_i em DRG`s.....	74
5.2	ω-toxinas da P. nigriventer e splicing alternativo de Cav2.2	81
6	CONCLUSÕES	85
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8	ANEXOS	98

LISTA DE ABREVIATURAS

- ASIC's – Canais iônicos sensíveis a ácido
- CaCl₂ – Cloreto de cálcio
- CFA – Adjuvante completo de Freund
- CCSV's – Canais de cálcio sensíveis a voltagem
- CGRP – Proteína relacionada ao gene da calcitonina
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Pesquisa
- CsCl₂ – Cloreto de céσιο
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO – Dimetil sulfóxido
- DRGs – Gânglios da raiz dorsal
- DRGNs – Neurônios dos gânglios da raiz dorsal.
- EDTA – Ácido etileno dietil tetraacético
- EGTA - Ácido etileno glicol tetraacético
- EPM – Erro padrão médio
- FUNED – Fundação Ezequiel Dias
- HBSS – Solução Hanks Salina Balanceada
- HEK293 – Células de rim embrionário humano
- HPLC – Cromatografia líquida de alta performance
- Hs - Horas
- KCl – Cloreto de potássio
- KRH – Krebs Ringer Hepes
- Mg-ATP – Adenosina trifosfato sal de magnésio
- Min – minuto
- NGF – Fator de crescimento do nervo
- PBS – Solução fosfato tamponada
- RT-PCR – Reação da polimerase em cadeia em tempo real
- SFB – Soro fetal bovino inativado
- TEA-Cl - Cloreto de tetraetilamônio
- TEA-OH – Hidróxido de tetraetilamônio
- TRPV1 – Receptor vanilóide de potencial transiente-1
- VRL1 – Receptor vanilóide de potencial transiente-2

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Representação esquemática dos diferentes tipos de neurônios sensoriais	4
Figura 2: Componentes operacionais do nociceptor	7
Figura 3: Nociceptores são polimodais	9
Figura 4: Canais iônicos expressos em neurônios sensoriais presumivelmente implicados na nocicepção	10
Figura 5: Sequência de aminoácidos do peptídeo ω -conotoxina MVIIA	13
Figura 6: <i>Splicing</i> alternativo da região C-terminal do canal tipo N	18
Figura 7: Aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>	20
Figura 8: Sistema de perfusão acoplado ao microscópio confocal	35
Figura 9: Neurônios do gânglio da raiz dorsal marcados com Fluo-4	40
Figura 10: Aumento dos níveis de cálcio induzido por KCl em DRGs	41
Figura 11: Efeito do cádmio sobre os níveis de cálcio induzido por KCl em DRGs	43
Figura 12: Efeito da ω -conotoxina MVIIA sobre o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por KCl em DRGs	45
Figura 13: Efeito das Toxinas Tx3-3 e Tx3-5 sobre os níveis de cálcio induzido por KCl em DRGs	47
Figura 14: Efeito da toxina Tx3-4 nos níveis de cálcio induzidos por KCl em DRGs	48
Figura 15: Efeito da toxina Ph α 1 β 1 nos níveis de cálcio induzidos por KCl em DRGs	49
Figura 16: Efeito da Ph α 1 β sobre os transientes de cálcio induzidos por KCl em neurônios grandes e pequenos	51
Figura 17: Ph α 1 β e SB366791 reduzem os transientes de Ca ²⁺ induzidos por capsaicina em DRGs	53
Figura 18: Efeitos da Ph α 1 β sobre os transientes de cálcio induzidos por capsaicina em DRGs após inflamação crônica induzida por CFA	56
Figura 19: Variação dos níveis de cálcio em Células HEK293VR1 em resposta à capsaicina	59
Figura 20: Efeito das ω -phonetoxinas nos transientes da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por capsaicina em células HEK293VR1	60
Figura 21: ω -phonetoxinas inibem correntes Tipo-N impedindo bloqueio adicional da ω -conotoxina GVIA	63
Figura 22: Ação diferencial da Tx3-4 sobre as isoformas 37a e 37b de <i>splicing</i> alternativo	65
Figura 23: Cinética de inibição da Tx3-4 sobre as isoformas 37a e 37b dos canais de cálcio tipo-N	67
Figura 24: Relações dose-resposta do efeito inibitório da ω -phonetoxina Ph α 1 β sobre canais de cálcio tipo-N	69

Figura 25: Relações dose-resposta do efeito inibitório da ω -pho-netoxina Tx3-4 sobre canais de cálcio tipo-N	70
Figura 26: Tx3-4 inibe diferencialmente correntes de cálcio em DRG's sem a isoforma 37a de canais tipo-N	72
Tabela 1: Ação da Ph α 1 β sobre CCSV's	24

RESUMO

A propagação ascendente dos sinais dolorosos envolve trocas iônicas na membrana plasmática das células nervosas em resposta ao potencial de ação. Íons cálcio penetram nos terminais sinápticos, principalmente por canais de cálcio sensíveis a voltagem, disparando a excitação em resposta aos potenciais de ação, culminando com a comunicação neuronal e, portanto, com propagação dos sinais sensoriais. A toxina Ph α 1 β , isolada do veneno da aranha *P. nigriventer* é potente bloqueadora de canais de cálcio sensíveis a voltagem com especificidade para canais Tipo-N, possuindo ação antinociceptiva em modelos de dor aguda e crônica em ratos. Essa e outras toxinas bloqueadoras de canais de cálcio sensíveis a voltagem obtidas do veneno da *P. nigriventer* também vem sendo investigadas quanto ao seu potencial antinociceptivo, mas o mecanismos dessas toxinas sobre a sinalização de cálcio em nociceptores ainda não é conhecido.

O objetivo desse trabalho foi estudar como as principais ω -toxinas da *P.nigriventer* afetam as mudanças dos níveis de Ca²⁺ em nociceptores em resposta a um estímulo, com foco na sinalização de cálcio mediada por canais de cálcio sensíveis a voltagem Tipo-N e no receptor vanilóide tipo-1. Estudamos também como Ph α 1 β e Tx3-4 modulam isoformas de canais tipo-N codificadas por diferentes variantes de *splicing* alternativo do RNAm.

Tx3-4 e Ph α 1 β inibiram o aumento dos níveis de Ca²⁺, induzido por KCl, em neurônios DRG's dissociados, sendo a Tx3-4 mais eficaz dentre as ω -phonetoxinas testadas. Entretanto, o bloqueio da Ph α 1 β foi mais eficaz em neurônios de menor diâmetro. Além disso, a Ph α 1 β inibiu a elevação da [Ca²⁺]_i induzida por capsaicina, efeito que foi mais pronunciado em DRG's submetidos a processo inflamatório prévio. Em células transfectadas com receptor vanilóide, a Ph α 1 β exerceu bloqueio modesto mas significativo da elevação da [Ca²⁺]_i induzida por capsaicina. A Tx3-4 exerce bloqueio mais significativo em canais tipo-N contendo o éxon 37a ao invés de 37b.

Juntos, esses dados mostram que as ω -phonetoxinas inibem a sinalização de cálcio em nociceptores. Além disso, mostramos, pela primeira vez, que isoformas de canais iônicos contendo diferentes variantes de *splicing*, podem ter identidades farmacológicas distintas.

ABSTRACT

Propagation of ascending painful signals involves ionic exchanges throughout the plasma membrane of nerve cells in response to an action potential. Calcium ions penetrate the cell, mainly through voltage gated calcium channels, triggering exocytosis in cells in response to the action potentials, culminating with neuronal communication and thus, propagation of the sensory signals. The toxin Ph α 1 β , isolated from the venom of the spider *P. nigriventer*, is a potent blocker of N-type voltage gated calcium channels and processes antinociceptive action in acute and chronic pain models in rats. Ph α 1 β and other toxins from *P. nigriventer* venom are being investigated regarding to its antinociceptive potentials, however the precise mechanism of such toxins on the calcium signaling in nociceptors is still unknown.

The aim of this work was to study how the main ω -toxins from *P. nigriventer* venom affect the changes in intracellular Ca²⁺ levels in nociceptors in response to stimulus, focusing on calcium signaling mediated by N-type VGCC's as well as in the vanilloid-1 receptor. We also aimed to study how Ph α 1 β and Tx3-4 modulates the function of isoforms of N-Type channels codified by variants of alternative splicing of mRNA.

Tx3-4 and Ph α 1 β inhibited KCl-induced increase in Ca²⁺ levels from dissociated DRG neurons, with Tx3-4 being more efficient between other tested ω -phonetoxins, in inhibiting such response. However, Ph α 1 β blockage was more efficient in small diameter neurons. Furthermore, Ph α 1 β inhibits capsaicin-induced calcium increase; such effect was more pronounced in DRGs from rats previously submitted to an inflammatory process. At cells transfected with the vanilloid receptor, Ph α 1 β slightly blocked the [Ca²⁺]_i elevation induced by capsaicin. Tx3-4 exerts stronger blockage in N-Type channels that contains exon 37a rather than 37b containing ones.

Together these data shows that ω -phonetoxins inhibits calcium signaling in nociceptors. Moreover, we have shown, for the first time that isoforms of ionic channels containing distinct splicing variants might have differential pharmacological identities.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

A dor é uma importante resposta fisiológica designada a nos proteger de agressões do meio. Entretanto, numerosas condições patológicas tais como diabetes, infecções virais, danos nos nervos e inflamações podem levar ao surgimento de dores crônicas e persistentes que aparentemente não servem como um propósito útil além de serem frequentemente refratárias às opções de tratamento atualmente disponíveis (Porreca et al., 2002). A dor clínica é um sério problema de saúde pública e o tratamento do sofrimento relacionado à dor requer conhecimento sobre como os sinais dolorosos são inicialmente interpretados e subsequentemente transmitidos e perpetuados.

A dor pode ser considerada como um sintoma ou manifestação de uma doença ou afecção orgânica, mas também pode vir a constituir um quadro clínico mais complexo. Existem diferentes maneiras de se classificar a dor. Considerando a duração da sua manifestação, ela pode se apresentar nas formas transitória, aguda e crônica. Na dor transitória, a ativação dos nociceptores acontece na ausência de qualquer dano tecidual, e contribui para proteger o organismo de potenciais danos físicos causados pelo ambiente ou por estresse de tecidos corporais. Contudo, a dor aguda é uma resposta causada por uma lesão de tecido com conseqüente ativação dos nociceptores no local da lesão, se caracteriza por ser de curta duração, desaparecendo até mesmo antes da cura do dano tecidual. Além disso, a dor aguda é geralmente de fácil identificação e tratamento, possuindo também caráter protetor (Loeser and Melzack, 1999; Brennan et al., 2007). Já a dor crônica é causada por uma lesão tecidual ou doença, e geralmente ultrapassa o tempo de recuperação do organismo, ou seja, este tipo de dor pode não desaparecer mesmo quando o trauma inicial (lesão) foi resolvido. A dor crônica se estende por meses ou anos, é de difícil identificação, sendo uma patologia que geralmente necessita de tratamento complexo (Brennan et al., 2007). Quanto mais persistente for o processo doloroso, mais difícil se torna o tratamento do quadro patológico (Besson, 1999).

Quanto a sua origem, existem quatro tipos principais de dor: 1) a “dor nociceptiva”, que se origina devido à estimulação excessiva dos nociceptores

localizados na pele, vísceras e outros órgãos; 2) a “dor neurogênica”, que reflete o dano de tecido neuronal na periferia ou no sistema nervoso central; 3) a “dor neuropática”, que acontece devido a uma disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos e 4) a “dor psicogênica”, que não é oriunda de uma fonte somática identificável e que pode refletir fatores psicológicos (Millan, 1999).

As profundas diferenças entre dor aguda e dor crônica enfatizam o fato de que a dor não é gerada por um sistema rígido e imutável, mas ao contrário, resulta do recrutamento de moléculas e circuitos dotados de alta plasticidade, fazendo com que o tratamento adequado da dor se norteie no conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares da nocicepção. As bases neuroanatômicas e moleculares da plasticidade nas vias da dor são o alvo dos estudos correntes nesse campo. Como consequência, essas novas informações vem identificando uma gama de potenciais novos alvos terapêuticos para o tratamento da dor (Basbaum et al., 2009).

1.2 Mecanismos neurais da dor

A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas periféricas e centrais desde a pele, vísceras e outros tecidos até o córtex cerebral. Um nervo periférico consiste em axônios de três diferentes tipos de neurônios: sensoriais primários, motores e pós-ganglionares simpáticos. As terminações livres de fibras aferentes primárias sensíveis a estímulos nocivos são chamados de nociceptores (ou receptores da dor) (Millan, 1999).

A sensibilização dos nociceptores se deve a diferentes estímulos, tais como mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão tecidual (estímulo nocivo mecânico), hipóxia ou lesão tecidual seguida de inflamação (estímulo nocivo químico) (Julius and Basbaum, 2001). Esses estímulos nocivos ativam fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e $A\delta$. Além destas, outro tipo de fibra que pode estar envolvida na transmissão do estímulo sensorial são as fibras do tipo $A\beta$, que normalmente respondem a estímulos inócuos aplicados à pele, porém em condições especiais são capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso (30-100 m/s). As fibras $A\beta$ são mielinizadas e de grande diâmetro. Já as fibras do tipo $A\delta$, de condução intermediária (12 a 30 m/s), são pobremente

mielinizadas, enquanto as fibras do tipo C são não mielinizadas e transmitem o estímulo nociceptivo de forma mais lenta (0,5 a 2,0m/s) (Figura 1) (Julius e Basbaum, 2001).

Em grande parte do organismo as fibras aferentes primárias C e A δ transmitem a informação nociceptiva da periferia até o corno dorsal da medula espinhal, e suas terminações encontram-se principalmente nas lâminas I (zona marginal) e lâmina II (substância gelatinosa). No corno dorsal da medula espinhal neurônios de primeira ordem fazem sinapse com neurônios de segunda ordem, que formam as vias ascendentes.

Tipos de fibras	A α e A β	A δ (I e II)	C
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10 μ m	2-6 μ m	0,4-1,2 μ m
Velocidade de condução	30-100 m/s	1,2-30 m/s	0,5-2 m/s
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Nocicepção (térmica, mecânica e química)	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

Figura 1 Representação esquemática dos diferentes tipos de neurônio sensoriais primários responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC (Adaptado de Julius e Basbaum, 2001).

Os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender ao trato espinotalâmico, projetando seus corpos celulares ao tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna do córtex somatosensor, onde a integração do estímulo nocivo ocorre, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior responsável pelo componente emocional da dor (Russo and Brose, 1998). O tálamo e o córtex são regiões finais da projeção das vias de nocicepção e são responsáveis por informar que existe sensação nociceptiva bem como informar a discriminação do tipo de sensação nociceptiva além de identificar, de forma pouco fiel, de onde provém.

Além dessa modulação ascendente, existe uma modulação descendente da nocicepção. As vias descendentes originam-se no tronco cerebral e outras estruturas como hipotálamo, córtex, tálamo, núcleo magno da rafe (NMR), substância cinzenta periaquedutal (PAG) e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (RVM), que exercem importante papel na integração e modulação das mensagens nociceptivas no corno dorsal da medula espinhal (Millan, 2002; Vanegas and Schaible, 2004). Os mecanismos descendentes modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas fibras aferentes primárias, bem como em neurônios intrínsecos do corno dorsal, como interneurônios excitatórios, interneurônios inibitórios e neurônios de projeção (Millan, 2002). Uma das descobertas mais interessantes a respeito do circuito modulatório da dor é que este pode tanto facilitar quanto inibir a transmissão nociceptiva (Julius and Basbaum, 2001; Porreca et al., 2002). Por exemplo, na RVM estão presentes dois tipos de neurônios, as chamadas células “liga” (*on*) e as células “desliga” (*off*), as quais estão envolvidas na modulação nociceptiva. É proposto que as células “liga” (*on*) medeiam a facilitação da condução de estímulos nociceptivos quando ativadas, e as células “desliga” (*off*) medeiam a inibição da transmissão nociceptiva, provocada pela estimulação da substância cinzenta periaquedutal (PAG). De maneira geral, a substância cinzenta periaquedutal deve excitar as células *off* e inibir as células *on* na medula rostroventromedial (Fields et al., 2006). Logo, o balanço entre a ativação dessas duas subpopulações de neurônios determina a resposta a um estímulo nociceptivo periférico. No entanto, em situações de dor persistente, alterações na neuroplasticidade podem resultar em uma estimulação facilitatória

sustentada, o que ocasiona respostas persistentes e exageradas à dor (Porreca et al., 2002).

Além da modulação descendente da informação nociceptiva envolver uma série de estruturas cerebrais, como mencionado anteriormente, os sistemas de neurotransmissores também estão envolvidos nesta conexão. Todos os neurotransmissores envolvidos na inibição descendente (tais como opióides endógenos, serotonina, noradrenalina) parecem inibir a excitação de neurônios de segunda ordem na presença de estímulo nocivo (Fields et al., 2006).

1.3 Nociceptores

Para o corpo lidar efetivamente contra o perigo, é imprescindível que se saiba sobre o perigo. É isso o que os nociceptores fazem. Esses neurônios sensoriais primários são especializados em detectar estímulos intensos e representam assim, a primeira linha de defesa contra qualquer potencial ameaça ou agressão do meio. Assim como todos os neurônios sensoriais primários, os nociceptores tem seus corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal ou no gânglio trigeminal, possuem um único axônio que se bifurca em dois ramos, um vai em direção a periferia e outro ramo chega no SNC onde faz sinapse com neurônios de segunda ordem (Woolf and Ma, 2007). Em consequência, um nociceptor tem 4 componentes funcionais principais: um terminal periférico, que é o transdutor dos estímulos externos e que inicia os potenciais de ação, o axônio, que conduz os potenciais de ação, o corpo celular que controla a integridade do neurônio e um terminal central que forma o elemento pré-sináptico que forma a 1ª sinapse da via sensorial no SNC (Figura 2).



Figura 2 Componentes operacionais do nociceptor (Adaptado de Woolf e Ma, 2007)

A perda de neurônios sensórios nociceptores em pacientes com neuropatia autonômica e sensorial hereditária Tipo-4, devido à mutações no receptor TrkA para o NGF (fator de crescimento do nervo) resulta numa falência da sobrevivência dos nociceptores no embrião (Verpoorten et al., 2006), produz uma hipossensibilidade à dor congênita e revela a importância dos nociceptores como um sistema de advertência e proteção contra as agressões do meio. Os indivíduos com essa mutação queimam e destroem suas línguas e lábios como resultado da não detecção de altas temperaturas, além de perderem as falanges distais dos dedos devido à não percepção da dor ao longo da vida. Outra indiferença congênita à dor mas sem a perda dos neurônios nociceptores foi recentemente observada devido à mutações por perda de função no gene SCN9A que codifica a subunidade alfa dos canais de sódio sensíveis a voltagem $Na_v1.7$ (Goldberg et al., 2007).

Todos os sistemas sensórios devem converter estímulos ambientais em sinais eletroquímicos. No caso da visão e olfato, os neurônios sensórios primários precisam detectar somente um tipo de estímulo (luz ou odores químicos, respectivamente) e para isso usam mecanismos bioquímicos convergentes para possibilitar essa transmissão (Figura 3). Nesse contexto a nocicepção é única, visto que os neurônios sensórios tem uma habilidade peculiar de detectar uma ampla modalidade de estímulos, tanto de natureza química como física. Os nociceptores precisam, portanto, ser equipados com um repertório diverso de sistemas transdutores (Figura 3). Os nociceptores também são únicos na capacidade e na extensão de suas propriedades receptivas as quais podem ser moduladas. Assim, nociceptores não apenas sinalizam uma dor aguda, mas também contribuem em

condições de dores patológicas persistentes que ocorrem diante de diversos tipos de danos, levando por exemplo à alodínia, situação na qual a dor é produzida por um estímulo inócuo (Basbaum and Woolf, 1999).

Diferentemente da visão, olfato ou tato, terminais nervosos sensoriais que detectam estímulos dolorosos não são localizados em estruturas anatômicas particulares, ao contrário, são dispersas por todo o corpo, innervando a pele, músculos, articulações e também órgãos internos. Um dos principais focos das pesquisas correntes sobre os nociceptores é elucidar as funções de marcadores-chave de superfície celular e também em atribuir funções fisiológicas à subpopulações molecularmente definidas de neurônios sensoriais (Basbaum and Woolf, 1999; Julius and Basbaum, 2001).

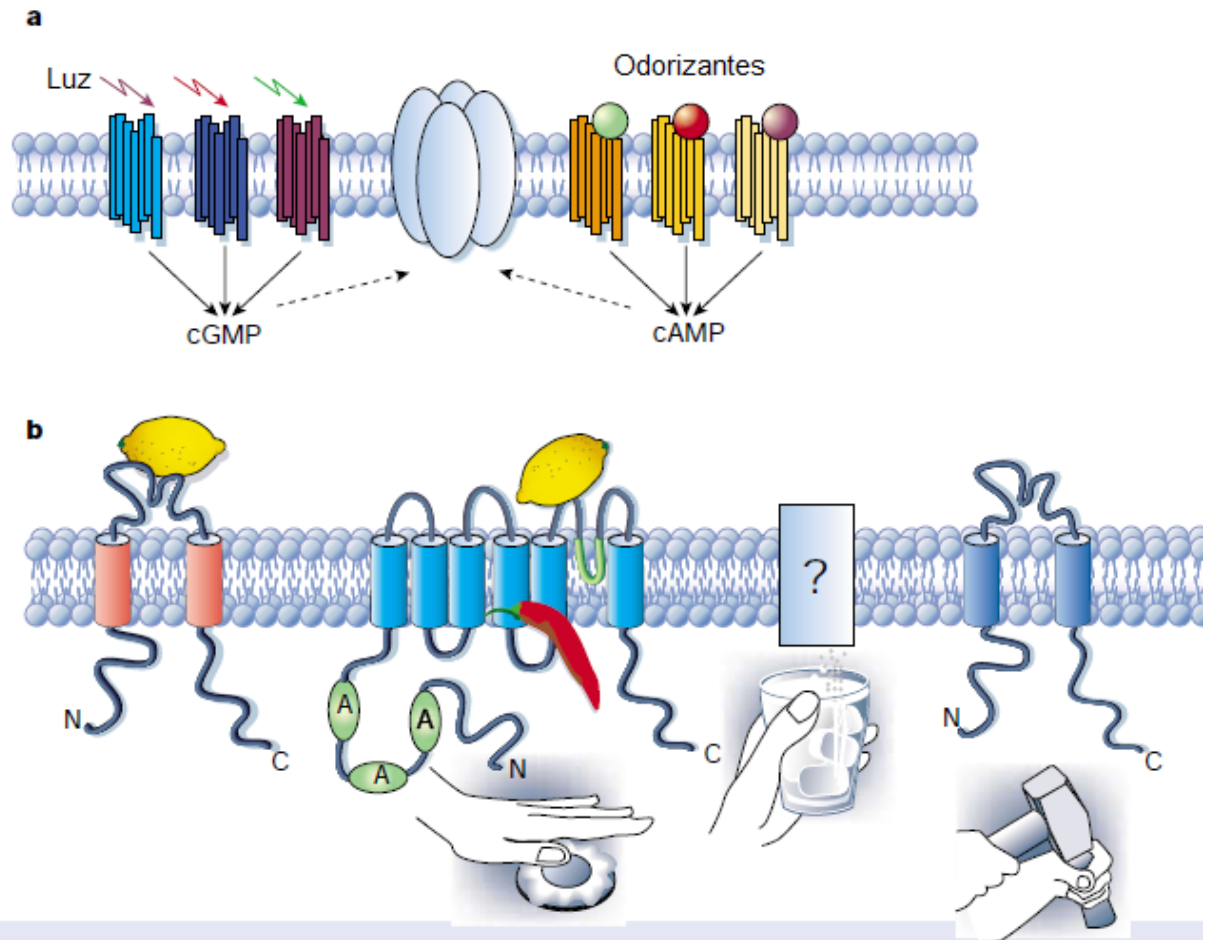


Figura 3 Nociceptores são polimodais. (A) Luz ou substâncias odoríferas são detectadas por vias convergentes nas quais receptores acoplados à proteína G modulam a produção de segundos mensageiros nucleotídicos cíclicos, os quais alteram então a excitabilidade de neurônios sensoriais por regularem a atividade de canais catiônicos. (B) Ao contrário, os nociceptores usam diferentes mecanismos de transdução de sinal para detectar estímulos físicos e químicos. Estudos recentes sugerem que membros da família dos canais TRP detectam o calor nóstico enquanto que TRPM8 e TRPA1 são transdutores moleculares do frio nóstico. Substâncias químicas nósticas como capsaicina ou ácido (prótons extracelulares) podem ser detectadas por um transdutor comum (TRPV1). Ao mesmo tempo, um único tipo de estímulo pode interagir com múltiplos tipos de detectores, por exemplo prótons que ativam não somente TRPV1 mas também ASICs, um tipo de receptor-canal iônico sensível à ácido (adaptado de Julius e Basbaum, 2001).

1.4 Canais iônicos e nocicepção

Uma vez que estímulos térmicos, mecânicos e químicos são detectados por aferentes primários, o evento excitatório deve iniciar um potencial de ação que irá culminar com a liberação de neurotransmissor. É aí que canais para sódio, cálcio e potássio, sensíveis a voltagem, exercem suas contribuições. Alguns subtipos de canais iônicos sensíveis a voltagem medeiam funções distintas ou são enriquecidos em neurônios somatosensórios comparados à outras regiões do sistema nervoso (McCleskey and Gold, 1999).

A ativação desses canais em neurônios sensórios é crítica para a geração dos sinais nociceptivos. Os principais canais responsáveis pelas correntes iônicas de entrada nas membranas dos nociceptores são os canais de sódio sensíveis a voltagem e canais de cálcio sensíveis a voltagem enquanto que as correntes de saída são mediadas principalmente por íons potássio. Além disso a ativação de canais de cátion não-seletivos também é responsável pela excitação em neurônios sensórios (Lee et al., 2005). Assim, a excitabilidade dos neurônios pode ser controlada e regulada pela expressão e modulação desses canais (Figura 4).

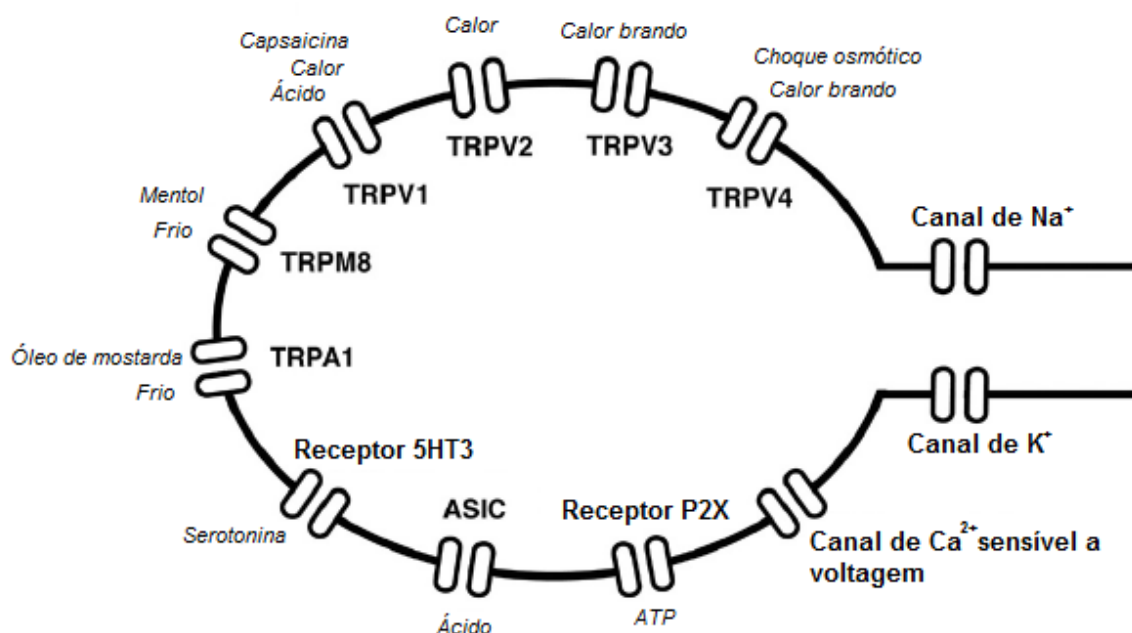


Figura 4 Canais iônicos expressos em neurônios sensórios presumivelmente implicados na nocicepção (Lee et al., 2005)

Os canais de sódio são responsáveis pela despolarização rápida no potencial de ação. Há evidências que alguns canais de sódio estão relacionados com a dor neuropática. As análises dos níveis de mRNA de subtipos de canais de sódio em DRGs revelam que os níveis de canais Nav1.3 estão aumentados após dano na medula espinhal (Kim et al., 2002). Além do mais, a expressão do canal de Na⁺ resistente à tetrodotoxina Na_v1.8 está subregulada em neurônios sensoriais após dano no nervo, enquanto estão regulados para cima em neurônios não-danificados mas sensibilizados (Novakovic et al., 1998). Esses dados sugerem que alguns tipos de canais de Na⁺ estão envolvidos na geração e manutenção da dor neuropática.

Os canais de cálcio sensíveis a voltagem (CCSV) exercem seu papel na transdução sensorial ao aumentarem a concentração de Ca²⁺ intracelular em resposta à despolarização. Em neurônios sensoriais, neurotransmissores nociceptivos como glutamato, substância P e CGRP são liberados após ativação de canais de Ca²⁺ tipo L, N e P/Q (Takahashi and Momiyama, 1993; Gruner and Silva, 1994; Evans et al., 1996). A subunidade α 1 (formadora do poro do canal) é a principal determinante da classificação dos CCSVs. Dez diferentes subunidades α 1 já foram descobertas e classificadas como L (Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4), P/Q (Cav2.1), N (Cav2.2), R (Cav2.3), e T (Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3) (Miller, 2001). Em neurônios sensoriais, canais de Ca²⁺ tipo-L parecem estar envolvidos na nocicepção já que a nifedipina, um bloqueador tipo-L, inibe a liberação de substância P induzida por inflamação (Vedder and Otten, 1991).

A diversidade dos canais de cálcio é importante no campo da dor uma vez que canais tipo-N são críticos para a neurotransmissão em neurônios sensoriais (Meir et al., 1999). Canais tipo-N medeiam as correntes de cálcio em neurônios sensoriais e seu bloqueio elimina virtualmente toda neurotransmissão nesses neurônios (Gruner and Silva, 1994). Outros achados que também contribuem para mostrar a importância dos canais tipo-N na nocicepção, mostram que esses canais são proporcionalmente mais expressos em neurônios sensoriais pequenos do que em grandes (Cardenas et al., 1995).

Outra importante classe de canais iônicos relacionados à transdução de sinais nociceptivos são os canais catiônicos não-seletivos TRP. Os canais TRP, inicialmente identificados pelo seu papel na fototransdução em *Drosophila*, constituem uma grande família e que exerce ampla variedade de funções

fisiológicas. A maioria dos canais TRP são canais catiônicos não-seletivos mas com permeabilidade variável ao Ca^{2+} . Em humanos, já foram identificados 28 diferentes genes TRP e agrupados em 6 famílias: TRPC, receptores vanilóides relacionados à TRP (TRPV), TRPs relacionados à melastatina, mucolipinas (TRPML), as policistinas (TRPP) e canais relacionados à proteína transmembrana anquirina (TRPA) (Gudermann and Flockerzi, 2005). Canais TRP tem sido encontrados em vários tipos celulares, incluindo neurônios sensoriais. Esses canais tem um importante papel na transmissão da sensação já que eles servem de sensores moleculares que detectam uma variedade de estímulos como tato, cheiros, audição, mecanossensação, termosensação e dor (Scott and Zuker, 1998; Minke and Cook, 2002).

1.5 Canais iônicos como alvos de novas substâncias analgésicas

O processamento e a propagação dos sinais dolorosos são dependentes e modulados por uma variedade de canais iônicos e receptores, dentre estes merece destaque os canais de cálcio sensíveis a voltagem (CCSV) (Julius and Basbaum, 2001). Canais de cálcio ativados por alta voltagem do tipo-N são altamente expressos em terminais nervosos pressinápticos onde eles se abrem em resposta a potenciais de ação e assim medeiam a entrada de cálcio na sinapse. Isso então dispara a liberação de vesículas sinápticas culminando com a ativação de neurônios espinotalâmicos. Um fato crítico do papel de canais tipo-N nas vias da dor é que camundongos knockout para canais tipo-N mostram limiares mais elevados para a percepção da dor (Saegusa et al., 2000). Além disso a ziconotida, um bloqueador de canal tipo-N, mostra eficácia clínica comprovada contra dor quando administrado via intratecal (Staats et al., 2004). Assim, canais tipo-N são considerados como alvos primários para o desenvolvimento de novos analgésicos.

Já é bem estabelecido que a injeção intratecal de peptídeos bloqueadores de CCSV tipo-N medeia respostas analgésicas comportamentais tanto em ratos como em humanos (Staats et al., 2004; Vieira et al., 2005). Desta feita, a ziconotida (derivado sintético da ω -conotoxina MVIIA – Figura 5) é usado clinicamente no tratamento da dor do câncer, entretanto, seu uso tem sido associado a vários efeitos colaterais incluindo descoordenação motora, hipotensão e perda de memória (Staats et al., 2004). A razão para esses efeitos pode incluir ações não seletivas da

ziconotida em alvos além dos canais tipo-N, ou talvez reações imunes aos peptídeos injetados, contudo, os mecanismos precisos ainda são incertos. Logo, a busca por inibidores peptídicos com janela terapêutica mais ampla continua.

A aprovação da forma sintética da ω -conotoxina MVIIA pelo FDA ofereceu dessa forma esperança para várias conotoxinas que estão sob constante investigação para seus potenciais terapêuticos e possivelmente uso clínico.

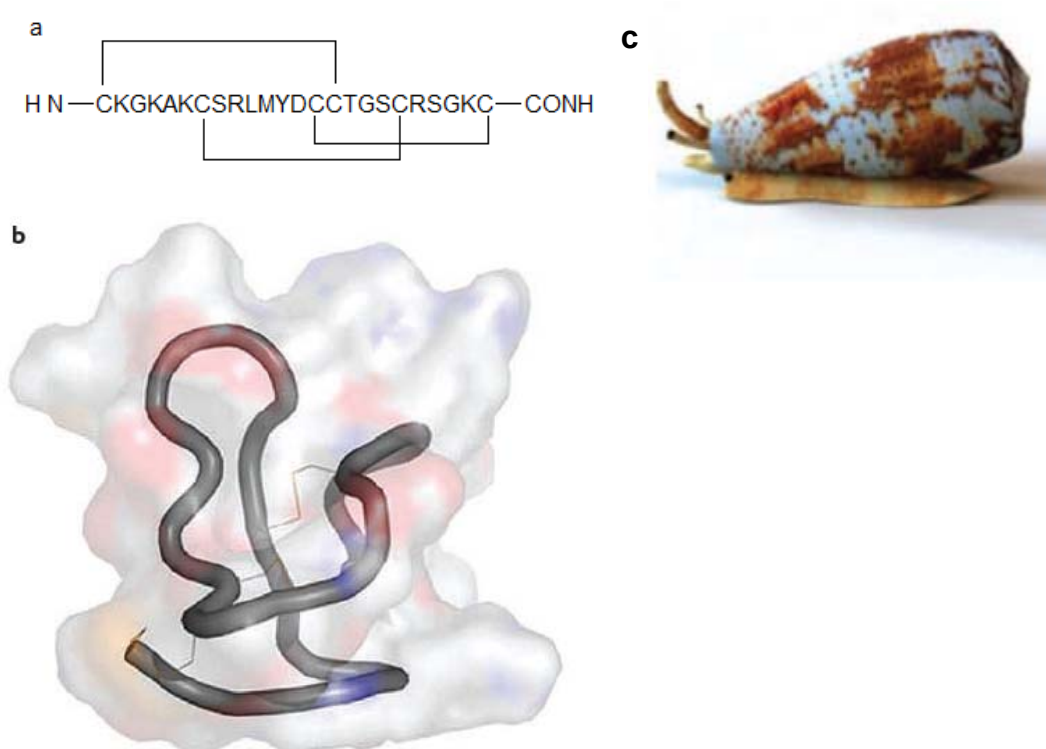


Figura 5 (a): Sequência de aminoácidos do peptídeo ω -conotoxina MVIIA (Ziconotida/Prialt/Elan pharmaceuticals). (b) Estrutura tridimensional da ω -conotoxina MVIIA. (c) Caramujo marinho *Conus magus*. A ω -conotoxina MVIIA é um polipeptídeo catiônico e contém uma sequência linear composta de 25 aminoácidos contendo 6 resíduos cisteína ligados por 3 pontes dissulfeto que estabilizam sua estrutura tridimensional. Em dezembro de 2004 a Elan recebeu aprovação do FDA para a ziconotida (em formulação de injeção intratecal). Adaptado de (Molinski et al., 2009).

Outra classe de receptores tipo canal iônico que têm despertado interesse dos pesquisadores como alvos na busca de novas substâncias analgésicas são os receptores TRPV. Embora a ativação de receptores TRP por exemplo da classe TRPV1 medeiam informações algésicas, o uso de capsaicina na forma creme tem sido descrito como eficaz em certas condições clínicas, por exemplo osteoartrite, neuropatia diabética e até psoríase (Zhang and Li Wan Po, 1994). Esse uso se justifica já que a ativação persistente de TRPV1 causa dessensibilização dos receptores e os terminais aferentes tornam-se silenciados ou ‘quimicamente denervados’. Por outro lado, dada a limitação de opções de formulação de agonistas TRPV1, vem sendo adotada a busca de antagonistas TRPV1 como estratégia desenvolvimento de novos fármacos analgésicos. Nesse contexto, Niiyama e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do SB366791, um potente e seletivo antagonista de receptores TRPV1 num modelo animal de dor induzida por câncer de medula óssea. Como resultado, Niiyama et al. mostraram que o SB366791 foi eficaz não apenas em inibir a nocicepção como também foi mais potente que a morfina, além de potencializar o efeito antinociceptivo da morfina quando administrados em conjunto (Niiyama et al., 2009). Outras substâncias sintéticas antagonistas TRPV1 vem sendo desenvolvidas e testadas em diferentes modelos de dor, algumas já se encontram em testes clínicos avançados. O SB-705498 foi efetivo contra a dor térmica induzida por irradiação UVB e na hiperalgesia induzida por capsaicina em humanos (Chizh et al., 2007). Já há estudos clínicos em fase II com esse antagonista sendo testado contra enxaqueca, dor dentária e síndrome do intestino irritável. Existem hoje, portanto, dados suficientes que sugerem que os antagonistas TRPV1, assim com antagonistas de canais de cálcio tipo-N, tem um futuro promissor no tratamento da dor clínica.

1.6 Splicing alternativo de canais de cálcio tipo-N e nocicepção

A maioria dos genes em células eucarióticas consistem de várias sequências codificadoras descontínuas (éxons), separadas por sequências não codificadoras (íntrons). O passo inicial da transcrição envolve a produção do pré-RNA mensageiro, o qual representa a cópia do gene e que contém éxons e íntrons. Esse pré-RNA mensageiro passa por várias formas de processamento que inclui um passo chamado *splicing*. Íntrons são removidos e éxons são ligados para formar RNA mensageiro. Certos éxons são presentes em todo o RNA mensageiro, transcrito de um gene específico (éxons invariantes ou constitutivos). Outros éxons são expressos somente num conjunto de RNA's mensageiros quando transcritos de um gene específico (éxons alternativos) (Figura 6). O *splicing* alternativo é o processo que determina se um éxon específico é incluído ou excluído. *Splicing* alternativo é regulado por um número de fatores que definem a posição precisa do éxon no RNA mensageiro, dependendo do tipo celular, do estágio de desenvolvimento e da atividade celular (Lipscombe, 2005).

Pelo menos 75% dos genes multi-exons do genoma humano estão sujeitos a sofrerem *splicing* alternativo (Johnson et al., 2003). Alguns genes podem gerar centenas de milhares de proteínas funcionalmente distintas o que expande potencialmente o proteoma, gerando um espectro de atividades proteicas (Figura 6). No sistema nervoso central, *splicing* é um mecanismo crítico para expandir o nível de diversidade proteica de um conjunto de genes. Por exemplo em *Drosophila*, o éxon 6 do gene da proteína de adesão celular DSCAM, pode ser codificado por qualquer um dos 48 éxons alternativos (mutuamente exclusivos) controlando assim o processo de migração neuronal durante o desenvolvimento (Schmucker et al., 2000). Um exemplo notável da importância da edição do RNA é o receptor AMPA de glutamato. Nesse receptor, um único sítio de *splicing* modifica a permeabilidade do poro do canal ao cálcio (Sommer et al., 1991) e altera, dessa forma, o papel desses canais na formação da memória. Outro exemplo é o *splicing* alternativo do gene *slo*, que codifica canais de potássio ativados por cálcio (correntes *BK*) nas células ciliadas da orelha interna. O *splicing* alternativo dos transcritos *slo* afetam a cinética de canais *BK* e a sensibilidade ao cálcio. A nível celular, isso altera a taxa de repolarização das células da orelha interna e dessa forma, afeta também a

frequência na qual a membrana consegue despolarizar (Navaratnam et al., 1997; Black, 1998). Existem, entretanto, apenas poucos exemplos em que a significância biológica do *splicing* alternativo é claramente demonstrada. Similarmente, muito pouco se sabe sobre os fatores que controlam o *splicing* alternativo de maneira tecido-específica ou dependente da fase de desenvolvimento, nos neurônios. Estudos pioneiros sobre a identificação e elucidação funcional de *splicing* alternativo em canais de cálcio tipo-N foram e vem sendo conduzidos pelo grupo da Dra. Lipscombe e vem revelando dados importantes sobre o papel dos canais tipo-N no controle e processamento da dor.

O gene humano dos canais Cav2.2 (Tipo-N) contém vários sítios de *splicing* alternativo que são regulados diferencialmente no SNC e que modificam as propriedades do canal (Lipscombe et al., 2002; Lipscombe, 2005; Castiglioni et al., 2006). Existe, na região codificadora da parte C-terminal do canal, um par de éxons mutuamente exclusivos, 37a e 37b, que diferem em 14 dos 32 aminoácidos que esses éxons codificam. O gene $Ca_v2.2$ contendo o éxon 37a é expresso predominantemente em neurônios dos gânglios da raiz dorsal e em níveis menores em outras regiões do cérebro. Já 37b é expresso de maneira mais ubíqua por todo o sistema nervoso (Bell et al., 2004). Esses dados e estudos posteriores revelaram funções bem interessantes sobre esses dois éxons. Os éxons 37a e 37b possuem funções distintas no controle da nocicepção. Altier e cols. (2007) usando RNA de interferência específico para uma das isoformas de *splicing*, concluíram que apenas canais tipo-N contendo a variante 37a mas não 37b parecem mediar a transmissão da nocicepção térmica tanto em condições basais (sem dano tecidual) como também em modelo de dor inflamatória ou neuropática (Altier et al., 2007). Ao nível molecular, a presença de 37a torna os canais tipo-N susceptíveis a uma forma de inibição, mediada por proteína G, que é independente da intensidade do estímulo (Raingo et al., 2007). Além disso, a inclusão do éxon 37a modifica a cinética de ativação desses canais gerando maiores densidades de corrente de Ca^{2+} comparado a canais que expressam o éxon 37b (Castiglioni et al., 2006). Coletivamente, esses achados fornecem importantes dicas sobre os mecanismos celulares que controlam a atividade de canais tipo-N na nocicepção e indicam que uma subpopulação de nociceptores expressam uma forma de canais tipo-N que é mais sensível à inibição por neurotransmissores e hormônios.

Não há qualquer informação, entretanto, se essas isoformas de canais tipo-N codificadas por diferentes variantes de splicing alternativo, possuem identidades farmacológicas distintas, ou seja, não é sabido se bloqueadores modulam diferencialmente a função desses canais. A noção de que canais tipo-N contendo o exon 37a pareçam ser críticos para a transmissão dos sinais da dor a nível espinhal, aliada ao fato dessa isoforma apresentar distribuição reduzida em outras regiões cerebrais (Castiglioni et al., 2006) levam a crer numa nova oportunidade para o desenvolvimento de moléculas bloqueadoras de canais tipo-N que preferencialmente bloqueiam a isoforma que contenha o *splicing* exon 37a.

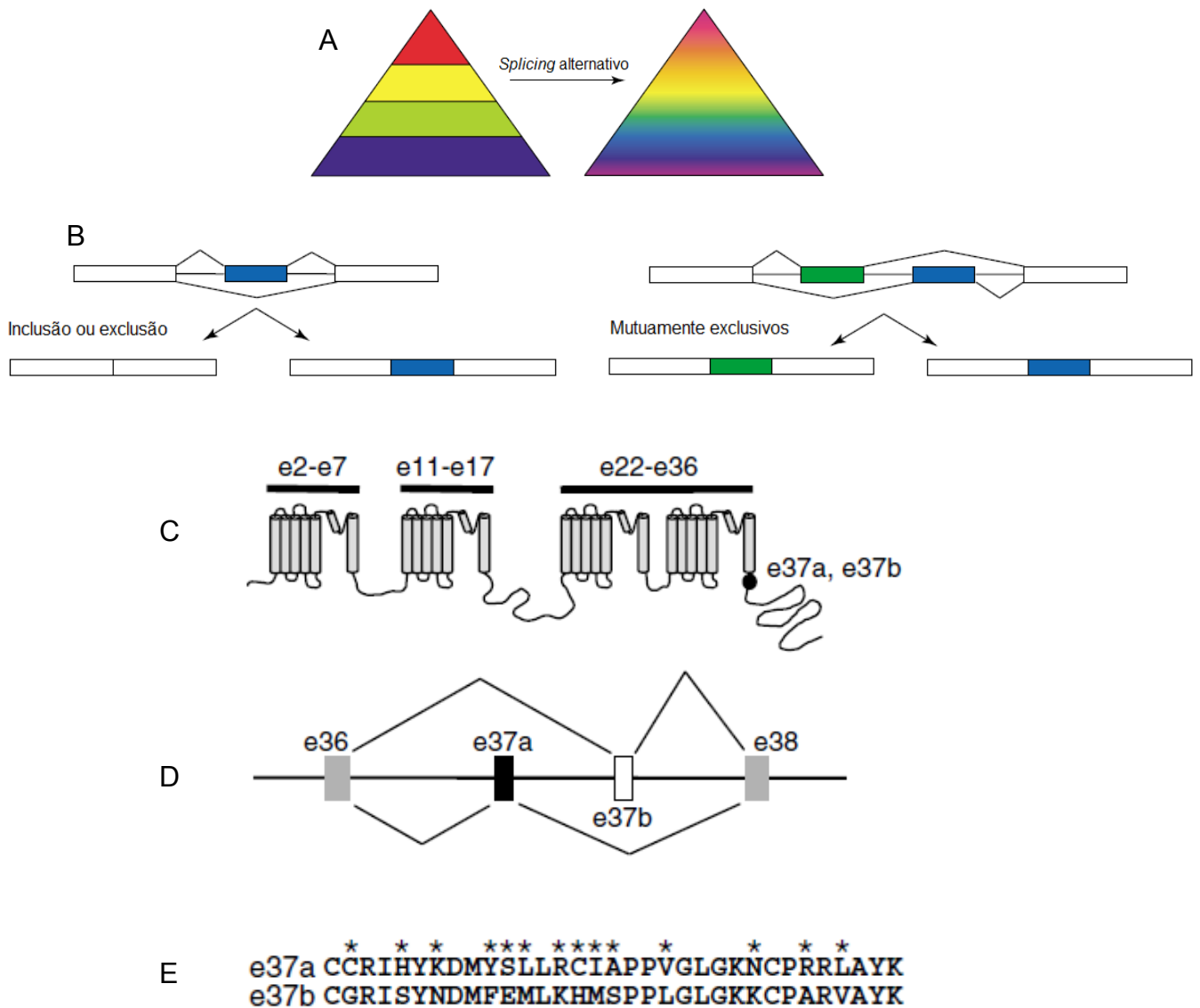


Figura 6 *Splicing* alternativo da região C-terminal do canal tipo N. (A) *Splicing* alternativo gera um espectro de atividades de proteínas. Na ilustração, a atividade de proteína é representada como cor. O *splicing* alternativo aumenta substancialmente o número de diferentes atividades que podem ser geradas de um determinado conjunto gênico (esquerdo comparado à direita). A fronteira estreita da atividade codificada por diferentes genes é convertida em transições graduais na presença de *splicing* alternativo. (B) Éxons podem ser incluídos ou excluídos (esq.) ou uma série de éxons homólogos podem ser mutuamente exclusivos, onde somente um será selecionado e incluído no RNA mensageiro processado por *splicing* (direita). (C) Éxons 37a e 37b são localizados adjacentes ao IVS6 da região C-terminal do Cav2.2. (D) RNA mensageiro de Cav2.2 contém tanto 37a e 37b. (E) Éxons 37a e 37b diferem em 14 aminoácidos.

1.7 *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 encontrada nas regiões centro e sul do Brasil. Essa espécie é frequentemente envolvida em acidentes com picadas de aranha, em humanos. A *Phoneutria nigriventer* é uma aranha extremamente agressiva, de hábitos noturnos, sendo predadora natural de uma variedade de insetos, outras aranhas, pequenos roedores, etc. Essa aranha não constrói teia e o seu sucesso como predadora depende, em grande parte, da diversidade e potência das 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 se sente ameaçada ou antes de atacar a presa, quando ela mantém erguidos os 2 dois pares de patas dianteiras (Figura 7).

A picada da *Phoneutria nigriventer* causa dor severa e irradiante e vários sintomas tóxicos incluindo espamos, tremores, convulsões tônicas, paralisia espástica, priapismo, 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 da *Phoneutria* é, sobretudo, neurotóxico.

Parte do efeito neurotóxico do veneno está relacionado à sua ação sobre canais de Na⁺ sensíveis a 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.



Figura 7 Aranha *Phoneutria nigriventer*

1.8 Farmacologia das toxinas purificadas do veneno da *Phoneutria nigriventer*

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

Em ratos, a fração PhTx1 após injeção intracerebro-ventricular causa elevação da cauda, excitação e paralisia espástica das extremidades posteriores (Rezende Junior et al., 1991). Apesar da PhTx1 não causar despolarização nem hiperpolarização no nervo vago, ela ainda é tóxica a um número restrito de fibras musculares e estruturas nervosas (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 parece bloquear o fechamento de canais de Na^+ porém sem causar despolarização significativa da membrana (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).

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 Tx3-6) foram purificadas a partir da fração PhTx3 (Cordeiro 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 ω -conotoxinas. Além das 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 (Miranda 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 ω -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 córtex-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 ω -agatoxina IVA (Guatimosim et al., 1997).

A Toxina PhTx3-4 (também conhecida por outros autores como ω -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 μg /Kg rato) causa paralisia flácida geral seguida de morte em 10-30 min (Cordeiro et al., 1993). Em sinaptosomas córtex-corticais a Tx3-4 bloqueou o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ radioativo, estimulado por tityustoxina (Miranda et al., 1998). Em células β -pancreáticas (canais Tipo-L), o bloqueio exercido pela toxina foi 40 vezes menos potente (Cassola et al., 1998).

Ensaio com linhagens celulares expressando canais de cálcio recombinantes (P/Q, N e R) mostraram que correntes de Ca^{2+} geradas por canais tipo P/Q e N são bloqueadas pela PhTx3-4 de maneira quase que irreversível, 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 ω -conotoxina GVIA e ω -conotoxina MVIIC foram capazes de deslocar a ^{125}I -PhTx3-4 do seu sítio de ligação (Dos Santos et al., 2002). Em experimento feito com junção neuromuscular de rã, Troncone e cols (2003) mostraram que de fato a PhTx3-4 se liga aos canais Tipo-N em um sítio distinto daquele ao qual se liga a ω -conotoxina GVIA e mostraram também que esse bloqueio é irreversível quando o meio contém baixa concentração de Ca^{2+} (0,5mM), mas reversível quando a toxina é lavada em presença de alta concentração de Ca^{2+} (1,5mM).

Na liberação de neurotransmissores, a PhTx3-4 bloqueia tanto a liberação de glutamato Ca^{2+} dependente como Ca^{2+} 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 transportadores de glutamato, além de CCSV's. De fato essa hipótese foi confirmada quando mostrou-se que a PhTx3-4 bloqueia a captação de L-[3H]glutamato em sinaptosomas (Reis et al., 1999). Esses dados sugerem também que a inabilidade das ω -conotoxinas GVIA e MVIIC em deslocar completamente a PhTx3-4, sugerida por Dos Santos e cols (2002), se dê em razão da ação da PhTx3-4 sobre proteínas transportadoras de glutamato.

Para avaliar se o efeito inibitório da PhTx3-4 era associado à inibição da exocitose de vesículas sinápticas, De Castro Junior e cols (2008) mostraram que a PhTx3-4 inibe, em sinaptosomas cérebro-corticais de ratos, o influxo de cálcio associado à exocitose de vesículas sinápticas. Essa inibição está associada ao bloqueio de correntes de cálcio tipo-N, já que a PhTx3-4 não teve efeito aditivo como a GVIA, uma toxina bloqueadora Tipo-N (de Castro Junior et al., 2008). Em vista de sua ação bloqueadora da liberação de glutamato e do influxo de cálcio em terminais nervosos centrais, dois eventos diretamente ligados ao mecanismo de excitotoxicidade e que causam morte celular num acidente isquêmico, Pinheiro e cols (2009) mostraram que a PhTx3-4 bem como a PhTx3-3 foram capazes de reduzir a morte neuronal na região CA1 de fatias de hipocampo submetidas a

processo isquêmico, sugerindo que a PhTx3-3 e PhTx3-4 possuem ação neuroprotetora em modelo de isquemia cerebral *in vitro* (Pinheiro et al., 2009).

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 PhTx3-4 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 Ca^{2+} que disparam a exocitose e que seriam abertos por potenciais de ação. Como os canais de Ca^{2+} são considerados alvos em potencial direcionados para a terapêutica de vários distúrbios neuropatológicos, o estudo da farmacologia toxina-canal da PhTx3-4 é de extrema importância tanto para perspectivas clínicas, como também científicas.

1.9 Efeito antinociceptivo das ω -phoetoxinas

Procurando avaliar o papel da toxina Ph α 1 β (também chamada de PhTx3-6), obtida do pool PhTx3 do veneno da *P. nigriventer*, na liberação de glutamato em sinaptosomas de córtex cerebral, Vieira e cols (2003), mostraram que esse peptídeo é um potente bloqueador (Ic50 74nM) da liberação de glutamato dependente de cálcio (Vieira et al., 2003). Pouco mais tarde, avaliando o efeito da Ph α 1 β sobre correntes de cálcio em sistemas de expressão heteróloga de canais de cálcio, Vieira e cols (2005) mostraram que a Ph α 1 β inibe correntes de cálcio com maior eficácia e maior especificidade sobre correntes tipo-N (Vieira et al., 2005) (Tabela 1).

Tabela 1 Ação da Ph α 1 β sobre CCSV's. Efeito inibitório da Ph α 1 β sobre correntes de cálcio em células Hek293 transfectadas com as diferentes subunidades codificadoras dos canais de cálcio sensíveis a voltagem.

<i>Subunidade formadora do poro</i>	<i>Tipo do canal</i>	<i>Potência de inibição (IC₅₀)</i>	<i>Inibição máxima (%)</i>
C _{av} 2.2	N	122 nM	>95%
C _{av} 2.3	R	136 nM	80%
C _{av} 2.1	P/Q	263 nM	62%
C _{av} 1.1	L	607 nM	70%

Adaptado de Veira e cols. (2005)

Juntos esses dados levantaram a seguinte hipótese: se a Ph α 1 β ao atuar predominantemente em canais tipo-N e se esses canais são concentrados em sinapses das vias sensoriais nociceptivas, então a referida toxina poderia agir como uma toxina analgésica. De fato, a Ph α 1 β quando administrada via intratecal foi capaz de inibir comportamentos nociceptivos em modelo de dor aguda térmica (medida pelo teste da chapa quente), química (medida através do teste da formalina) e também em modelo de dor neuropática em ratos, sem prejudicar de maneira considerável funções fisiológicas comandadas por vias eferentes por exemplo a função locomotora (medido através do teste da atividade locomotora em rota-rod e no teste do campo aberto) (Souza et al., 2008). Novos experimentos vem sendo feitos com a Ph α 1 β avaliando seu papel em modelo de dor neuropática e na dor inflamatória induzida por Adjuvante Completo de Freud (CFA).

À semelhança da Ph α 1 β , a neurotoxina PhTx3-4 vem sendo testada em modelos animais de nocicepção. A toxina administrada via intratecal foi capaz de inibir comportamentos nociceptivos em modelo de dor química induzida por formalina e também em dor espontânea induzida por agonista de receptor de glutamato NMDA (Figueira 2009, dados não publicados).

A despeito da potente ação antinociceptiva das toxinas da *P. nigriventer*, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais esses peptídeos alteram as

propriedades eletrofisiológicas e a sinalização de cálcio em nociceptores nativos. Tampouco é sabido se essas toxinas ligam-se ou bloqueiam canais catiônicos presentes nos nociceptores como canais de cálcio sensíveis a voltagem ou receptores tipo TRPV1, ou se existem diferenças no perfil da ação dessas toxinas sobre a sinalização de cálcio em diferentes subpopulações de neurônios sensoriais. O entendimento do mecanismo preciso de ação e dos alvos moleculares dessas toxinas possibilita o aprimoramento do uso clínico das mesmas além de refiná-las como ferramentas farmacológicas no estudo dos mecanismos moleculares dor.

Através do uso de culturas primárias de DRGs, ferramentas para análise de imagens dos níveis de cálcio intracelulares, e de ferramentas eletrofisiológicas, serão visadas com a realização desse trabalho, as respostas para algumas das perguntas anteriormente levantadas.

2.1 Objetivo geral

Estudar o mecanismo de ação das ω -toxinas obtidas do veneno da *Phoneutria nigriventer* sobre a sinalização de cálcio em modelos celulares relacionados à via nociceptiva.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito das ω -toxinas obtidas do pool Tx3 do veneno da *P. nigriventer* no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ disparado por KCl em DRGs.
- Investigar o efeito das ω -toxinas obtidas do “pool” Tx3 do veneno da *P. nigriventer* no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ disparado por capsaicina em DRGs.
- Avaliar o efeito da Ph α 1 β sobre o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por capsaicina em DRGs de animais tratados com Adjuvante Completo de Freund (CFA).
- Avaliar o efeito das ω -phonetoxinas sobre o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por capsaicina em células HEK293 transfectadas com o receptor vanilóide-1.
- Avaliar o efeito das toxinas Ph α 1 β e Tx3-4 sobre correntes de cálcio tipo-N codificadas pelas variantes de splicing alternativo 37a e 37b da subunidade C_{av}2.2.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Toxinas e Drogas

As toxinas da fração Tx3 da aranha *Phoneutria nigriventer* foram purificadas e suas sequências de aminoácidos determinadas nos laboratórios da FUNED em colaboração com a Dra. Marta N. Cordeiro. Os peptídeos eram purificados por uma combinação de filtração em gel, fase reversa e troca iônica em HPLC tal como descrito previamente (Cordeiro Mdo et al., 1993). A ω -Conotoxina MVIIA foi obtida da Latoxan (Valence, França). Cloreto de cádmio da Sigma (EUA). As soluções estoque das drogas eram preparadas em tubos plásticos (eppendorf) siliconizados, mantidas a -20°C e diluídas para a concentração desejada imediatamente antes do uso. SB-366791 (N-3-metoxifenil-4-clorocinamida), Sigma, MO, EUA, foi dissolvido em etanol absoluto. Capsazepina, Calbiochem, EUA, foi dissolvida em DMSO. Capsaicina (8-methyl N-vanilil-6-noneamida, Sigma, EUA) foi dissolvida em *Tween* 80 (10%), etanol (10%) e PBS q.s.p..

3.2 Animais

Foram usados ratos wistar machos (180-200g) cuidados à temperatura controlada ($22^{\pm}2^{\circ}\text{C}$) tratados sob ciclo 14/10h luz/noite, alimentação e água livre, fornecidos pelo CEBIO-ICB/UFMG. Para cada experimento, foi utilizado 1 (um) animal para a extração dos gânglios. Os experimentos realizados nesse estudo foram realizados de acordo com as regras para experimentação animal e com aprovação do comitê ético local.

3.3 Cultura de neurônios de DRGs

A preparação e manutenção da cultura de neurônios foi feita como descrito anteriormente (Eckert et al., 1997) com pequenas modificações.

3.3.1 Soluções

As seguintes soluções foram usadas na dissociação e cultura dos nerônios dos gânglios da raiz dorsal. Para dissecação e dissociação: KRH sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (NaCl 140mM, KCl 2,5mM, Hepes 10mM). Solução de papaína (sigma): 1,0 mg/mL em KRH sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ acrescido de poucos cristais de l-cisteína para ativação da papaína. Solução de colagenase: 2.5 mg/mL em KRH sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Tanto a papaína quanto colagenase eram alíquotadas na forma de pó e apenas no momento do experimento eram diluídas com KRH sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

Para conservação das células em cultura: DMEM (Gibco) suplementado com SFB (Gibco) 10% e penicilina/streptomicina 1% e NGF 50 ng/mL (sigma). Para experimento no sistema de perfusão: KRH completo (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, Hepes 25 mM e CaCl_2 1.5 mM) mas variando a composição conforme presença de agonistas (KCl 30mM ou capsaicina) ou bloqueadores (toxinas) substituídos de maneira equimolar para não alterar a osmolaridade final da solução (~300mOs).

3.3.2 Superfícies de cultura

Após dissociação células eram plaqueadas em lamínulas de vidro circulares de 45mm para cultura alocadas em placas de cultura de 60mm. As células aderiram melhor e mostraram processos exuberantes quando essas lamínulas eram tratadas com poli-lisina e laminina. Poli-lisina (sigma) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em KRH sem soro era adicionado a uma região de diâmetro de 1 cm no centro das lamínulas, e mantido a temperatura ambiente por 2hs. Em seguida a poli-lisina era aspirada da lamínula e lavada com água 2 vezes. Em seguida as placas eram tratadas com solução de laminina (sigma) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em meio KRH livre de soro, por no mínimo 2hs em seguida a lamina era aspirada.

3.3.3 Dissecação

Os equipamentos usados foram guilhotina, materiais cirúrgicos de dissecação estéreis (tesoura ponta romba, tesoura ponta fina, pinças e tesoura conjuntiva curva). Os animais eram sacrificados por guilhotinamento, e rapidamente a região

dorsal compreendendo segmentos cervical a lombar da coluna vertebral eram retirados e colocados em solução

KRH sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Em seguida a coluna era aberta por dois cortes longitudinais no lado ventral para expor a medula. Após retirar a medula as fibras do corno dorsal eram puxadas, com auxílio da pinça expondo o gânglio que era cortado na outra extremidade da fibra. Imediatamente os gânglios eram transferidos (em média 20 a 25 gânglios) pra outra placa contendo KRH sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

3.3.4 Dissociação

Gânglios eram incubados em banho a 37°C em tubos de poliestireno cônicos (Falcon) de 15 mL contendo 3 mL da solução de papaína por 20 min., agitando-se sutilmente o tubo a cada 5min. Após centrifugação a 800g por 30 seg. o sobrenadante era descartado e adicionado sobre o pelet 3 mL da solução de collagenase seguido de nova incubação a 37°C/20 min e com agitações a cada 5min. Em seguida os gânglios eram centrifugados (800 g por 1 min.), sobrenadante descartado e adicionado 3mL do meio de incubação (DMEM). Nova lavagem com meio DMEM era feita, centrifugado e o sobrenadante descartado. O volume de meio usado para resuspender as células era dependente do número de placas a serem preparadas. Para preparação de 10 placas, era usado volume final de 1mL. O sobrenadante, com característica turva e com alguns pedaços de tecido era triturado com pipeta de pasteur com a ponta previamente polida em fogo. Por sucção os ganglios eram dissociados até que não se observasse mais pedaços de tecido.

3.3.5 Plaqueamento

O volume final da suspensão por placa depende da densidade de células desejada. Para os experimentos em microscopia confocal usou-se volume fixo de 100µL de suspensão de células por placa, adicionados na forma de gota bem ao centro da lamínula coincidente à região de aplicação da poli-lisina/laminina. Para permitir a adesão celular, as placas eram incubadas (37°C, 5% CO_2 , 100% humidade) por pelo menos 2hs antes de completar o volume das placas. Após esse tempo, meio DMEM + NGF 50ng/mL era adicionado as placas para um volume final

de 2,5mL e mantidas (37°C, 5% CO₂, 100% humidade) por 12-24 hs até o momento do experimento.

3.4 Inflamação crônica induzida por CFA

Para produzir nos animais uma resposta inflamatória crônica antes da extração dos gânglios da raiz dorsal, os ratos eram levemente anestesiados com halotano 2% e recebiam em seguida 150 µL de CFA (1:1 CFA/salina) por via subcutânea na superfície plantar da pata traseira direita. 48 horas após a administração de CFA era avaliado o aparecimento de inchaço e rubor na pata além surgimento de alodínia mecânica que caracterizava a presença do processo inflamatório. Em seguida os animais eram sacrificados para a retirada dos gânglios da raiz dorsal (L4, L5 e L6 ipsilateral à administração de CFA) e a preparação da cultura feita como descrito anteriormente.

3.5 Imagens de cálcio em DRGNs

3.5.1 Marcação com Fluo-4

A marcação com o corante para cálcio foi feita seguindo recomendações do fabricante, resumidamente: Solução estoque de fluo-4/AM (molecular probes) era preparada sempre momentos antes do experimento pela diluição do conteúdo do tubo com 50µL de DMSO para dar uma concentração final de 1mM. O meio DMEM das células era esgotado da placa que era lavada duas vezes com solução KRH contendo Ca²⁺ 1mM. Após adicionar 1,5mL do mesmo KRH, era adicionado 5µL de de Fluo-4 à placa, para dar uma concentração final de 3µM. Após suave agitação, as placas eram mantidas (37°C, 5% CO₂, 100% humidade) por 30-40 minutos antes da aquisição das imagens.

3.5.2 Imagens de Cálcio por microscopia confocal

Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (20-22°C) baseado em trabalhos prévios (Gomes et al., 2004; Altier et al., 2006). A aquisição de imagens foi feita em modo curso-temporal utilizando-se microscópio confocal

Leica modelo SP5, software Leica LAS e sistema de perfusão (Bioptechs) para permitir a perfusão de soluções/agonistas/antagonistas durante a aquisição de imagens. A Figura 8 apresenta a montagem do sistema de perfusão acoplado ao microscópio confocal. Foi usada objetiva de 20x imersão em água. Após marcação com fluo-4, as lamínulas eram lavadas em meio KRH sem fluo-4 e transferida para um suporte padronizado de perfusão (Bioptechs) o qual formava um sistema hermético de aproximadamente 100 μ L e com controle preciso da entrada e saída da solução que era perfundida continuamente com fluxo padronizado de 0,6mL/min. (Figura 8). As imagens das células marcadas com fluo-4 foram obtidas pela excitação do fluoróforo com um linha de laser de argônio a 488nm e a luz emitida coletada na banda 510-560nm. A coleta de imagens era feita a cada 2s. Durante a coleta de imagens as células eram desafiadas com estimuladores de transiente de cálcio (KCl ou capsaicina) com ou sem a presença de antagonistas ou toxinas. A análise de imagens, feita com auxílio do Software LAS (Leica), consistia em delimitar ROIs (regiões de interesse) correspondentes aos corpos celulares neuronais para quantificação das variações de fluorescência nessas regiões. As mudanças de fluorescência (F) eram normalizadas pela fluorescência inicial (F_0) e foram expressas como $(F/F_0) \times 100$. Os valores de fluorescência são apresentados como média \pm s..em. de células estudadas 2-3 experimentos. Foram consideradas como células responsivas aos estímulos dados, apenas células cuja fluorescência ultrapassava 50% do valor de sua linha de base. Ainda, para não subestimar a amplitude dos picos devido à saturação da escala de fluorescência, células cujo pico de fluorescência alcançavam a saturação (>200.000 a.u.) eram eliminados das análises de quantificação.

3.6 Imagens de cálcio em células HEK293VR1

Células HEK293 estavelmente transfectadas com receptor vanilóide 1 foram gentilmente cedidas pela equipe do Dr. John B. Davis (Harlow, UK), e eram mantidas, até a realização dos experimentos, a -140°C em nitrogênio líquido. Após descongelamento as células foram mantidas em cultura (37°C , 5% CO_2 e 70% de umidade) em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% penicilina estreptomicina e G418 (Sigma MO, USA) $400\mu\text{g/mL}$ (Hayes et al., 2000)

até uma confluência de aproximadamente 80%. Em seguida, células eram enzimaticamente dissociadas da placa usando DMEM contendo 0,25% de tripsina/1mM EDTA, plaqueadas (15-20% de confluência) em lamínulas 45 mm pré-tratadas com poli-lisina, mantidas em recuperação (37°C, 5% CO₂ e 70% de umidade) por 12 hs. Para os experimentos de imagem de cálcio, o meio era substituído por meio KRH contendo Ca²⁺ 1 mM (Ver seção 3.3.1). A marcação com fluo4-AM e o protocolo para aquisição de imagens foi feito tal como descrito anteriormente para os experimentos com DRGNs (seção 3.5).

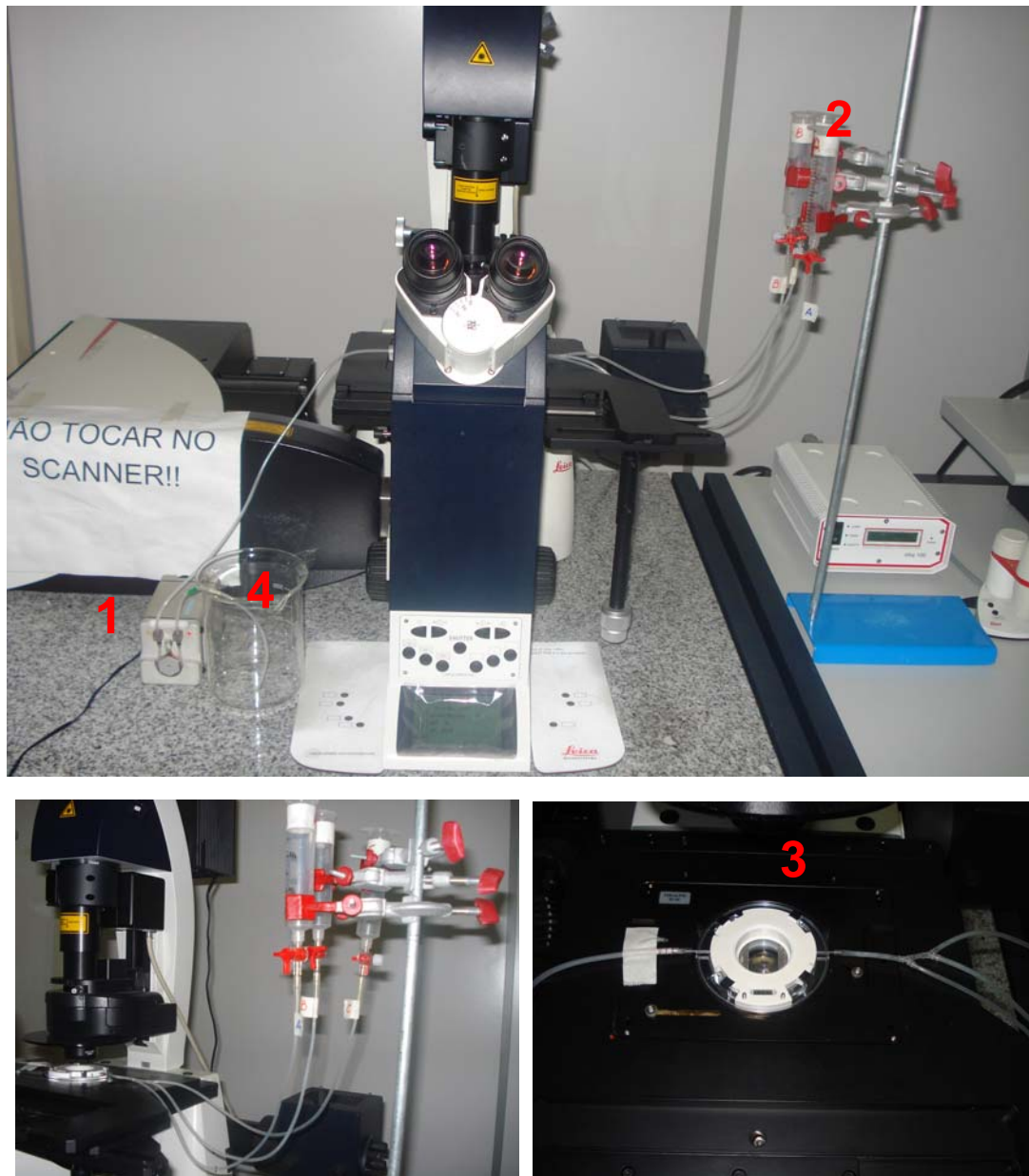


Figura 8 Sistema de perfusão acoplado ao microscópio confocal para aquisição de imagens de cálcio intracelular. 1 – bomba peristáltica; 2 – Seringas com as soluções de perfusão; 3 – Suporte com a camara de perfusão contendo a lamínula com as células. 4 – Descarte.

3.7 Expressão transiente de canais Cav2.2 em células TsA201

cDNAs, derivados de ratos, codificadores das isoformas Cav2.2[37a] (Bell et al., 2004) e Cav2.2[37b], obtidos no laboratório da Dra. Diane Lipscombe (Lin et al., 1997), juntamente com cDNAs das subunidades Cav β_3 , Cav $\alpha_2\delta_1$ (Lin et al., 2004) e cDNA da proteína fluorescente verde aumentada (eGFP; BD Bioscience), foram transfectados em células TsA201 usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) tal como descrito em Thaler et al., (2004) e de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen). Para minimizar a variabilidade de eficiência de transfecção entre transfecções, eram transfectadas apenas células com 70% de confluência na placa, concentração controlada de cDNA e as células eram testadas exatamente 24 hs após a transfecção para realização dos registros eletrofisiológicos.

3.8 Preparação de cultura de neurônios DRGs em camundongos bb

Para criar camundongos contendo apenas a isoforma 37b de canais Tipo-N (camundongos *Cacna1b*^{b*b/b*b}, no decorrer do texto chamados apenas de *bb*), a isoforma 37a foi substituída pela isoforma 37b por procedimentos de engenharia genética desenvolvidos no laboratório da Dra. Diane Lipscombe. Os procedimentos de clonagem, obtenção e genotipagem dos animais mutantes são descritos detalhadamente em Andrade et al., (2010). Animais *bb* foram escolhidos em detrimento de animais *aa* (camundongos sem a isoforma 37b) para os testes com as toxinas pois esses últimos possuem uma taxa mendeliana 50% menor, além de serem fisiologicamente comprometidos (Andrade et al., 2010). Não foram encontradas, até o momento alterações fenotípicas distinguíveis entre camundongos *bb* e camundongos selvagem. Camundongos jovens (2-3 semanas) dos genótipos *bb* e selvagem foram utilizados para a preparação da cultura de DRGs. Após sacrificar os animais, os neurônios dissociados foram obtidos pelo tratamento dos gânglios em solução HBSS (GIBCO) contendo colagenase 1.5mg.mL⁻¹ (Sigma) e tripsina 2.0 mg.mL⁻¹ (Sigma) a 37°C por 30 min e então triturados com pipeta de pasteur com a ponta previamente polida em fogo. Em seguida a atividade de protease foi reduzida pela adição de meio DMEM contendo 10% de FBS (GIBCO). Após duas lavagens, os neurônios foram plaqueados em lamínulas pré-tratadas (1

hora) com poli-L-Lisina (Sigma), acrescidos de NGF 1ng.mL^{-1} e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 até o momento dos registros, que eram realizados no mesmo dia da preparação da cultura.

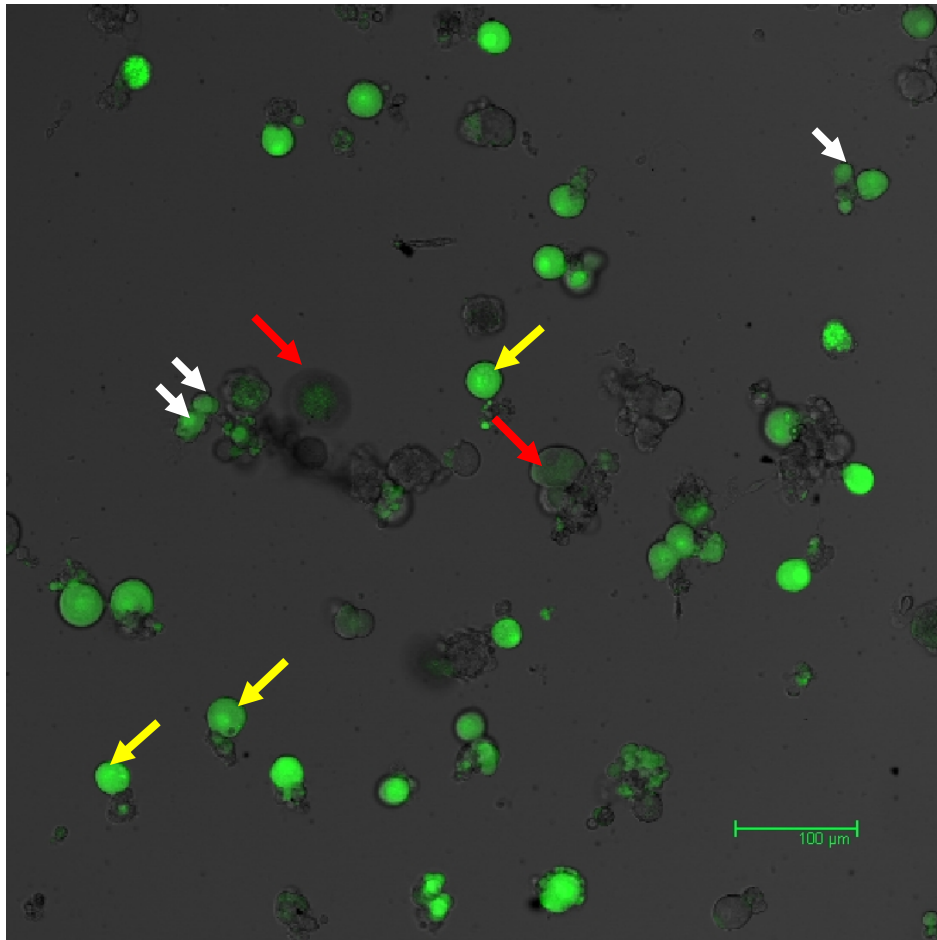
3.9 Registros eletrofisiológicos

Foram realizados registros eletrofisiológicos no modo *Whole Cell* padrão, tal como previamente descrito (Thaler et al., 2004; Lin et al., 2004). Os registros foram feitos à temperatura ambiente. Foi utilizado amplificador Axopatch 200A e software pCLAMP8.1 (Molecular Devices). Todos os registros foram realizados em condições iônicas idênticas. A solução externa continha: CaCl_2 (1 mM), MgCl_2 (4 mM), HEPES (10 mM), TEA-Cl (135 mM) e TTX (0,1 μM) e o pH ajustado para 7.2 TEA-OH. A solução da pipeta (interna) continha: CsCl (126 mM), Mg-ATP (4 mM), EDTA (1 mM), EGTA (10 mM) e HEPES (10 mM). O pH ajustado para 7.2 com CsOH. A resistência dos eletrodos de registro variou entre 3-5 $\text{M}\Omega$. A resistência em série (sempre $< 10 \text{M}\Omega$) era compensada 70-80% num *lag* de 7 μs . As correntes de cálcio eram evocadas por potenciais teste de voltagem com duração de 20 ms partindo do potencial (-80mV, se DRGs ou -100 mV se células TsA201) e aplicados em intervalos entre 5 a 10s conforme indicado nos resultados. A corrente de vazamento era subtraída utilizando protocolo P/-4. Os dados eram amostrados a uma frequência de 20KHz e filtrados a 2KHz (-3 dB) usando o software pCLAMP8.1. Após a obtenção do gigaselelo, as células eram ligeiramente elevadas da superfície da lamínula e posicionadas em frente a saída do sistema de microperfusão (Warner Instruments) o qual se encontrava dentro da câmara de perfusão. A adição de toxinas às células era feita por esse sistema. As condições de registro foram essencialmente as mesmas para células TsA201 e DRGs. Os resultados são apresentados como média \pm EPM. Comparação entre diferenças entre as médias dos grupos foram feitas por teste T de student não pareado.

4.1 Medidas dos níveis de Ca^{2+} em DRGs

Para avaliar o efeito das toxinas sobre os níveis de cálcio em DRGs era necessário padronizar a preparação da cultura bem como os experimentos em microscopia confocal e o sistema de perfusão visto que esses não eram procedimentos de rotina no laboratório. Após dissociação dos gânglios e plaqueamento, os neurônios permaneceram viáveis em cultura por até 7 dias. Contudo com o passar dos dias era nítido a proliferação acentuada de células da glia que tomavam quase a totalidade da área da placa. Assim, as análises de cálcio das culturas eram feitas num período de 12-24hs após a preparação da cultura tempo em que a presença de glia era mínima. A população dos neurônios na cultura era sempre heterogênea em muitos aspectos. Em relação ao diâmetro dos neurônios, pequenos ($17 \pm 2\%$), médios ($67 \pm 5\%$) e grandes ($16 \pm 3\%$); (<15, entre 15 e 30 e >30 μm de diâmetro, respectivamente) (Lu et al., 2006) (Figura 9) e também em relação à viabilidade celular (medida através da responsividade ao KCl). Eram considerados viáveis os neurônios que, após a adição de KCl, tinham seus níveis de fluorescência aumentados no mínimo 50% acima da linha de base (Figura 10A). Entre os neurônios responsivos, a amplitude da resposta também variou consideravelmente em células de um mesmo campo, sendo observado aumento de até 10x em relação à linha de base em algumas células (Figura 10B e 10C). Para assegurar que as variações de fluorescência e portanto os transientes de cálcio observados eram devido à ação despolarizante do KCl e não por ativação de mecanoreceptores causada por possíveis alterações no fluxo ou na pressão da perfusão, foi realizado controle em que era adicionado às células meio KRH normal disposto num outro recipiente de perfusão ao invés de KCl. Nessa situação não foram observadas variações significativas de fluorescência pela simples alternância das soluções de perfusão (dados não mostrados).

A



B

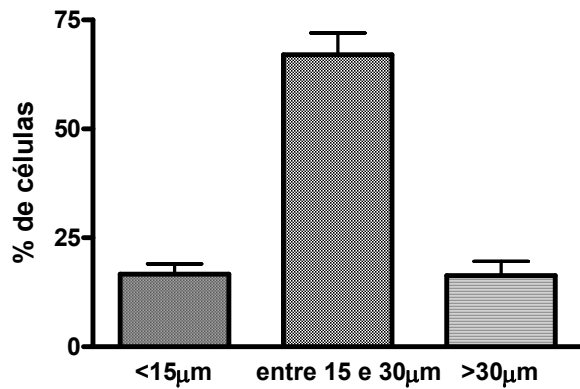


Figura 9 Neurônios do gânglio da raiz dorsal marcados com Fluo-4. DRGs de ratos foram isolados, dissociados e mantidos em cultura por 24hs. (A) Imagem de neurônios marcados com o biosensor para cálcio fluo-4 (excitação 488 nm e emissão 510-550nm). Setas brancas, amarelas e vermelhas indicam neurônios pequenos, médios e grandes, respectivamente (Lu et al., 2006). (B) Distribuição da população de neurônios de acordo com o diâmetro observado.

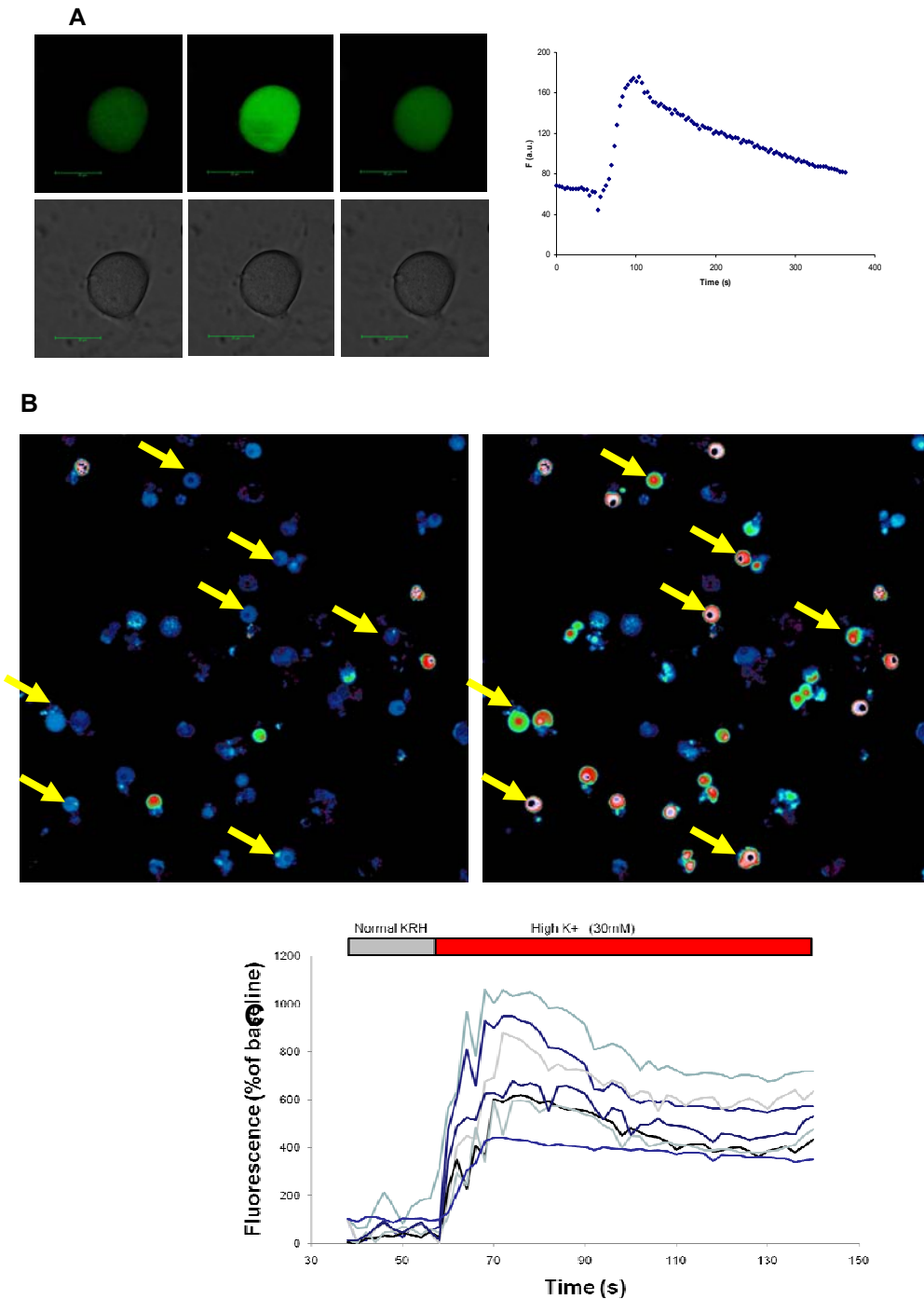


Figura 10 Aumento dos níveis de cálcio induzido por KCl em DRGs. (A) KCl (30mM) dispara aumento da fluorescência em todo o corpo neuronal que retorna ao nível próximo do basal algum tempo após a lavagem do KCl do meio de perfusão. Imagens antes (esquerda) durante (meio) e depois (direita) da adição de KCl, os painéis superiores mostram imagem da luz de fluorescência, inferiores, luz transmitida. O gráfico à direita mostra a variação da fluorescência da célula em imagem, dada em unidade arbitrária de fluorescência (a.u.) x tempo (s). (B) Imagem pseudocolorida indicando as respostas de várias células antes (esquerda) e depois (direita) da adição de KCl. Cores mais quentes indicam maiores níveis de cálcio. Setas apontam células responsivas cuja quantificação é mostrada em (C).

4.2 Efeito do cádmio sobre aumento dos níveis de cálcio em DRGs induzido por KCl

Para esses testes e os testes seguintes utilizando as toxinas, foi usado um protocolo de dois estímulos de 15 s com KCl (30 mM) com intervalo de 12 min entre os 2 estímulos. Após esse tempo a fluorescência retornava a níveis basais e a aplicação do 2º estímulo disparava novo aumento da fluorescência cuja amplitude era em média 80% da amplitude do 1º estímulo. (Figura 11A). Bloqueador inespecífico de CCSV's, o íon Cádmio adicionado sob a forma de cloreto de cádmio 100 μ M na solução KRH logo após o 1º estímulo inibiu consideravelmente a resposta das células frente ao segundo estímulo com KCl 30 mM (Figura 11B). Contudo, foi observado que após o 1º estímulo a fluorescência das células não retornava à níveis basais. Quando o cádmio era adicionado às células antes do 1º estímulo o KCl não elicitava aumento significativo dos níveis de cálcio mas após lavagem do cádmio, um novo estímulo com KCl era capaz de disparar aumento dos níveis de cálcio nas mesmas células (Figura 11C). Juntos, esses dados sugerem que o bloqueio inespecífico de CCSV's foi capaz de inibir o aumento de cálcio induzido por KCl em DRGs e que essa inibição tem caráter reversível após lavagem do cádmio do meio.

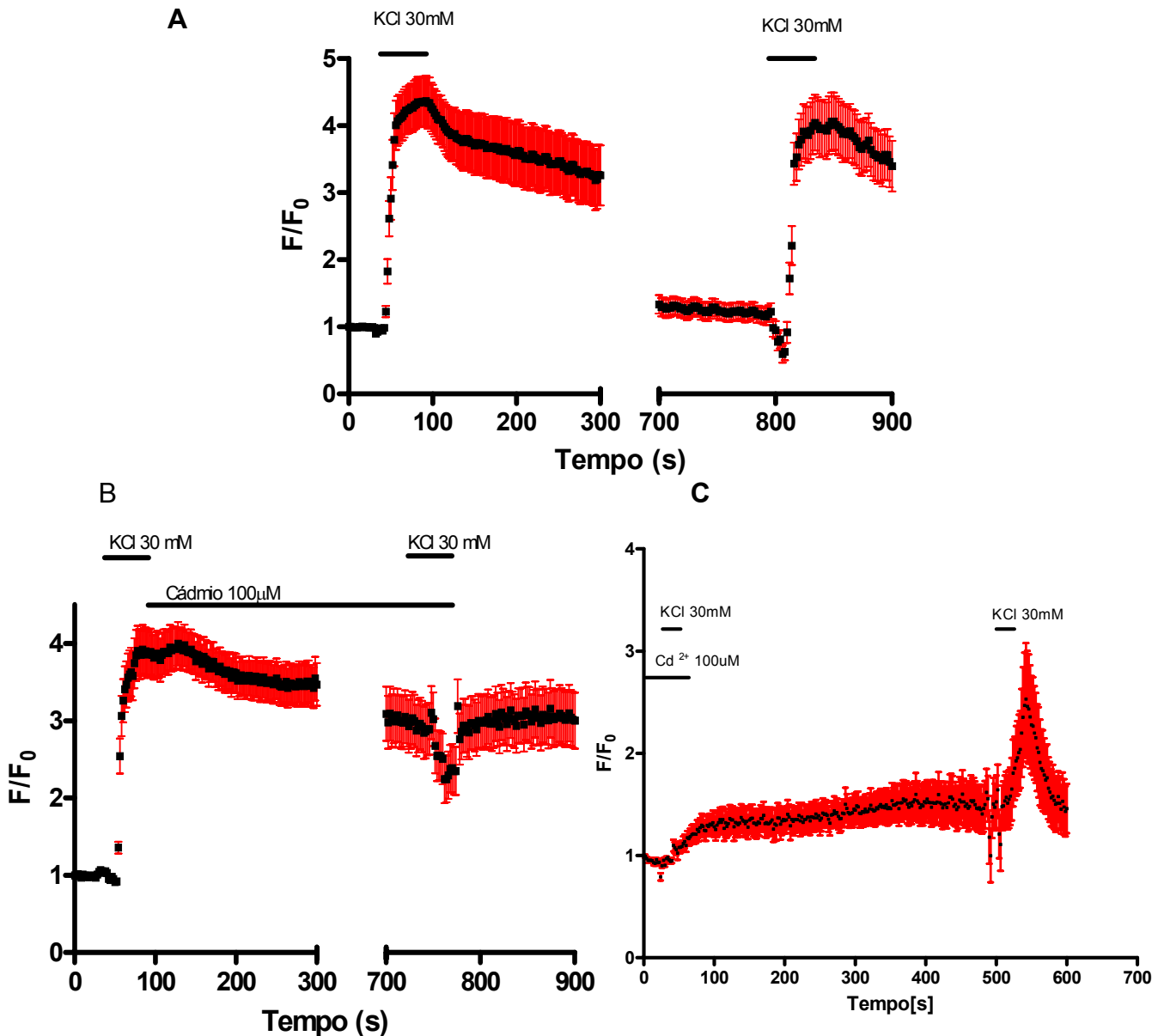


Figura 11 Efeito do cádmio sobre os níveis de cálcio induzido por KCl em DRGs. Variações curso-temporal dos níveis de fluorescência normalizados em cada célula pela sua respectiva linha de base (F/F_0). (A) Resposta das células a dois estímulos com KCl 30mM com intervalo de 12 minutos entre os estímulos. (B) Cádmio era adicionado ao meio de perfusão das células no intervalo entre os dois estímulos. Foi observada a extinção do segundo pico frente a adição de KCl. (C) Cádmio pré-incubado nas células antes do 1º estímulo mas lavado em seguida. Pontos pretos representam média \pm E.P.M. (traços cinza) da fluorescência em células de pelo menos 3 experimentos independentes.

4.3 Efeito da ω -conotoxina MVIIA sobre aumento dos níveis de cálcio em DRGs induzido por KCl

Para avaliar o papel dos canais de cálcio sensíveis a voltagem subtipo-N nos transientes de cálcio induzido por KCl em DRGs, um potente bloqueador de correntes de cálcio tipo-N, a ω -conotoxina MVIIA (200 nM) foi adicionada à solução de perfusão após o 1º estímulo com KCl. Testada em concentração capaz de produzir seu efeito máximo, a MVIIA reduziu em $76 \pm 5\%$ a amplitude dos níveis de cálcio induzidos por KCl comparado à amplitude desses transientes num controle sem toxina ($p < 0,01$) (Figura 12). Diferente do efeito observado com o Cádmio sobre a cinética dos níveis de cálcio, a adição da ω -conotoxina MVIIA não impediu que os níveis de fluorescência voltassem a valores próximos do basal antes ao 2º estímulo (Figura 12). Portanto, o bloqueio de correntes tipo-N aboliu mais de 2/3 do aumento dos níveis intracelulares de cálcio induzidos por despolarização com KCl em DRGs.

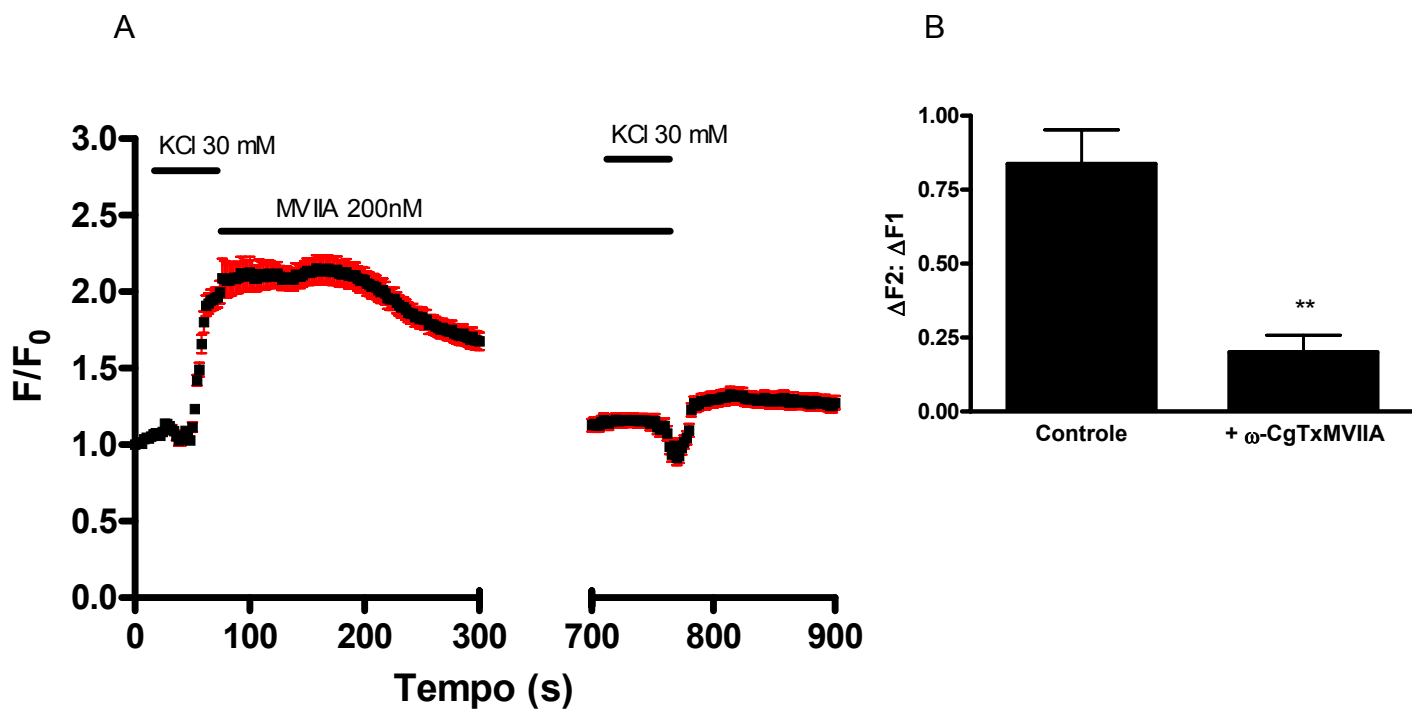


Figura 12 Efeito da ω -conotoxina MVIIA sobre o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por KCl em DRGs. Variações curso-temporal dos níveis de fluorescência normalizados em cada célula pela sua respectiva linha de base (F/F_0) de neurônios estimulados com KCl. (A) Resposta das células a dois estímulos com KCl 30mM com intervalo de 12 minutos entre os estímulos. Nesse intervalo era adicionado ω -conotoxina MVIIA (200nM) ao meio de perfusão, segunda resposta quase completamente abolida. Pontos pretos representam média \pm E.P.M. (traços cinza) da fluorescência em células de pelo menos 3 experimentos independentes. (B) Quantificação das respostas em A obtida pela divisão da amplitude do segundo KCl pelo primeiro KCl (KCl2:KCl1) com ou sem ω -conotoxina MVIIA, barras representam média \pm E.P.M. (** $P < 0.01$).

4.4 Efeito das toxinas da fração Tx3 do veneno da *P.nigriveneter* sobre aumento dos níveis de cálcio em DRGs induzido por KCl

Quatro neurotoxinas peptídicas obtidas da fração Tx3 do veneno da *Phoneutria nigriventer* Tx3-3, Tx3-4, Tx3-5 e Ph α 1 β (Gomez et al., 2002) foram testadas isoladamente sobre a dinâmica de cálcio em DRGs (Figura 13 e Figura 14). Nem a Tx3-3 (200 nM) nem a Tx3-5 (200 nM) foram eficazes em inibir o aumento de cálcio induzido por KCl em DRGs ($P > 0,05$) (Figura 13).

Por outro lado, a incubação da toxina Tx3-4 (100 nM) aboliu consideravelmente (86 ± 2 % de inibição) o transiente de cálcio induzido por KCl nos neurônios ($P < 0,001$) (Figura 14). Para avaliar se o efeito inibitório exercido pela Tx3-4 era de fato ligado ao bloqueio do influxo de cálcio nas células e não por induzir perda da viabilidade celular, a Tx3-4 foi pré-incubada às células antes do primeiro estímulo com KCl e, após o estímulo a toxina era lavada do meio de perfusão quando as células eram então novamente estimuladas com KCl. Nessa situação era observado bloqueio da resposta frente ao primeiro KCl mas com a lavagem da toxina as células recuperavam a responsividade ao KCl observado através do aumento de aprox. 2x dos níveis de fluorescência (Figura 14). Juntos esses dados sugerem que a Tx3-4 bloqueia de maneira eficaz e reversível o aumento dos níveis em DRGs mediante despolarização com KCl.

A toxina Ph α 1 β é uma bloqueadora potente e específica de CCSVs subtipo-N (Vieira et al., 2005). A Figura 15 mostra o efeito da Ph α 1 β sobre os transientes de cálcio em DRGs nos mesmos moldes experimentais anteriores. Diferente do efeito observado com as toxinas Tx3-3, Tx3-4 e Tx3-5, a incubação da Ph α 1 β (200nM) reduziu a amplitude do transiente de cálcio induzido por KCl em aproximadamente 70 ± 10 %. Interessantemente, assim, como observado nos experimentos com o íon cádmio, a adição da Ph α 1 β após o 1º estímulo estava associado à menor recuperação da fluorescência das células para valores basais.

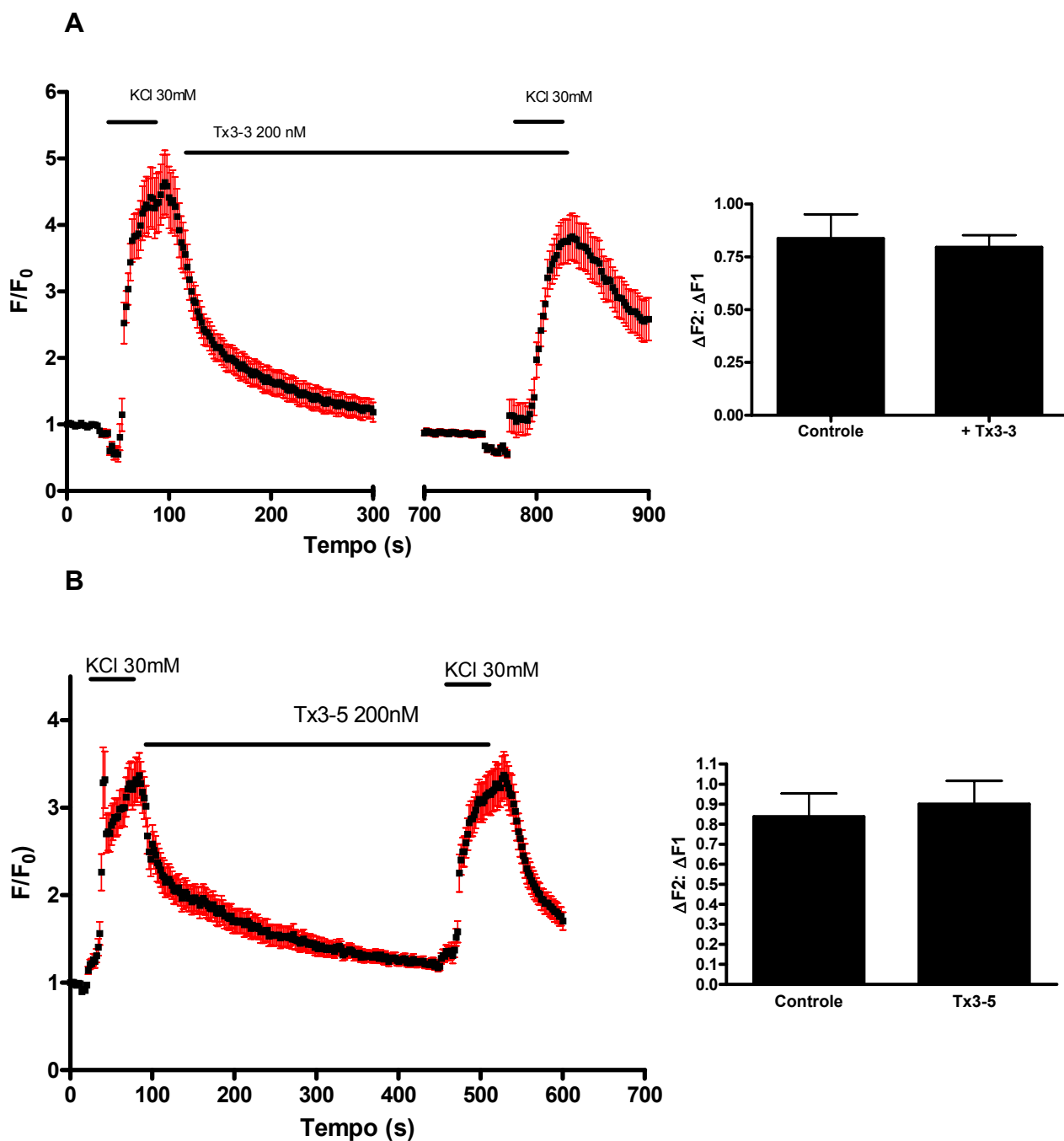


Figura 13 Efeito das Toxinas Tx3-3 e Tx3-5 sobre os níveis de cálcio induzido por KCl em DRGs. Nem a adição de Tx3-3 (200nM) (A) nem Tx3-5 (200nM) (B) no meio de perfusão inibiu de maneira significativa ($P > 0,05$) o aumento dos níveis de cálcio induzido por KCl em DRGs. Pontos pretos representam média \pm E.P.M. (traços cinza) da fluorescência em células de pelo menos 3 experimentos independentes. Gráficos em barra mostram a quantificação das amplitudes dos picos. Barras representam média \pm E.P.M.

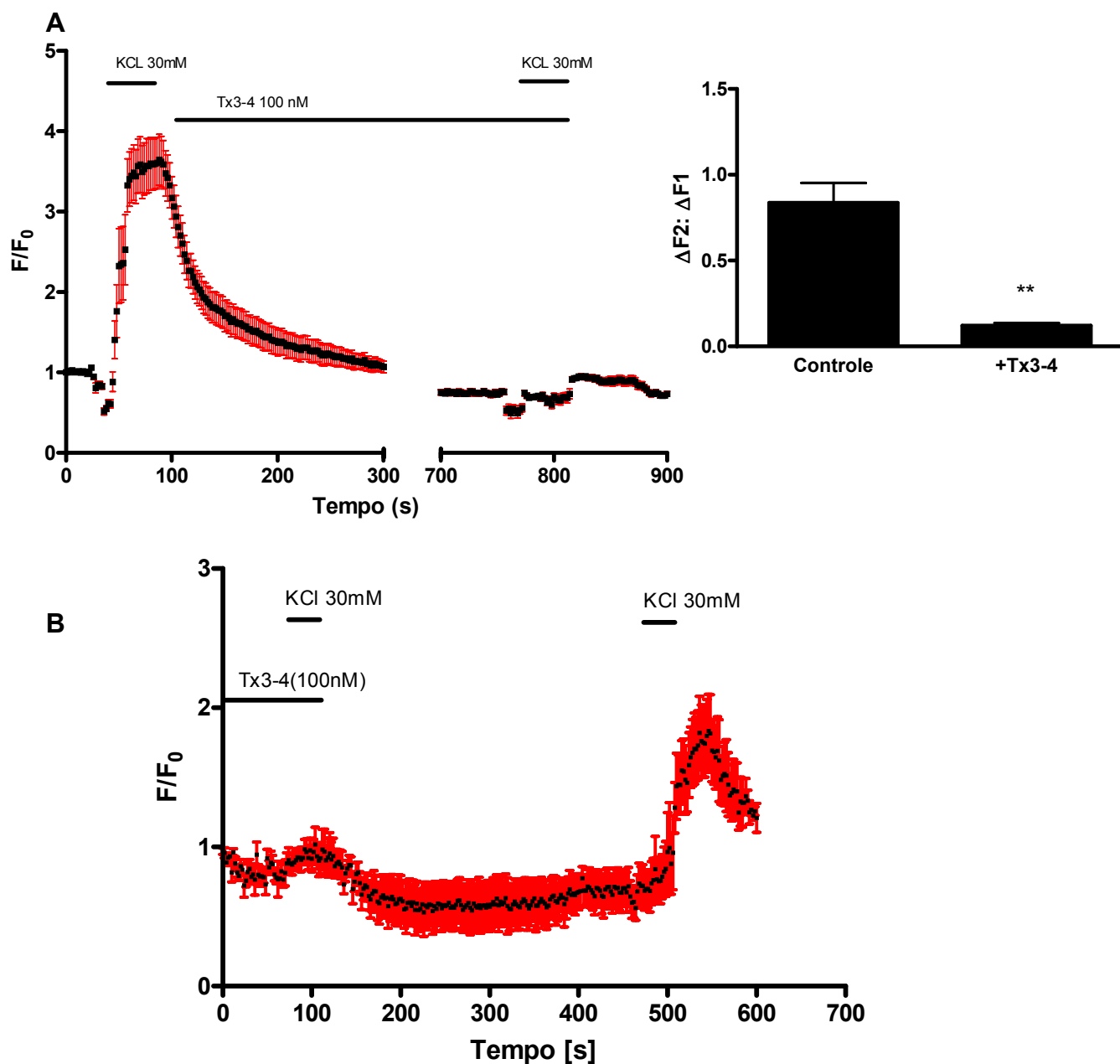


Figura 14 Efeito da toxina Tx3-4 nos níveis de cálcio induzidos por KCl em DRGs. Variações dos níveis de fluorescência normalizados pela linha de base em DRGs. (A) A toxina Tx3-4 (100nM) adicionada entre o 1º e o 2º KCl inibiu com grande eficácia o transiente de cálcio em praticamente todas as células. ($P < 0,01$). (B) Tx3-4 era incubada previamente ao 1º estímulo com KCl mas lavada do meio de perfusão logo após o 1º estímulo. Pontos pretos representam média \pm E.P.M. (traços cinza) da fluorescência em células de pelo menos 3 experimentos independentes. Gráficos em barra mostram a quantificação das amplitudes dos picos. Barras representam média \pm E.P.M (** $P < 0.01$).

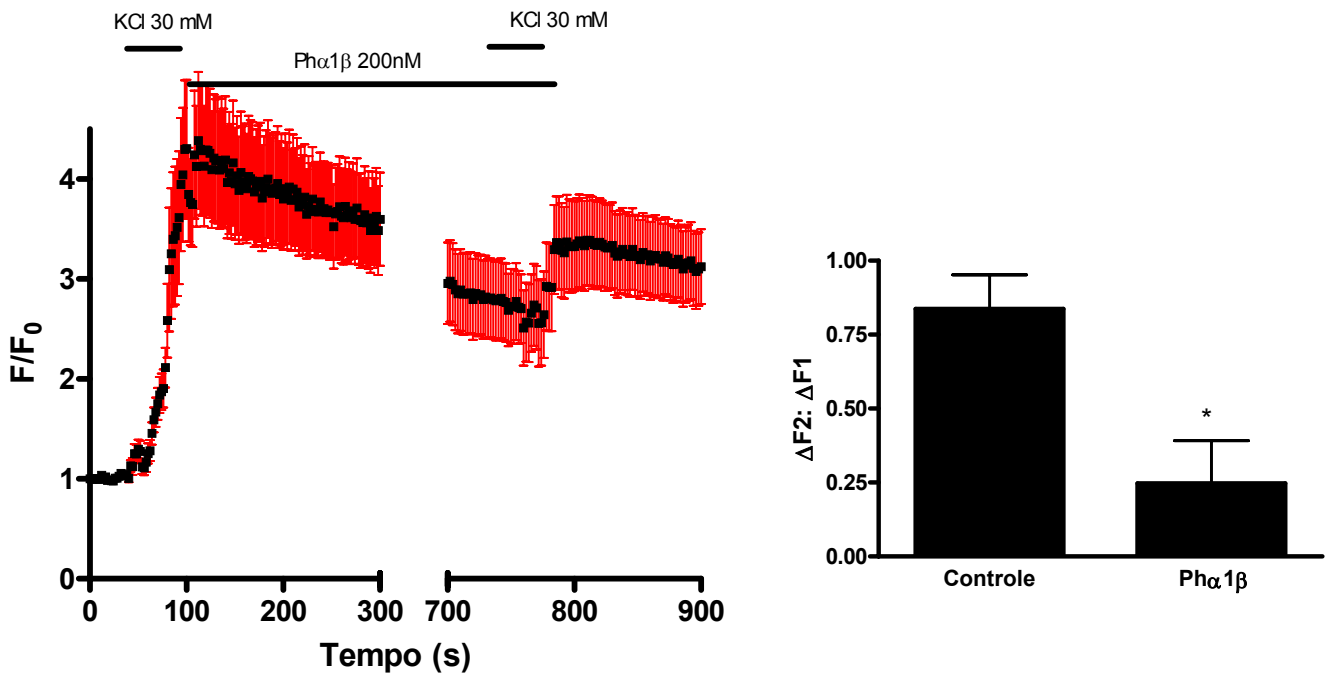


Figura 15 Efeito da toxina Ph α 1 β 1 nos níveis de cálcio induzidos por KCl em DRGs. A Ph α 1 β 1 (200 nM) adicionada ao meio de perfusão dos DRGs reduziu a amplitude da resposta ao KCl. Pontos pretos representam média \pm E.P.M. (traços cinza) da fluorescência em células de pelo menos 3 experimentos independentes. O gráfico em barra mostra a quantificação das amplitudes dos picos. Barras representam média \pm E.P.M. (* P<0.05).

4.5 Ph α 1 β inibe transientes de cálcio induzidos por KCl preferencialmente em DRGNs de pequeno diâmetro

Os neurônios aferentes primários são funcionalmente heterogêneos. Essa heterogeneidade reflete, em parte, os mecanismos da regulação da concentração de cálcio intracelular (Lu et al., 2006). Neurônios de grande diâmetro (>30 μ m) apresentam picos de concentração de cálcio de menor amplitude e de mais rápido decaimento que as respostas de neurônios de pequeno diâmetro onde a amplitude é maior e o decaimento da concentração de cálcio é mais lenta (Lu et al., 2006). Para avaliar se o efeito da Ph α 1 β sobre o transiente de cálcio induzido por KCl tem relação com essa heterogeneidade das respostas dos DRGs o efeito da toxina foi analisado observado sob a mesma lógica experimental anterior, mas extratificando a análise de acordo com o tamanho dos neurônios, se pequenos (diâmetro < 30 μ m) ou grandes (diâmetro >30 μ m). A figura 16 mostra traços representativos dos níveis de cálcio em neurônios de grande e pequeno diâmetro, analisados juntos. Os neurônios de grande diâmetro apresentaram picos de amplitude em média $3.5 \pm 0,6x$ em relação a linha de base da fluorescência normalizada (Figura 16A). Já neurônios pequenos apresentaram picos de amplitude em média $5,0 \pm 0.7 x$ em relação à linha de base (Figura 16B). A Ph α 1 β não inibiu o transiente de cálcio em neurônios grandes comparado ao controle sem toxina ($P > 0.05$) (Figura 16C e E) mas em neurônios pequenos a inibição pela Ph α 1 β foi $80 \pm 6\%$ (Figura 16D e E). Juntos esses dados mostram que a Ph α 1 β inibiu os transientes de cálcio com maior eficácia em neurônios pequenos. Esse efeito foi diferente do efeito da Tx3-4 que também inibiu de forma eficaz os transientes de cálcio independente do tamanho dos neurônios.

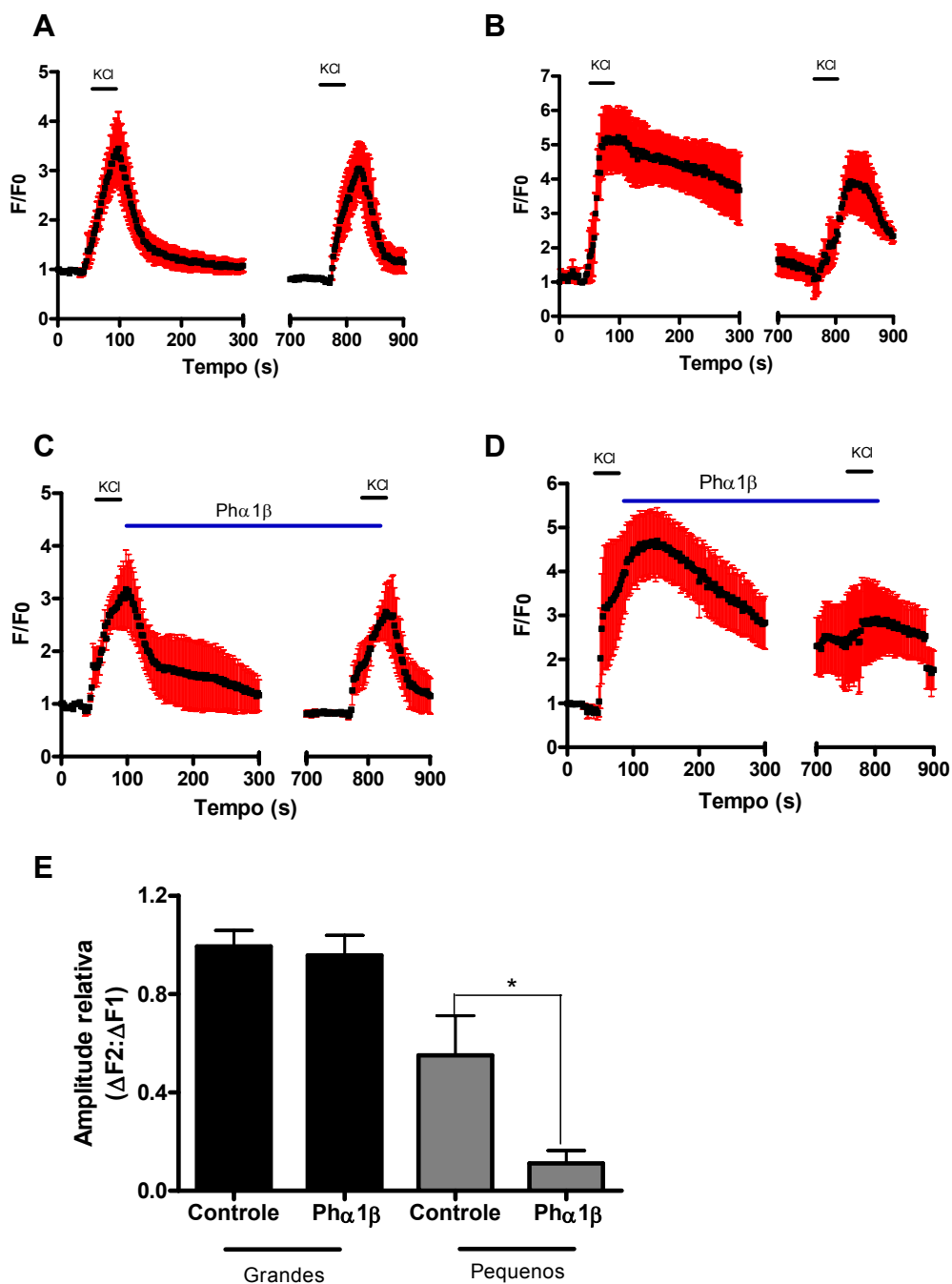


Figura 16 Efeito da Ph α 1 β sobre os transientes de cálcio induzidos por KCl em neurônios grandes e pequenos. A,B,C e D, variações curso-tempo da fluorescência normalizada de DRGs em resposta ao KCl avaliada em neurônios grandes (> 30 μ m) A e C, neurônios pequenos (< 30 μ m) B e D. Testes com a toxina são mostrados em C e D. Pontos pretos representam média \pm E.P.M. (traços cinza) da fluorescência em células de pelo menos 3 experimentos independentes. O gráfico em barra mostra a quantificação da amplitude relativa dos picos. Barras representam média \pm E.P.M (* P < 0.05).

4.6 Efeito da Ph α 1 β e do SB366791 nos transientes de cálcio induzidos por capsaicina em DRGNs

À semelhança do KCl, a capsaicina, um agonista de receptores TRPV1, também disparou aumento dos níveis de cálcio em DRGNs marcados com Fluo-4AM, conforme mostrado na figura 16. A amplitude do transiente de cálcio foi dependente das concentrações de capsaicina testadas chegando a ultrapassar 6x os níveis basais de fluorescência nas concentrações de capsaicina 5 μ e 10 μ M (Figura 17A). O EC₅₀ calculado foi 1,7 μ M (Figura 17B). Nos testes seguintes utilizando a toxina e o antagonista SB366791 a concentração de capsaicina usada foi de 1 μ M. Nessa concentração, a capsacina induziu transiente de cálcio verificado pelo aumento médio de 3x nos níveis de fluorescência que retomava parcialmente após a lavagem da capsaicina das células (Figura 17C). Quando desafiados novamente com capsaicina era observado novo transiente de fluorescência com amplitude de 72% em relação ao primeiro estímulo Figura 17C e D (primeira barra). Para avaliar o efeito da Ph α 1 β e comparar com o efeito do SB366791, um antagonista seletivo de receptores TRPV1, essas drogas foram adicionadas ao meio de perfusão entre o 1º e 2º estímulos assim como nos demais experimentos com KCl.

A toxina Ph α 1 β (200nM) e o antagonista SB366791 (1 μ M) reduziram em 63 e 61% respectivamente a razão entre o 2º e o 1º pico de cálcio induzido por capsaicina (Figura 17C e D). Quando Ph α 1 β e SB366791 foram adicionados juntamente ao meio de perfusão, a redução do transiente foi 67% a qual não foi estatisticamente diferente da redução causada pela Ph α 1 β sozinha ($P > 0,05$) (Figura 17D). Juntos esses dados mostram que o efeito inibitório da Ph α 1 β e do SB366791 se sobrepõe, sugerindo, pela primeira vez, uma forte evidência que a Ph α 1 β atua também em receptores TRPV1.

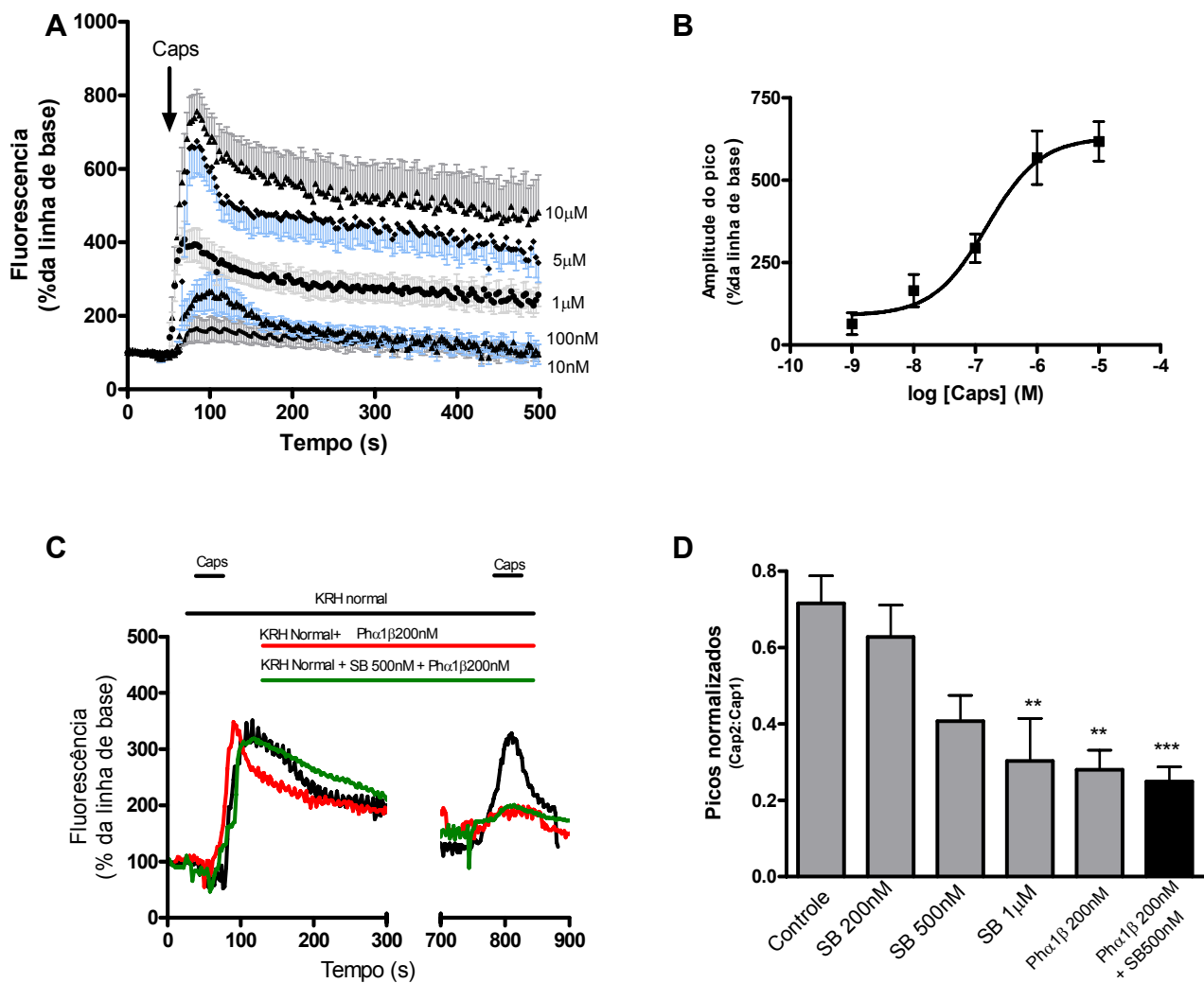


Figura 17 Ph α 1 β e SB366791 reduzem os transientes de Ca²⁺ induzidos por capsaicina em DRGs. (A) Variações curso-temporal das mudanças nos níveis de fluorescência induzidos por diferentes concentrações de capsaicina em DRGs de pequeno diâmetro. Pontos no gráfico representam média \pm E.P.M.. (B) Curva dose resposta em escala logarítmica da amplitude dos picos de fluorescência mostrados em A. (C) Traços representativos da fluorescência do corpo celular de neurônios estimulados 2 vezes com capsaicina 1 μ M. Linhas pretas mostram o controle em que células foram tratadas com meio normal, linhas vermelhas células foram incubadas com Ph α 1 β 200nM imediatamente após o 1^o estímulo com capsaicina, linha Ph α 1 β 200nM e SB366791 foram adicionadas em conjunto às células. Capsaicina era adicionada às células nos tempos indicados no gráfico. (D) Quantificação da amplitude relativa dos picos (Caps2: Caps1) diante dos diferentes tratamentos farmacológicos. Barras representam média \pm E.P.M. (** P<0.01; *** P<0.001).

4.7 Efeito da Ph α 1 β nos transientes de cálcio induzidos por capsaicina em DRGs de animais tratados com CFA

Para avaliar o perfil dos transientes de cálcio induzidos por capsaicina bem como o papel das ω -toxinas em DRGs num modelo de dor inflamatória persistente, neurônios do gânglio da raiz dorsal (ver métodos) foram obtidos de ratos que receberam CFA ou salina injetados via intraplantar. Três dias após a injeção de CFA ou salina, os ganglios eram coletados, tratados enzimaticamente, plaqueados e mantidos em cultura por 12/24 hs antes da realização dos experimentos de medidas nos níveis de cálcio com fluo-4. Durante os experimentos as células eram estimuladas com capsaicina em protocolo semelhante aos anteriores. Já que as mudanças de cálcio variam consideravelmente de acordo com as subpopulações de neurônios DRGs, apenas células de pequeno diâmetro e responsivas à capsaicina foram consideradas nas análises. A aplicação de capsaicina 1 μ M dispara nos neurônios elevação da $[Ca^{2+}]_i$ cuja amplitude foi consideravelmente maior ($P < 0,001$) em neurônios do grupo CFA em relação a neurônios do grupo salina (Figura 18A). A amplitude do pico no grupo salina foi $295 \pm 27\%$ da linha de base enquanto que no grupo CFA alcançou $593 \pm 54\%$ da linha de base após o estímulo com capsaicina (Figura 18B).

Para avaliar o efeito da Ph α 1 β e comparar com o efeito da ω -CgTxMVIIA, as toxinas eram adicionadas ao sistema de perfusão após o 1º estímulo e a resposta ao segundo estímulo com capsaicina era avaliada na presença das toxinas. No grupo salina, sobre condições controle (sem antagonistas), a relação caps 2:caps 1 foi $0,66 \pm 0,12$ (Figura 18C linha preta e Figura 18E) que não diferiu significativamente do valor encontrado para neurônios de animais CFA-tratados ($0,69 \pm 0,08$) (Figura 18D, linha preta e Figura 18F). Em DRGNs de animais salina e na presença de Ph α 1 β ou MVIIA (200nM) as relações Caps2:Caps1 encontradas foram $0,38 \pm 0,07$ e $0,26 \pm 0,07$, respectivamente (Figura 18C e E), enquanto que em DRGNs de animais CFA-tratados, $0,19 \pm 0,02$ e $0,30 \pm 0,10$ para Ph α 1 β ou MVIIA (200nM), respectivamente (Figura 18D e F). Assim, em animais tratados com CFA, a redução dos transientes de cálcio induzida por capsicina foi mais eficaz com a Ph α 1 β do que com a MVIIA ao passo que em animais salina os efeitos inibitórios foram equiparáveis. Juntos esses dados mostram que, em modelo de dor inflamatória

persistente, os transientes de $[Ca^{2+}]_i$ são mais expressivos nos neurônios em resposta à capsaicina. Além disso, tanto Ph α 1 β como MVIIA foram capazes de reduzir os transientes de $[Ca^{2+}]_i$ entretanto a Ph α 1 β mostrou mais eficácia que a ω -conotoxina MVIIA no grupo CFA.

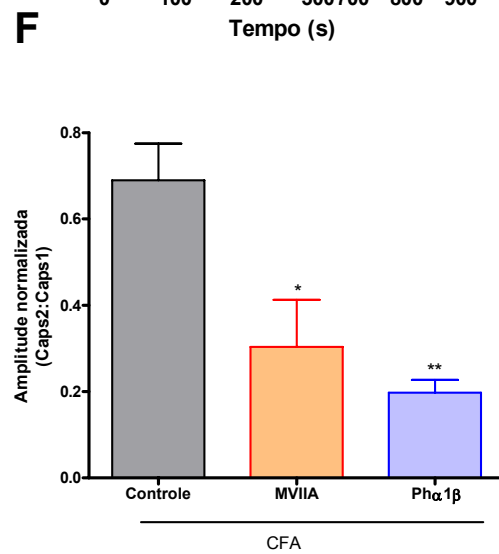
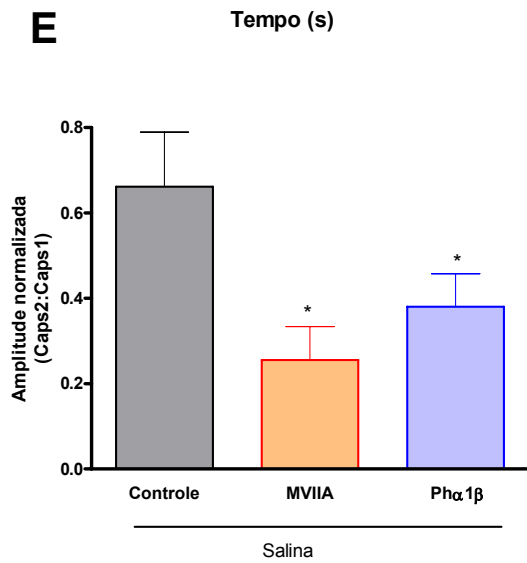
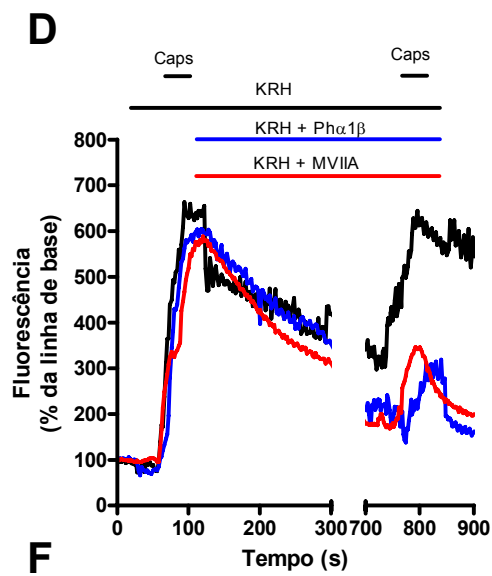
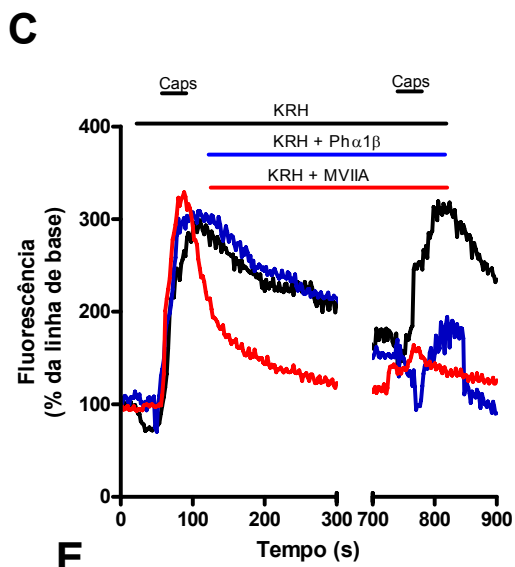
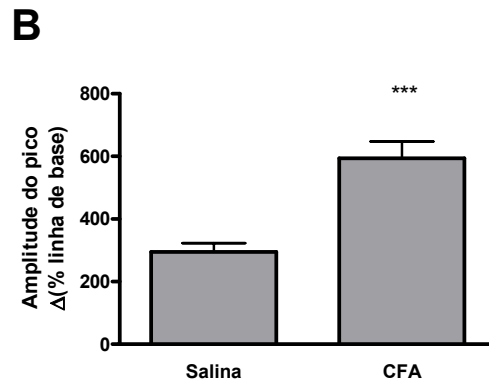
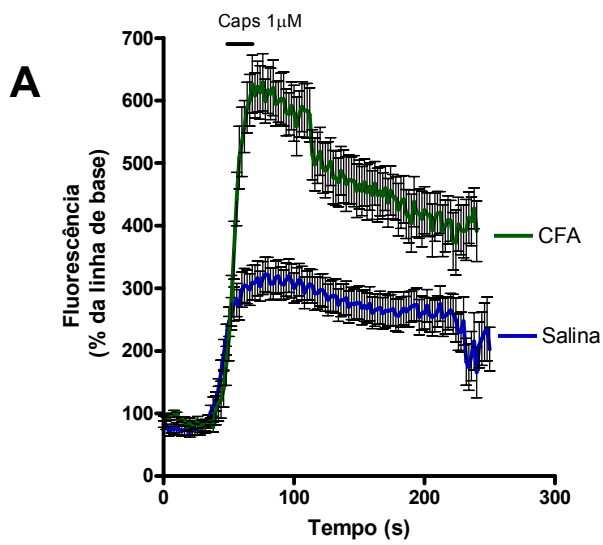


Figura 18 Efeitos da Ph α 1 β sobre os transientes de cálcio induzidos por capsaicina em DRGs após inflamação crônica induzida por CFA. Animais receberam por via intraplantar CFA ou Salina, após 48 horas era preparada a cultura de DRGs desses animais para as medidas por imagem dos níveis de cálcio. (A) Variação curso-temporal da fluorescência em neurônios estimulados com capsaicina (1 μ M) de animais controle (linha azul) ou tratados com CFA (linha verde). (B) Quantificação da amplitude dos picos de fluorescência mostrados em (A). (C) e (D) Traços representativos das variações dos níveis de fluorescência de células estimuladas 2 vezes com capsaicina em DRGs de animais salina (C) ou CFA (D). Linha preta controle sem toxina, Ph α 1 β (200nM) linha azul ou MVIIA (200nM) linha vermelha eram incubadas às células. (E) e (F) Quantificação da amplitude relativa dos picos (Caps2: Caps1), animais tratados com salina (E) ou CFA (F). Barras representam média \pm E.P.M. (*P<0.05 ** P<0.01 em relação ao controle).

4.8 Efeito das ω -phonetoxinas sobre o transiente da [Ca²⁺]_i induzido por capsaicina em células HEK293 transfectadas com o receptor vanilóide-1

Para verificar se as ω -phonetoxinas inibem a sinalização de cálcio por uma via relacionada ao receptor vanilóide-1 (VR1), células HEK293 estavelmente transfectadas com receptor vanilóide-1 humano (Hayes et al., 2000) foram utilizadas nos experimentos subsequentes. Após plaqueamento (ver métodos) nas lamínulas de perfusão, as células foram marcadas com fluo4/AM tal como descrito anteriormente para os DRGs, e estimuladas com o agonista específico de VR1, a capsaicina (Caterina et al., 1997). A adição de Capsaicina 0,1 nM induziu aumento de fluorescência virtualmente em todas as células analisadas (Figura 19 A e B). A adição de capsaicina 1nM e 500nM também induziu aumento na fluorescência, porém de intensidade não superior ao aumento observado com a concentração 0,1nM (dados não mostrados). Diferente do observado com os DRGNs, a capsaicina induziu aumento mais drástico dos níveis de cálcio registrado pelo aumento da fluorescência de até 15 vezes em relação à linha de base (figura 20A), porém, à semelhança dos DRGNs, um segundo estímulo de capsaicina 12 minutos após o 1º elicitava nas células novo aumento da [Ca²⁺]_i (Figura 20A) de amplitude média de 82 \pm 4% em relação ao primeiro estímulo (Figura 20A e F). Capsazepina 10 μ M

adicionada às células 10 min antes do 2º estímulo aboliu quase totalmente ($99\pm 5\%$ de inibição) o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ induzido por capsaicina (Figura 20B e F). Interessantemente, o SB366791 ($10\mu M$), antagonista seletivo de receptores TRPV1, causou menor efeito inibitório que a capsazepina porém significativo em relação ao controle ($32\pm 6\%$, $P < 0,05$) (Figura 20C e F). Na concentração de $100nM$ a $Ph\alpha 1\beta$ foi capaz de inibir de maneira significativa ($26\pm 5\%$, $P < 0,05$) o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 20D e F) o que não foi observado para a Tx3-4 ($100nM$) (Figura 20E e F). Juntos esses dados sugerem que o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ via ativação de receptor vanilóide tipo-1 possui um componente sensível à ω -phofoetoxina $Ph\alpha 1\beta$.

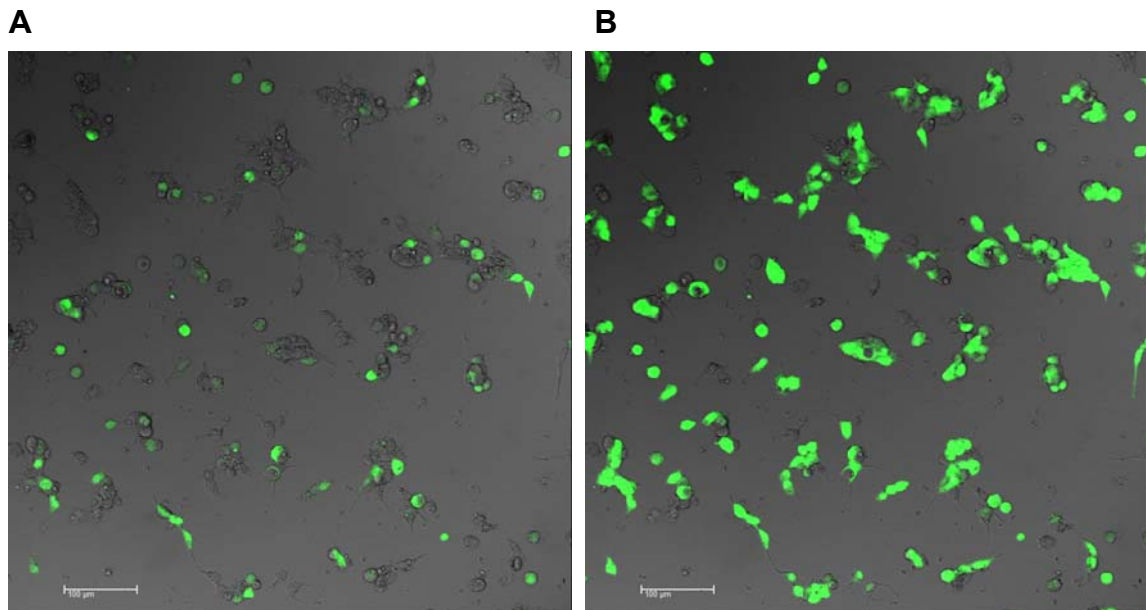


Figura 19 Variação dos níveis da cálcio em Células HEK293VR1 em resposta à capsaicina. Imagem de luz transmitida sobreposta à imagem de luz de fluorescência de células HEK293 transfectadas estavelmente com receptor vanilóide 1. As células foram marcadas com fluo-4AM. (A) antes da adição e (B) depois da adição de capsaicina 0,1nM. Barra de escala 1µM.

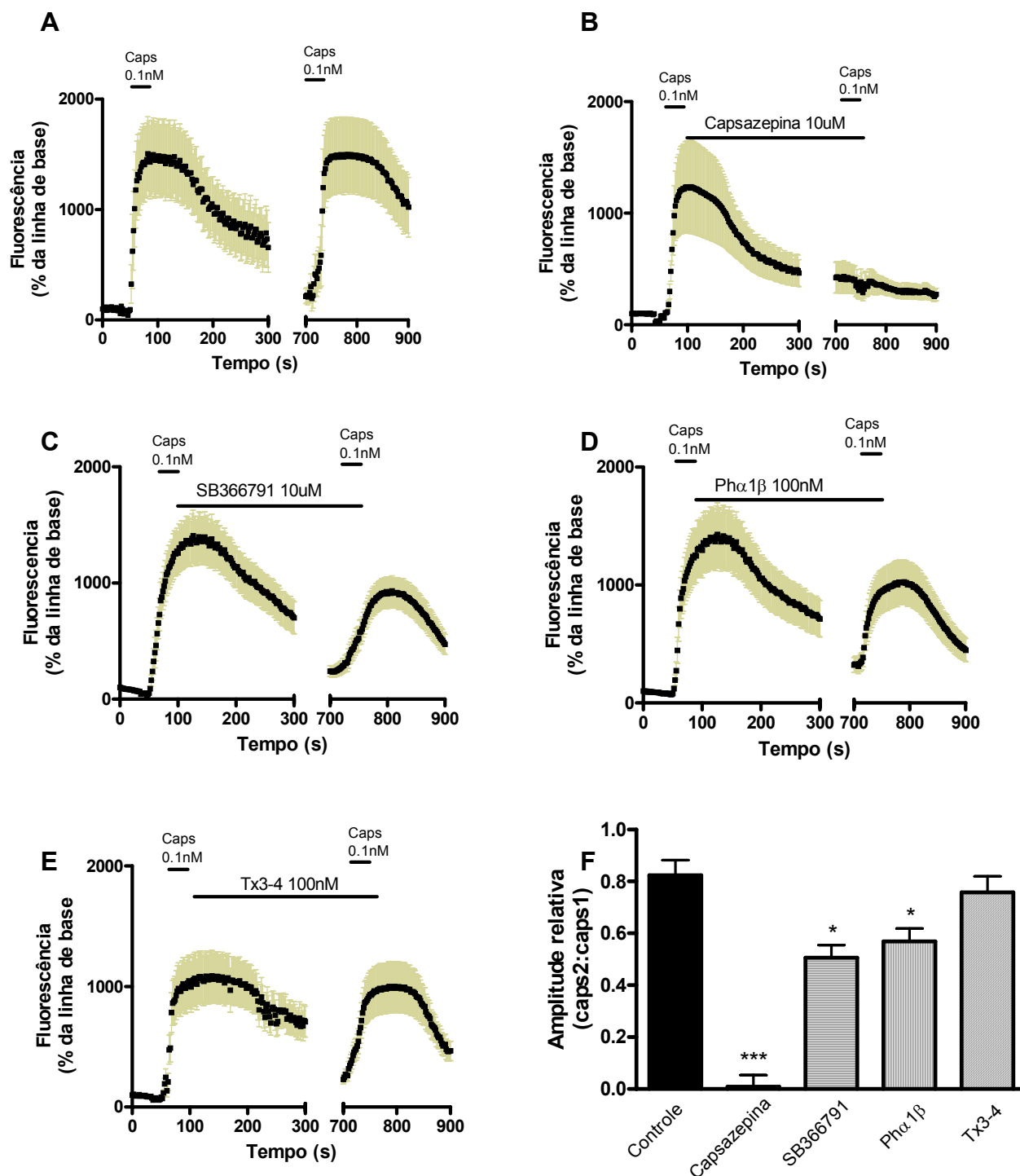


Figura 20 Efeito das ω -phenotoxinas nos transientes da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por capsaicina em células HEK293VR1. Células HEK293VR1 foram estimuladas duas vezes com capsaicina 0,1nM com intervalo de 12 minutos entre os estímulos. (A) Controle, (B) Capsazepina 10µM, (C) SB366791 10µM, (D) Phα1β 100nM e (E) Tx3-4 100nM foram adicionados no intervalo entre os estímulos. (F) Quantificação da relação entre a amplitude do primeiro e segundo estímulos. (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ em relação ao controle).

4.9 Ação das toxinas Ph α 1 β e Tx3-4 sobre isoformas de canais tipo-N contendo diferentes variantes de splicing do RNA mensageiro

4.9.1 Ph α 1 β e Tx3-4 inibem canais tipo-N impedindo bloqueio adicional da ω -conotoxina GVIA

Os testes farmacológicos das ω -phonetoxinas sobre as diferentes isoformas de canais Tipo-N codificadas por variantes de splicing alternativo foram conduzidos no laboratório da Dra. Diane Lipscombe nas dependências do departamento de neurociências da Brown University, Providence, Rhode Island, EUA, através da realização de estágio sandwich, financiado pelo CNPq. Durante o estágio, as duas principais ω -phonetoxinas que mostraram ação significativa sobre os níveis de cálcio em DGRs, foram testadas quanto às suas ações sobre as isoformas de canais tipo-N codificadas por variantes distintas de *splicing* alternativo de mRNA. Nos testes em sistema de expressão heteróloga, células TsA201 foram transfectadas com as subunidades auxiliares formadoras dos canais de cálcio sensíveis a voltagem (β_3 $\alpha_2\delta$), mais proteína fluorescente verde, mais a subunidade formadora do poro (α_1) contendo as variantes de splicing 37a ou 37b. Adiante no texto as variantes dos canais são referidas apenas como 37a ou 37b.

Inicialmente foi avaliado o perfil de inibição de Ph α 1 β e Tx3-4 sobre correntes de cálcio elicítadas por passos de despolarização (-80 a +10mV) intervalados entre 5 seg. Testadas em concentrações capazes de exercer efeito inibitório máximo em outros modelos experimentais (Vieira 2005, Dos santos, 2002), tanto Ph α 1 β e Tx3-4 inibiram significativamente as correntes de cálcio em células TsA201 transfectadas (Figura 21). O perfil inibitório foi semelhante nas células transfectadas com 37a e 37b. Após aplicação das toxinas a lavagem das células com solução externa por curtos períodos de tempo (30 a 60 segundos) não reverteu o bloqueio causado por ambas as toxinas, efeito observado e em ambas as variantes de splicing. A não reversibilidade do bloqueio foi observada também para períodos de lavagem de até 5 minutos (dados não mostrados). Interessantemente, a adição subsequente de ω -conotoxina GVIA (1 μ M), uma inibidora de correntes tipo-N que se liga ao poro do canal (McDonough et al., 2002), não causou efeito inibitório adicional das correntes de cálcio. Essa toxina, testada sozinha, inibiu praticamente 100% da resposta (Figura 21 E e F). Juntos esses dados mostram que as ω -phonetoxinas inibem de

maneira irreversível (na intensidade de estímulo testada) as correntes de cálcio em células transfectadas com canais tipo-N, independente da variante de splicing (37a ou 37b) contida no canal. E ainda, a ligação das ω -phonetoxinas impedem efeito inibitório adicional da GVIA sugerindo que as ω -phonetoxinas podem se ligar ao poro do canal.

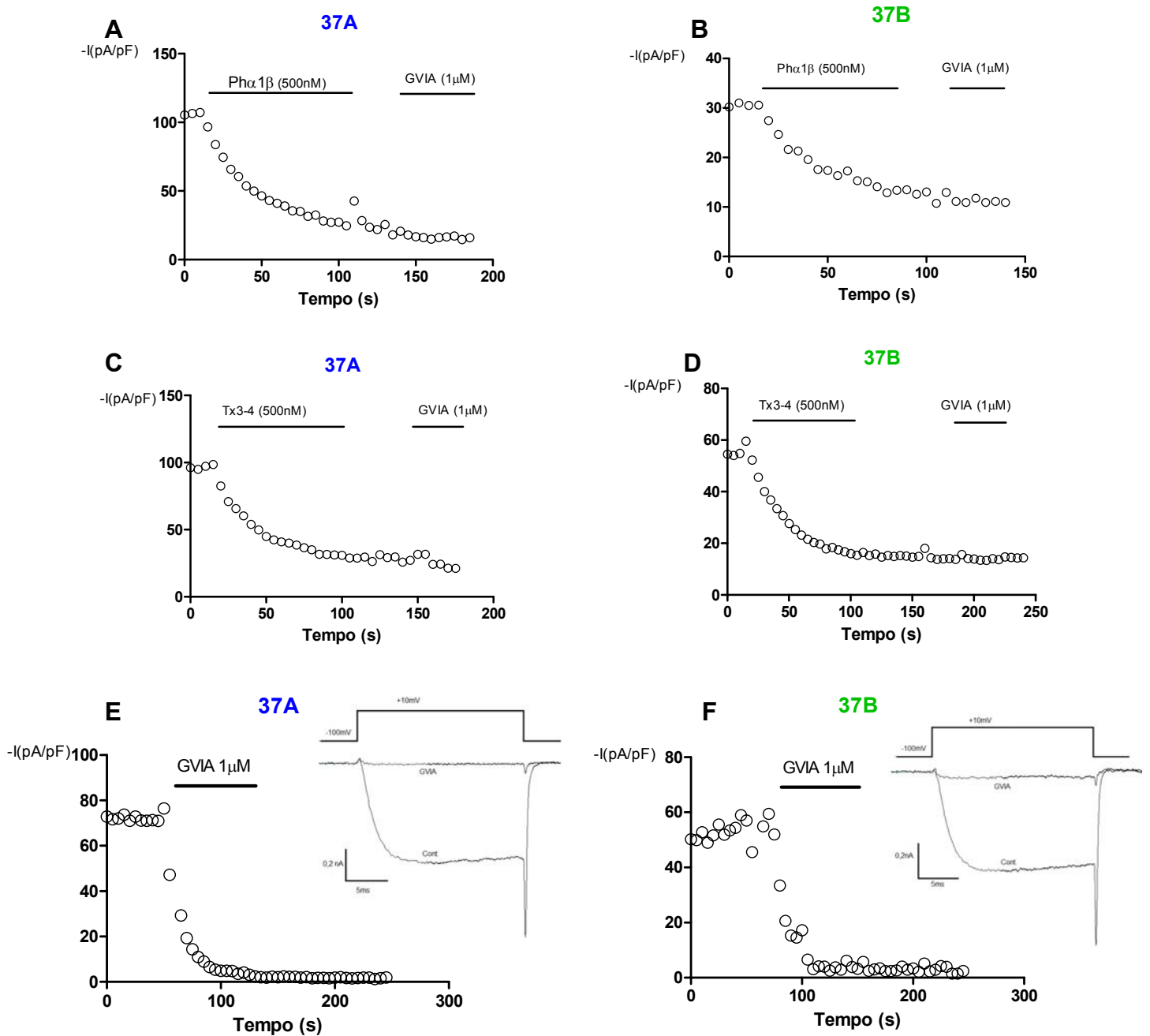


Figura 21 ω -phonetoxinas inibem correntes Tipo-N impedindo bloqueio adicional da ω -conotoxina GVIA. Traços dos picos da corrente normalizada pela capacitância (pA/pF) de células representativas, após estímulos de -100mV a +10mV. Células foram transfectadas previamente com as subunidades formadoras de canais Tipo-N contendo as isoformas 37a (gráficos A e C) ou a isoforma 37b (gráficos B e D). Os traços superiores os tratamentos com as toxinas e estão em correspondência com o tempo em que foram adicionadas. Observar que a ω -conotoxina GVIA não causou bloqueio adicional da corrente em nenhuma das condições experimentais. A e B, uso de $\text{Ph}\alpha 1\beta$; C e D, uso de Tx3-4. (E) e (F), em condições controle, a adição de GVIA 1 μM causou inibição praticamente completa da corrente iônica. *Inserts* mostram o registro da corrente após pulso despolarizante antes (Cont) e após (GVIA) a adição da ω -conotoxina.

4.9.2 Tx3-4 exerce bloqueio mais significativo em canais tipo-N contendo 37a

Em seguida foi avaliado como a intensidade de despolarização afeta o bloqueio da corrente causado pelas ω -phonetoxinas. Para esses testes foram aplicados protocolos corrente-voltagem (protocolo IV). Após obtenção do giga-selo, era aplicado uma série de pulsos (20ms de duração) de -60 até +100mV, partindo do potencial de repouso de -100mV (6 seg de intervalo, com a intensidade aumentando 5mV a cada pulso). Em cada célula testada, eram aplicados dois protocolos IV's: em condições controle (sem toxina) e após 3 minutos de aplicação da toxina. Os resultados são mostrados na figura 22.

Tx3-4 e Ph α 1 β inibiram significativamente as correntes de cálcio em ambas isoformas 37a e 37b, especialmente nos pulsos de despolarização entre -15 a +50mV. Em nenhuma situação, a presença das duas toxinas afetou o potencial de reversão dos canais (60mV nas condições testadas). Tanto em 37a como em 37b a inibição máxima das duas toxinas foi alcançada em pulsos de despolarização a +10mV (Ph α 1 β : 75,1 \pm 3,6% e 64,7 \pm 5% de inibição, 37a e 37b, respectivamente; Tx3-4: 76.8 \pm 1.7% e 64.9 \pm 10% de inibição, 37a e 37b, respectivamente) (Figura 22 A-D).

Entretanto, foi observada diferença na inibição causada pela Tx3-4, entre as isoformas de canais tipo-N 37a e 37b, de acordo com a intensidade de despolarização aplicada. Na figura 22 E e F são plotados, dos mesmos experimentos obtidos em A-D, os percentuais de inibição de acordo com o passo de despolarização aplicado. Em células transfectadas com 37b, despolarizações mais fortes foram capazes de reverter o efeito inibitório da Tx3-4 (Figura 22E) enquanto que em 37a, mesmo frente a pulsos despolarizantes de +100mV ainda era observado efeito inibitório significativo. A ação inibitória da toxina Ph α 1 β não mostrou efeito diferenciado entre as isoformas 37a e 37b de canais Tipo-N.

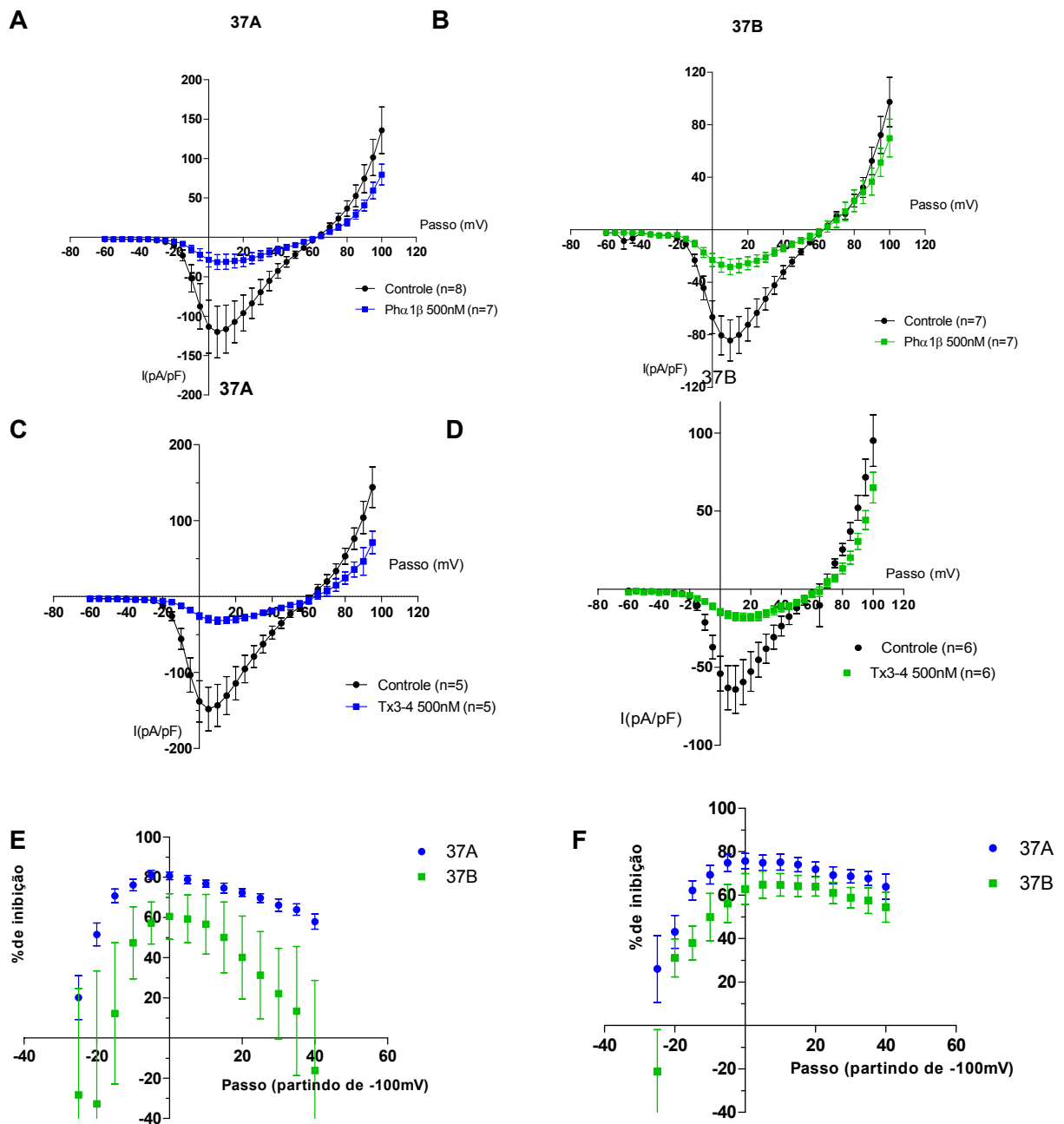


Figura 22 Ação diferencial da Tx3-4 sobre as isoformas 37a e 37b de splicing alternativo. Relações corrente-voltagem de células TsA201 expressando canais tipo-N contendo as isoformas 37a (A) e (C) ou 37b (B) e (D), testadas quanto a presença das ω -phonetoxinas Ph α 1 β (A) e (B) ou Tx3-4 (C) e (D). Partindo dos dados mostrados em A,B,C e D foram plotados os percentuais de inibição da corrente de acordo com a intensidade da despolarização para a Tx3-4 (E) e para a Ph α 1 β (F). Notar em (E) que potenciais de despolarização maiores reduzem, de maneira mais consistente o efeito inibitório da Tx3-4 na isoforma 37b dos canais tipo-N.

Os experimentos seguintes tiveram foco na toxina Tx3-4, para se quantificar a inibição (37a 37b) mas dessa vez em uma população maior de células e também, para determinar o parâmetro cinético Tau, que infere sobre a velocidade do bloqueio causado pela toxina nas correntes de cálcio (Figura 23). Nesses experimentos, células transfectadas eram submetidas a estímulos de +10mV (20ms de duração) em intervalos de 5 seg entre estímulos. Após estabilização da linha de base era aplicada a toxina e os registros feitos até a estabilização do pico da corrente após o efeito inibitório.

Tx3-4 inibiu $79.9 \pm 2.4\%$ da amplitude da corrente em canais contendo a isoforma 37a, contra $69.6 \pm 2.9\%$ em 37b, diferença estatisticamente significativa pelo teste t de student ($P < 0.05$). O parâmetro Tau, que indica o tempo necessário para alcançar 66% da inibição máxima, foi 61 ± 8 e 107 ± 24 seg para a isoforma 37a e 37b, respectivamente. Juntos esses dados sugerem avidéz maior da Tx3-4 por canais tipo-N em que a variante de splincing 37a está presente.

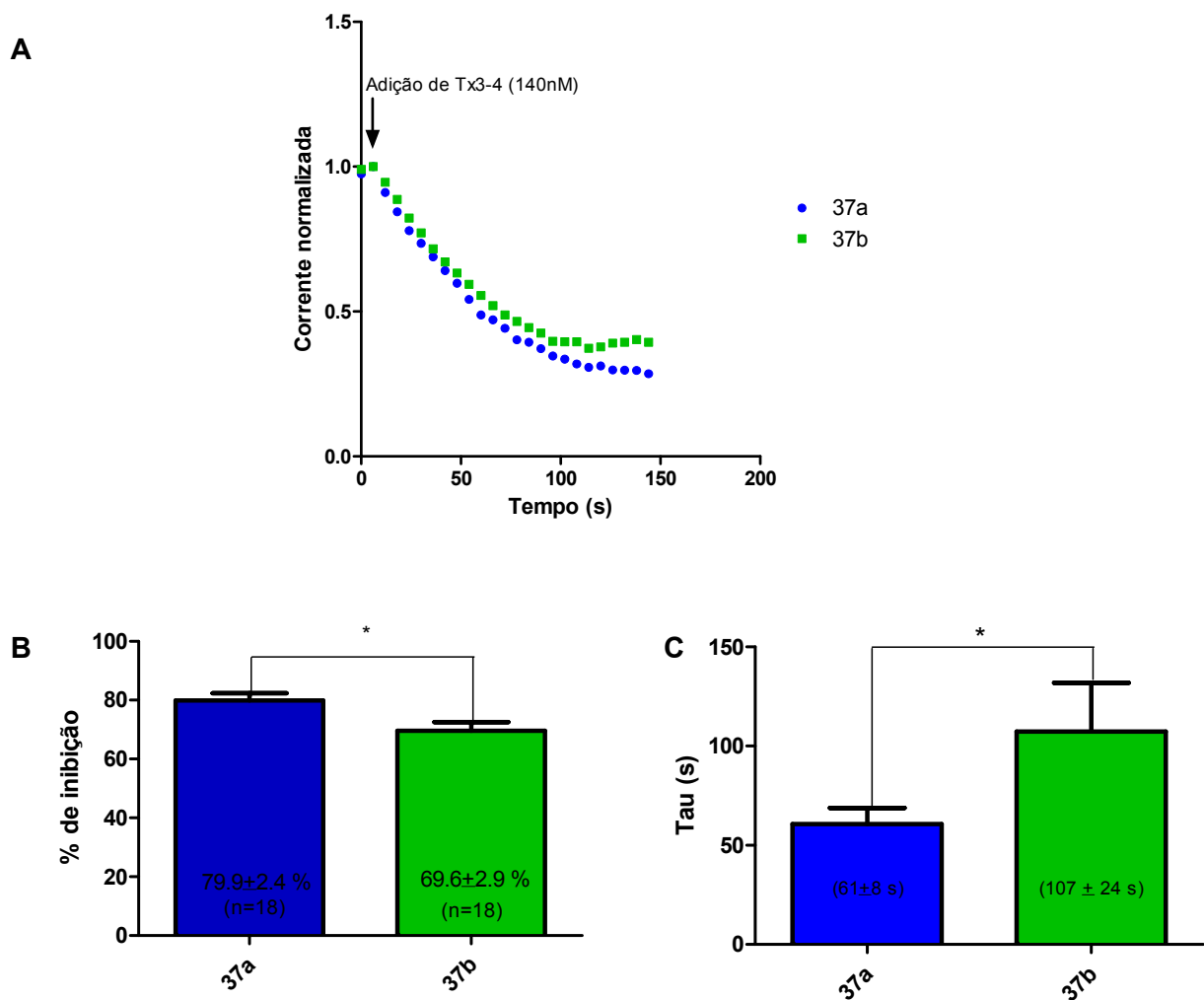


Figura 23 Cinética de inibição da Tx3-4 sobre as isoformas 37a e 37b dos canais de cálcio tipo-N. (A) Traços da média das correntes após pulsos despolarizantes (-80 a +10mV, 20ms de duração), intervalo de 6 seg entre pulsos. Correntes são normalizadas pelo valor imediatamente antes da aplicação da toxina. (B) Quantificação da inibição após estabilização da corrente comparando-se entre as isoformas de canal tipo-N 37a e 37b. Barras indicam média \pm EPM. (C) Tau do efeito da Tx3-4 comparando-se entre as isoformas 37a e 37b. Tau foi obtida através do fitting não-linear dos traços em cada célula testada. Para o fitting foi usada equação de decaimento exponencial de uma fase: $Y = (Y_0 - \text{plateau}) \cdot \exp(-K \cdot X)$, onde K é o inverso de Tau. Barras indicam média \pm EPM. (* $P < 0,05$).

4.9.3 Relação concentração-resposta do efeito inibitório de Ph α 1 β e Tx3-4 sobre 37a e 37b

Curvas concentração-resposta foram construídas para avaliar a potência do efeito inibitório das toxinas Ph α 1 β e Tx3-4 sobre as correntes de cálcio mediadas por pulsos despolarizantes (-100 a +10mV) em células TsA201 transfectadas com 37a ou 37b. Pulsos de 20ms eram dados em intervalos de 5s num período de em média 10min de registro. Ao longo do tempo a concentração da toxina era aumentada às células (Figura 24 e Figura 25). Ph α 1 β apresentou IC₅₀ de 211 e 114nM nas isoformas 37a e 37b, respectivamente. Já a Tx3-4 os CI's₅₀ encontrados foram 59 e 106nM para 37a e 37b, respectivamente. Ainda que os valores encontrados foram dentro da mesma ordem de grandeza, a Tx3-4 apresentou IC₅₀ ligeiramente menor para a isoforma 37a que para 37b, sugerindo potência de inibição maior dessa toxina para 37a. Além do mais, na concentração de 2nM o efeito inibitório da Tx3-4 foi significativamente maior (P<0.05) na isoforma 37a.

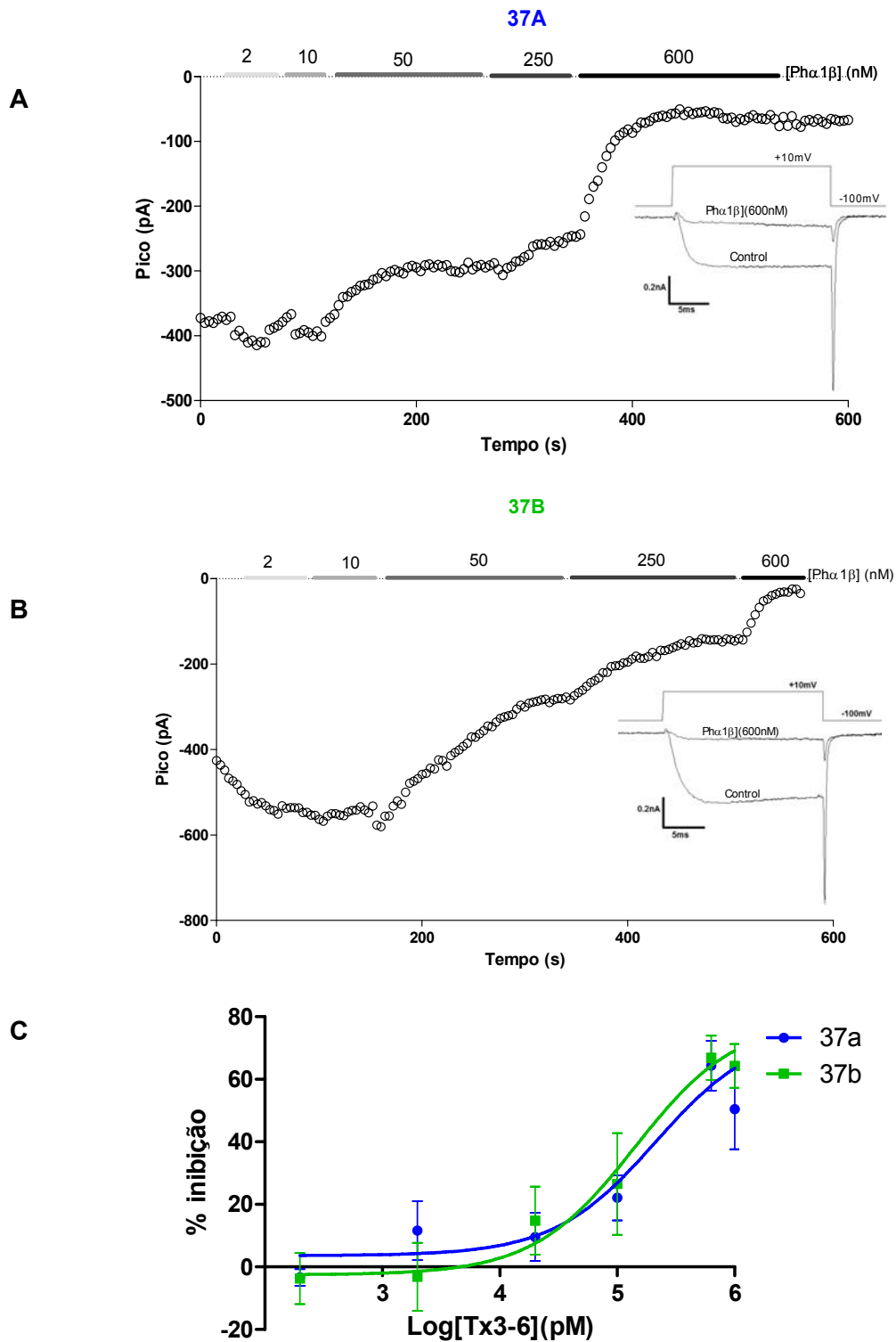


Figura 24 Relações dose-resposta do efeito inibitório da ω -phorbotoxina Ph α 1 β sobre canais de cálcio tipo-N. Gráficos (A) e (B) mostram picos negativos da corrente gerados por pulsos de 20ms (-100 a +10mV) (5s de intervalo entre estímulos). Ph α 1 β foi aplicada nas células por sistema de perfusão nos tempos e concentrações esquematizados no gráfico (A) e (B): 37a e 37b, respectivamente. A curva dose-resposta é mostrada em (C). Pontos significam média \pm EPM.

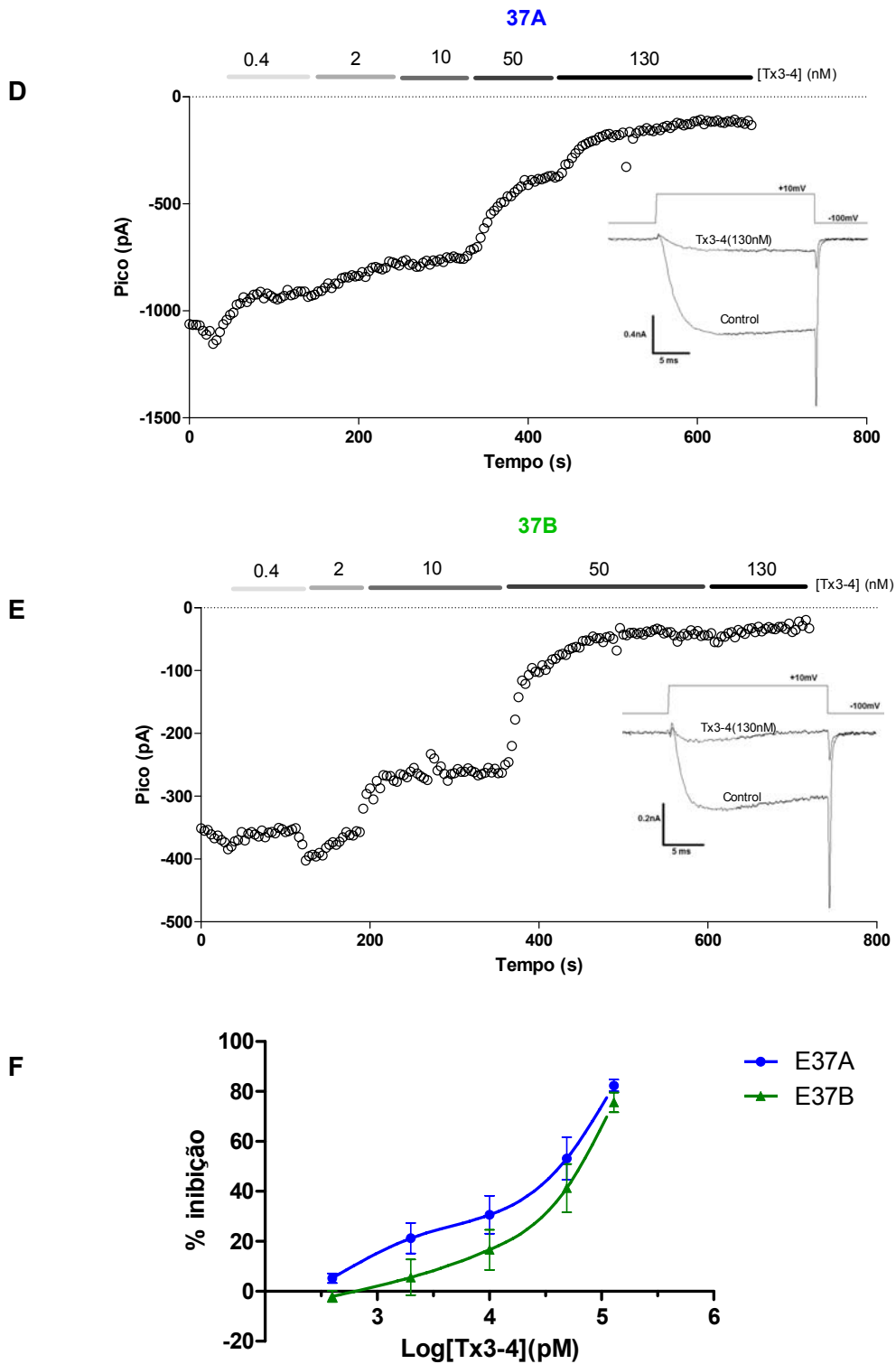


Figura 25 Relações dose-resposta do efeito inibitório da ω -phentoxina Tx3-4 sobre canais de cálcio tipo-N. Gráficos (A) e (B) mostram picos negativos da corrente gerados por pulsos de 20ms (-100 a +10mV) (5s de intervalo entre estímulos). Phd1 β foi aplicada nas células por sistema de perfusão nos tempos e concentrações esquematizados no gráfico (A) e (B): 37a e 37b, respectivamente. A curva dose-resposta é mostrada em (C). Pontos significam média \pm EPM.

4.9.4 Efeito da Tx3-4 sobre correntes de cálcio em DRG's de camundongos sem a isoforma 37a

Em seguida estudamos qual a consequência, sobre nociceptores *in vitro*, da Tx3-4 exercer bloqueio ligeiramente superior em canais tipo-N contendo a isoforma 37a de *splicing* alternativo. Para isso, foram preparadas culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG's) de camundongos selvagem (WT) e de camundongos cujo o éxon que codifica a 37a da subunidade $\alpha 1$ foi substituído, em homozigose, pelo éxon que codifica a isoforma 37b (Andrade et al., 2010), no texto denominados apenas como bb.

Relações corrente-voltagem foram construídas para células dos dois genótipos (Figura 26, A e B). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa no perfil de inibição da Tx3-4, nem tampouco nas densidades das correntes entre os dois tipos de células selvagem e bb, tal como já havia sido descrito previamente (Andrade et al., 2010). Contudo, ainda que de maneira não significativa, foi observado que a Tx3-4 causou pequena inibição sobre as células de animais selvagem, o que não foi observado para bb (Figura 26A e B). Isso nos levou a abordar a ação da Tx3-4 num protocolo com pulso de despolarização de intensidade única (-80 a +10mV), e dessa vez analisando população maior de células. A toxina Tx3-4 inibiu as correntes de cálcio ($30,8 \pm 5,0$ e $24,0 \pm 2,2\%$, wt e bb, respectivamente; $p = 0,1905$). Apesar da média da inibição da Tx3-4 entre os grupos WT e bb não ter sido estatisticamente significativa no intervalo de confiança de 95% ($p = 0,1905$), a variância entre os grupos o foi ($F=3,955$; $p = 0,0038$). A plotagem por Scatter e o gráfico da distribuição por frequência revelam, para animais WT, dois grupos de células relativamente distintos quanto ao percentual de inibição (Figura 26 E): um com percentual de inibição com média em torno de 20% e outro, em torno de 50%. Juntos, esses dados levantam a hipótese de que em animais bb, a ausência de nociceptores contendo a isoforma 37a, tenha contribuído para a não-observância de um grupo de células mais significativamente inibidas pela toxina Tx3-4.

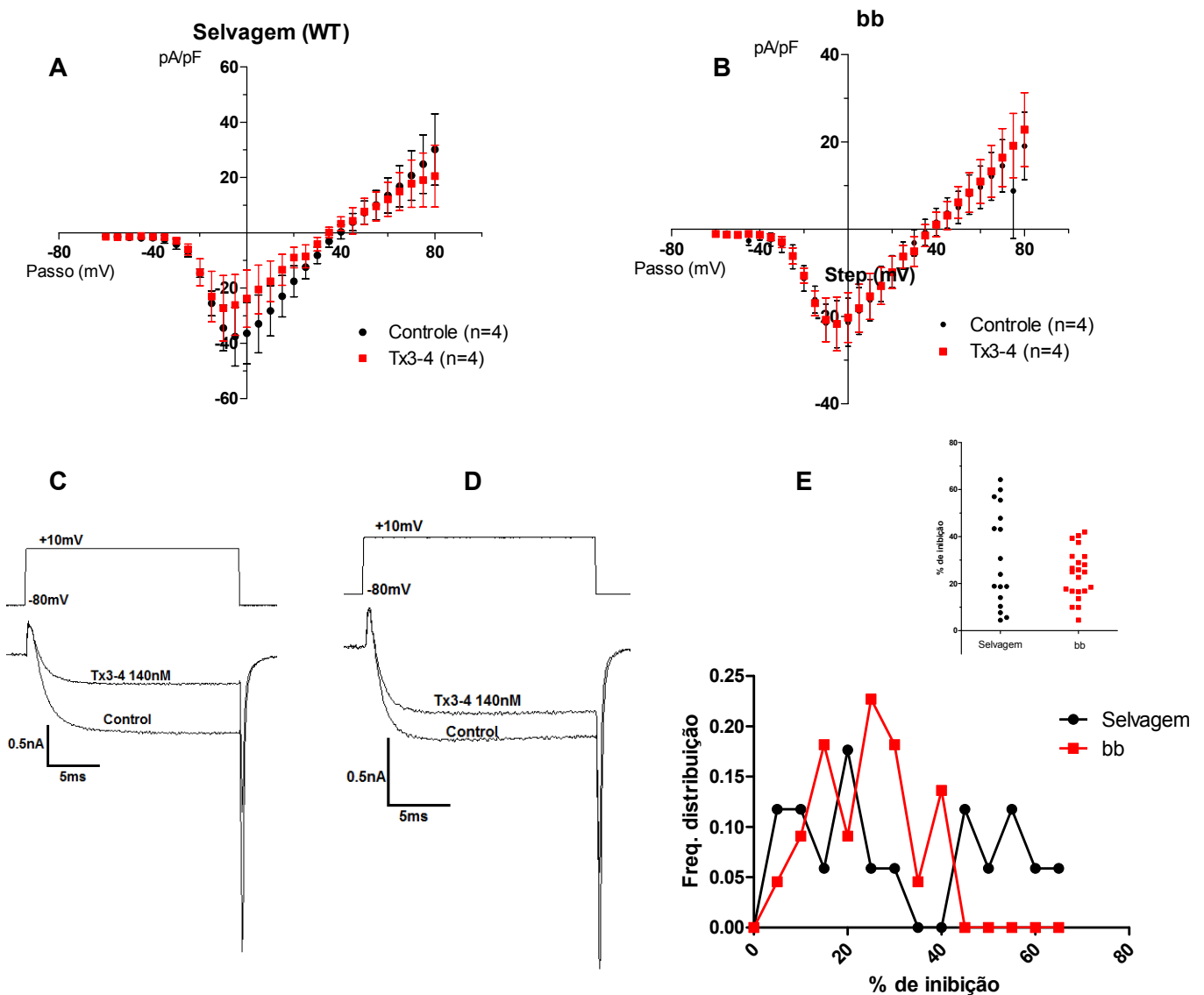


Figura 26 Tx3-4 inibe diferencialmente correntes de cálcio em DRG's sem a isoforma 37a de canais tipo-N. (A e B) Relações corrente-voltagem de neurônios-DRG obtidos de camundongos selvagem (A) e de camundongos deletados para a isoforma 37a de canais de cálcio (Andrade, 2010), aqui denominados *bb* (B) (pontos indicam média \pm E.P.M.). Pontos pretos indicam traços de células perfundidas continuamente com meio normal, Pontos vermelhos, as mesmas células perfundidas com Tx3-4 140nM. Pontos denotam média \pm EPM. C e D mostram traços representativos da corrente em DRGs antes e após adição de Tx3-4 nM, (C) Animal selvagem e (D) Animal *bb*. A quantificação da inibição do pico da corrente de toda a população de células analisadas é mostrado em (E). No *insert*, plotagem tipo Scatter mostrando o percentual de inibição de todas as células testadas de animais selvagem (preto) e *bb* (cinza). Abaixo a distribuição de frequência de acordo com a porcentagem de inibição. Notar a existência de dois grupos distintos quanto à percentagem de inibição nos DRGs de camundongos selvagem enquanto que para *bb* a curva apresentase como uma gaussiana simples.

5.1 Estudos das medidas dos níveis de $[Ca^{2+}]_i$ em DRG's

A população de neurônios sensoriais aferentes, cujos corpos celulares são abrigados nos gânglios da raiz dorsal, é bastante diversificada tanto do ponto de vista funcional quanto ao perfil de expressão e atividade de marcadores moleculares, por exemplo canais iônicos e das proteínas de membrana (Cardenas et al., 1995; Lu et al., 2006). O estudo da cinética de cálcio nessas células requer controle rígido e meticuloso de todas as condições experimentais. Nesse trabalho a adequação criteriosa do sistema de perfusão foi imprescindível para melhor analisar as respostas das células e reduzir os equívocos no momento de análises dos resultados. Por exemplo para se fazer distinção entre as respostas das células disparada pelo estímulo químico (KCl ou capsaicina) da resposta desencadeada por ativação de mecanorreceptores, o fluxo das soluções pelas diferentes sondas era rigidamente controlado e padronizado para impedir que variações de pressão pudessem desencadear respostas não específicas nas células. Por exemplo, quando as células eram estimuladas com o meio KRH normal mas injetado manualmente com auxílio de seringa era observado o aumento dos níveis de cálcio em muitas células (dados não mostrados), o que fez com que abolíssemos essa forma de introdução de agonistas nas células.

Em todos os experimentos as respostas dos neurônios (medidas pelo aumento dos níveis de cálcio em resposta aos agonistas) era sempre muito variada seja quanto à amplitude como também quanto ao perfil de decaimento da fluorescência. Neurônios de grande diâmetro apresentaram picos com amplitude média 3,5 vezes em relação à linha de base enquanto que neurônios pequenos 5,0 vezes (figura 16). A recuperação da fluorescência após retirada do KCl ocorria mais rápida em neurônios grandes. Esses dados são consistentes com estudos feitos por Lu e cols. (2006) e sugerem que existem diferenças entre subpopulações de neurônios DRGs a respeito dos mecanismos que regem a regulação da $[Ca^{2+}]_i$. Em neurônios DRGs estimulados com KCl, os transientes de cálcio menores e de decaimento mais rápido foram característicos de neurônios de maior diâmetro, IB4 negativos e não responsivos à capsaicina, enquanto que a magnitude foi maior e o decaimento foi mais lento em neurônios IB4+ e responsivos à capsaicina. Essas diferenças não foram devidas a uma distribuição diferencial de correntes de Ca^{2+}

sensíveis a voltagem, mas sim a uma contribuição diferencial de outros mecanismos de influxo, efluxo e de captação de cálcio. Essas diferenças não são associadas a diferenças nas densidades de CCSV's e nem de liberação de cálcio induzidas por receptores de rianodina, por outro lado a função da mitocôndria, SERCA e entrada de cálcio controlada por estoque tem contribuição nessa diferença entre os mecanismos controladores da $[Ca^{2+}]_i$ em diferentes subpopulações de neurônios aferentes (Lu et al., 2006). Fibras sensoriais não nociceptivas concentram-se em neurônios de grande diâmetro enquanto que fibras nociceptivas concentram-se mais em neurônios de menor diâmetro (Julius and Basbaum, 2001). Juntos, esses resultados corroboram a idéia de que maior atividade seria requerida e portanto mecanismos de captação de cálcio mais eficientes em neurônios grandes (aferentes não nociceptivos) que em neurônios pequenos (nociceptivos).

É bem conhecido que bloqueadores dos canais de cálcio sensíveis a voltagem são capazes de inibir transientes de cálcio elicitados por agentes despolarizantes em modelos *ex-vivo* de neurotransmissão (Guatimosim et al., 1997; Meder et al., 1997; de Castro Junior et al., 2008) entretanto, pouco se conhece sobre o efeito do cádmio em modelo de imagem dos níveis de cálcio em DRGs. Antes de avaliar o efeito das toxinas quisemos avaliar o efeito de um bloqueador inespecífico de correntes de cálcio e de um bloqueador específico de correntes Tipo-N: Cádmio e ω -conotoxina MVIIA, respectivamente. Ambos foram eficazes em inibir os transientes de cálcio induzidos por KCl. O subtipo de canal de cálcio sensível à voltagem majoritariamente encontrado em DRGs são canais tipo-N (Cardenas et al., 1995; Westenbroek et al., 1998), isso corrobora o efeito observado com a MVIIA, bloqueador específico Tipo-N, que inibiu de maneira considerável o transiente de cálcio induzido por KCl em DRGs. O cádmio é um inibidor da liberação estimulada de neurotransmissores em outros modelos de neurotransmissão inibindo de maneira inespecífica correntes de cálcio reguladas por alta voltagem. Na junção neuromuscular do nervo ciático com o músculo *sartorius*, o Cádmio (em baixas concentrações) antagonizou a liberação de acetilcolina de terminais nervosos por antagonizar o influxo de cálcio (Cooper and Manalis, 1984), já em sinaptosomas de córtex cerebral, o cádmio inibe a excitação associada ao influxo de cálcio após despolarização com KCl. Interessantemente, a despeito da ação inibitória do cádmio, conforme mostrado em nossos experimentos, os níveis de fluorescência

após lavagem do KCl e na presença do Cádmiu, não retornavam a valores basais (Figura 10). O Fluo-4 apesar de apresentar elevada afinidade a íons cálcio, também tem suas propriedades de fluorescência alteradas na presença de outros íons divalentes como Mg^{2+} e Cd^{2+} (Tsien, 1988). A presença de Cádmiu se por um lado bloqueou correntes de cálcio nos DRGs, por outro pode ter contribuído para manter os níveis de fluorescência elevados por interagir diretamente com o Fluo4.

Nas concentrações testadas, nem a Tx3-3 nem a Tx3-5, foram eficazes em inibir os transientes de cálcio em DRGs induzidos por KCl. A Tx3-3 também conhecida por PnTx3-3 (Leao et al., 2000) é uma das toxinas obtidas do pool Tx3 que se mostrou capaz de inibir a liberação de glutamato e o influxo de cálcio em sinaptosomas cérebro corticais despolarizados com KCl (Prado et al., 1996), além disso ela inibiu a exocitose de vesículas sinápticas também em terminais centrais, um evento diretamente associado ao influxo de cálcio por canais tipo P/Q (Guatimosim et al., 1997). Confirmando essa hipótese Leão e cols. (2000) avaliaram o efeito da PnTx3-3 sobre correntes de cálcio sensíveis a alta voltagem em neurônios cerebelares granulares e em células N18 e mostraram que a PnTx3-3 inibe essas correntes com maior especificidade para as correntes tipo P/Q (Leão et al., 2000). Até o momento nenhuma ação farmacológica foi encontrada para a toxina Tx3-5. Apesar do elevado grau de homologia estrutural com as outras toxinas do pool Tx3 (Gomez et al., 2002) a Tx3-5 não inibiu nem o aumento de cálcio nem a liberação de glutamato em terminais centrais (sinaptosomas) despolarizados com KCl (Prado et al., 1996). Na concentração de 200nM a Tx3-3 e as demais ω -toxinas do pool Tx3 eram capazes de exercer seus efeitos inibitórios máximos sobre correntes de cálcio reguladas por alta voltagem. A ausência de efeito inibitório sobre os transientes de cálcio induzidos por KCl em DRGs pode estar associado à não especificidade dessas duas toxinas sobre correntes de cálcio tipo-N.

Por outro lado, a ω -toxina Tx3-4 inibiu quase a totalidade do transiente de cálcio nas células após estimulação com KCl, efeito esse que se mostrou reversível após lavagem da toxina do meio (Figura 13). A toxina Tx3-4 junto com a Tx3-3 são as mais potentes do pool tx3 em inibir o influxo de cálcio em terminais centrais (Gomez, 2002). Diferente da Tx3-3, a Tx3-4 atua marcadamente em correntes de cálcio sensíveis a alta voltagem Tipo-N além de atuar também em P/Q (Dos Santos, 2002). Seu mecanismo de ação mais indiscriminado em relação ao bloqueio de

correntes de cálcio sensíveis a voltagem pode ter contribuído para a elevada inibição do transiente de cálcio em DRGs. Em terminais centrais seu efeito também parece ter relação com o bloqueio de correntes tipo-N já que o bloqueio da excitose exercido pela Tx3-4 não mostrou efeito aditivo junto com a ω -CgTxGVIA, outra ω -conotoxina bloqueadora de correntes de cálcio tipo-N (de Castro Junior et al., 2008). Em junção neuromuscular de rã, modelo em que a corrente de cálcio tipo-N é a principal controladora da liberação de neurotransmissores, a Tx3-4 inibiu a liberação estimulada de neurotransmissores em até 95%, porém sem exercer efeito sobre a liberação espontânea. Esse efeito era reversível quando a toxina era lavada em meio contendo elevada concentração de cálcio (Troncone et al., 2003) o que vai de encontro com os dados obtidos com essa toxina no modelo de DRGs em que as células respondiam novamente ao KCl quando a toxina era lavada do meio.

O bloqueio eficaz da Tx3-4 sobre transientes de cálcio em DRGs e sua ação não discriminativa sobre correntes de cálcio sensíveis a alta voltagem vem justificando o uso dessa toxina em diversos modelos patológicos *in vivo*. A Tx3-4 foi capaz de reduzir a morte neuronal *in vitro* em fatias de hipocampo submetidas à deprivação de oxigênio e glicose (Pinheiro et al., 2009) além de reverter em parte, os efeitos deletérios em ratos num modelo de isquemia cerebral *in vivo* (Maira e cols. 2009, dados não publicados). Quando injetada por via intratecal em ratos, a Tx3-4 causou antinocicepção em modelo de dor aguda química (teste da formalina), entretanto apresentou efeitos tóxicos como paralisia flácida em doses muito próximas das doses para efeitos antinociceptivos (Figueira, 2009, dados não publicados).

Os resultados obtidos com a toxina Ph α 1 β são consistentes com os estudos previamente realizados por nosso grupo que mostraram o potencial antinociceptivo dessa toxina. Com esse trabalho, foi mostrado que a ação antinociceptiva da Ph α 1 β está de fato associada à inibição da sinalização de cálcio induzida em neurônios aferentes. Entretanto, o efeito inibitório da Ph α 1 β sobre os níveis de cálcio elicitados por KCl foi mais eficiente em neurônios pequenos (<30 μ M) que em neurônios de grande (>30 μ M) diâmetro. Os neurônios dos gânglios da raiz dorsal são classificados em subpopulações distintas tanto morfológica como funcionalmente (Julius and Basbaum, 2001; Lu et al., 2006; Woolf and Ma, 2007). Essa divisão funcional justifica em parte como diferentes células distinguem entre

diferentes estímulos, por exemplo entre um estímulo doloroso e um estímulo tátil. Os nociceptores são, predominantemente, neurônios pequenos os quais concentram maior proporção de canais tipo-N dentre os demais canais de cálcio sensíveis a alta voltagem, além de apresentarem potenciais de ação de mais longa duração em relação à neurônios DRGs de grande diâmetro (Cardenas et al., 1995). Nossos dados obtidos no modelo de cultura primária vão ao encontro dos dados obtidos em modelo de expressão heteróloga de canais de cálcio em que também foi mostrada a ação da Ph α 1 β favorável ao bloqueio de correntes tipo-N (Vieira et al., 2005). Juntos esses dados sugerem que a Ph α 1 β inibe o influxo de cálcio mais direcionada para vias nociceptivas.

É bem conhecido que a capsaicina induz transientes de cálcio em neurônios DRGs (Eun et al., 2001), além do mais a sensibilidade à capsaicina é considerada um dos principais referenciais farmacológicos para a identificação da população de neurônios sensoriais nociceptivos. Nesse estudo, pela primeira vez, nós mostramos que a Ph α 1 β causou efeito inibitório marcante nos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ induzidos pela substância algogênica capsaicina. Em vista da limitação da disponibilidade da Ph α 1 β e da elevada quantidade de toxina necessária para os experimentos utilizando perfusão acoplada ao microscópio confocal, não foram constituídas curvas dose-resposta para as toxinas do pool Tx3. Entretanto, pode-se dizer que o efeito inibitório da Ph α 1 β foi pelo menos 5 vezes mais potente que o efeito inibitório do antagonista seletivo de receptor vaniloide SB-366791 (Gunthorpe et al., 2004). Ainda, a ausência de efeito inibitório aditivo observado quando Ph α 1 β e SB-366791 eram adicionados juntos às células sugere que a Ph α 1 β atua na inibição da via nociceptiva por um caminho relacionado à ativação de receptor vaniloide TRPV1.

Tem sido relatado que a inflamação persistente é associada à mudanças nas propriedades dos neurônios aferentes variando da excitabilidade até a liberação de transmissores culminando com a sensibilização dessas células. Os mediadores químicos liberados no sítio da inflamação sensibilizam os nociceptores reduzindo assim o limiar e a responsividade dessas células. Essas alterações de responsividade estão ligadas diretamente à alterações nas propriedades dos canais iônicos presentes nos nociceptores (Woolf and Ma, 2007). De acordo com nossos dados, a indução da inflamação pelo CFA elevou a amplitude dos transientes de cálcio evocados por capsaicina comparado aos neurônios de animais tratados com

salina. Em experimento similar, Lu e cols. (2008) observaram que o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzida por KCl é maior na inflamação persistente induzida por CFA, especialmente em neurônios pequenos e responsivos à capsaicina (Lu and Gold, 2008). Também, a inflamação por CFA induz aumento da expressão de receptores TRPV1 em gânglios da raiz dorsal, observável a partir do primeiro dia após administração de CFA (Lu and Gold, 2008). Para avaliar se a inflamação persistente estava associada com mudanças no perfil de ação da $Ph\alpha 1\beta$, os neurônios DRGs foram estimulados com capsaina na presença da toxina. O efeito inibitório da $Ph\alpha 1\beta$ foi mais acentuado em neurônios de animais CFA que em animais salina enquanto que para MVIIA o efeito inibitório foi equiparável entre CFA e salina sugerindo que essas duas toxinas interferem na sinalização de cálcio por diferentes mecanismos diante da sensibilização dos nociceptores induzida por CFA. Também já é descrito que a inflamação persistente induzida por CFA está associada com aumento da expressão de receptores TRPV1 em DRGs (Yu et al., 2008). Com esses resultados não se pode entretanto inferir se o aumento da expressão de receptores TRPV1 induzida pela inflamação é o que medeia o efeito inibitório final maior da $Ph\alpha 1\beta$ sobre os transientes de $[Ca^{2+}]_i$ induzido por capsaicina já que a sinalização de cálcio disparada por capsaicina em modelos de neurotransmissão *ex vivo* como em DRGs envolve uma gama de outros sistemas regulatórios intracelulares dos níveis de cálcio incluindo ativação de proteínas quinase, liberação de cálcio do retículo endoplasmático, canais de cálcio operados por estoque, e até mesmo os CCSVs (Hagenacker et al., 2008). Contudo, a ação mais eficaz da $Ph\alpha 1\beta$ nos DRGs de animais CFA sugerem que essa toxina pode ser uma atraente escolha no tratamento da dor associada a estados inflamatórios.

Os dados iniciais com as ω -phonetoxinas $Ph\alpha 1\beta$ e Tx3-4 utilizando o modelo de cultura primária de DRGs sugeriram que essas toxinas inibem marcadamente o transiente induzido da $[Ca^{2+}]_i$, um evento chave na transmissão da informação nócica pelo sistema nervoso aferente. Apesar dos canais de cálcio tipo-N terem papel fundamental nesse evento, varios outros alvos moleculares como receptores vanilóides, canais de cálcio sensíveis a ácido, canais de cálcio tipo-T, canais de sódio sensíveis a voltagem, dentre outros também controlam e modulam essa importante função (Lee et al., 2005; Woolf and Ma, 2007; Basbaum et al., 2009; Zamponi et al., 2009). A ação inibitória da $Ph\alpha 1\beta$ sobre o aumento da $[Ca^{2+}]_i$

induzido por capsaicina, o efeito inibitório mais marcante em neurônios de pequeno diâmetro e também o fato da $\text{Ph}\alpha 1\beta$ atuar com maior eficiência inibindo o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em DRGs de animais tratados com CFA, situação em que sabidamente há maior expressão de receptores TRPV1 (Yu et al., 2008) nos fizeram levantar a hipótese que essa toxina poderia atuar por uma via mediada pelo receptor alvo da ação da capsaicina, o receptor vanilóide-1TRPV1.

Muitas linhas de evidência suportam a hipótese que o TRPV1 é o transdutor endógeno do calor nocivo. Primeiro, TRPV1 é expresso na maioria dos nociceptores sensíveis ao calor (Caterina et al., 1997). Segundo, correntes induzidas por calor e capsaicina são similares, se não idênticas e são bem reproduzidas em sistemas heterólogos expressando canais TRPV1. Terceiro, respostas evocadas por TRPV1 são marcadamente aumentadas por agentes pró-inflamatórios (como prótons extracelulares, neurotrofinas, e bradicinina), todos os quais produzem hipersensibilidade ao calor in vivo (Tominaga et al., 1998). Esses e outros estudos demonstram a regra essencial desse canal no processo pelo qual a injúria do tecido e a inflamação levam à hipersensibilidade à dor. Em nossos experimentos o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em células HEK293 mostrou elevada sensibilidade à capsaicina visto que concentrações desse agonista na ordem de 10^{-10} M foram eficazes em disparar aumento dos níveis de cálcio intracelular e que alcançaram mais de 10x sobre a linha de base enquanto que em DRGs os aumentos foram em média 3 a 4x a linha de base. Esse aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ teve pouca ou nenhuma contribuição de canais de cálcio sensíveis a voltagem, já que a Tx3-4 não mostrou ação inibitória significativa, diferente do efeito dessa toxina sobre os DRGs. Por outro lado a capsazepina, um antagonista de receptores vanilóides, aboliu totalmente a resposta nas células induzida por capsaicina. Interessantemente, SB366791, antagonista específico VR1 exerceu, na concentração testada, efeito inibitório apenas discreto sobre o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzida por capsaicina. O efeito inibitório da $\text{Ph}\alpha 1\beta$, ainda que discreto, nas células HEK293VR1 foi significativo e sugere pela primeira vez que essa toxina atua em alvos além dos canais de cálcio sensíveis a voltagem para gerar seu efeito analgésico, presumivelmente inibindo também a sinalização de cálcio via TRPV1.

5.2 ω -toxinas da *P. nigriventer* e splicing alternativo de Cav2.2

Não existe, atualmente, informações sobre a ação de toxinas ou bloqueadores de canais iônicos atuando seletivamente sobre isoformas de canais codificados por variantes de *splicing* alternativo. A constatação de que agentes farmacológicos poderiam discernir entre uma e outra isoforma, associado ao fato de que essas isoformas tem distribuição diferencial e, portanto, funções fisiológicas distintas, poderia ter grande relevância científica e clínica. Os estudos realizados durante o estágio sandwich, empregando técnicas de eletrofisiologia e de biologia molecular, revelaram informações importantes sobre o mecanismo de ação das duas ω -phonetoxinas, e, pela primeira vez, revelou dados sobre a identidade farmacológica de canais iônicos que diferem em apenas curtas sequências de aminoácidos, resultado do processamento diferencial do RNA mensageiro.

O processamento pós-transcricional do RNA mensageiro tem sido apontado como o principal mecanismo responsável por expandir as funções dos canais de cálcio sensíveis a voltagem no sistema nervoso, visto que o número de genes (10) que codificam as subunidade $Ca_v\alpha_1$, é pequeno para explicar o elevado número de funções que esses canais desempenham. Neurônios individuais selecionam entre vários genes de CCSV's para determinar a composição final do complexo multi-subunidades do canal de Ca^{2+} (Lipscombe et al., 2002). Além dos genes que codificam a subunidade $Ca_v\alpha_1$, mais 4 genes para $Ca_v\beta$ e três $Ca_v\alpha_2\delta$ também são expressos nos neurônios. Esses últimos também são sujeitos a sofrerem *splicing* alternativo do RNAm (Birnbaumer et al., 1998; Klugbauer et al., 1999; Helton and Horne, 2002) dando uma noção de como pode ser grande o número de diferentes canais funcionais. Entretanto, dada a maior importância funcional da subunidade formadora do poro $Ca_v\alpha_1$, as sequências genômicas nessas subunidades tem sido estudadas com maior prioridade. Através da combinação de técnicas de sequenciamento e de RT-PCR, sequências do mesmo gene $Ca_v\alpha_1$ em diferentes tecidos e em diferentes espécies vem sendo comparadas e, dessa forma, tem sido encontrados diversos éxons-cassete passíveis de sofrerem *splicing* alternativo. Num total de aproximadamente 50 éxons da subunidade $Ca_v\alpha_1$ dos canais tipo-N, especula-se que ao menos 10 sejam passíveis de sofrerem processamento por *splicing* (Lipscombe et al., 2002). Apesar de, nos últimos anos, um número crescente

desses sítios de *splicing* terem sido caracterizados molecularmente, ainda é muito limitado o número de evidências da importância funcional do processamento por *splicing* dos canais iônicos.

Nos trabalhos conduzidos no laboratório da Dra. Lipscombe, os registros eletrofisiológicos iniciais visaram avaliar a atividade inibitória de Ph α 1 β e Tx3-4 sobre canais de cálcio tipo-N. Tanto Ph α 1 β como Tx3-4 inibiram com elevada potência e eficácia correntes de cálcio em células TsA201 expressando canais tipo-N contendo as duas variantes de *splicing* 37a e 37b. A ação de ambas toxinas foi irreversível após curto período de tempo de lavagem. Esse efeito inibitório corrobora os achados de Vieira e cols. (2005), que encontraram IC_{50} de 122nM para a ação inibitória da Ph α 1 β sobre canais tipo-N (Vieira et al., 2005). A não reversibilidade observada com a Ph α 1 β vai ao encontro da longa duração de efeito antinociceptivo observado para essa toxina em testes de nocicepção *in vivo* em ratos. Em testes de dor aguda térmica (teste da chapa quente) e química (teste da formalina) a Ph α 1 β mostrou efeito antinociceptivo que durou até 24 hs após sua administração (Souza et al., 2008). Já a Tx3-4, também mostrou ação inibitória potente e aparentemente irreversível, corroborando os achados de Troncone e cols. (2003) e Dos Santos e cols. (2002). Entretanto, em trabalho prévio utilizando junção neuromuscular de rã, a Tx3-4 inibiu os potenciais excitatórios pós-sinápticos de maneira reversível quando a solução de lavagem continha Ca^{2+} (1mM) porém irreversível quando a solução continha baixo cálcio (Trocone et al., 2003). Isso sugere portanto que a Tx3-4 possui mecanismos de ação diferentes para a inibição de canais localizados diferencialmente pelo sistema nervoso.

Interessantemente, tanto Ph α 1 β como Tx3-4 impediram bloqueio adicional da corrente pela ω -conotoxina GVIA. Esta última é uma inibidora potente e irreversível de canais de cálcio tipo-N. O efeito inibitório da GVIA se dá por mecanismo diferente da simples alteração do *gating* do canal, mas, como diversas linhas de evidência sugerem, a GVIA bloqueia o poro do canal (Boland et al., 1994; Ellinor et al., 1994; McDonough et al., 2002), indicando, portanto, que Ph α 1 β e Tx3-4 podem estar se ligando ao poro impedindo assim a ligação de GVIA. Entretanto, nem Ph α 1 β nem Tx3-4 inibiram 100% da resposta, além do mais, a aplicação de pulsos despolarizantes mais fortes reverteram parcialmente o bloqueio causado por essas

toxinas (Figura 22), o que sugere que as ω -phonetoxinas exercem bloqueio mais fraco que a GVIA, apesar de impedirem essa última de se ligar aos canais tipo-N.

A ação inibitória da toxina Tx3-4 foi ligeiramente mais pronunciada na isoforma 37a que na isoforma 37b (~80% contra ~70% de inibição, respectivamente, quando avaliou-se pulsos de -100 a +10mV). Essa diferença, embora estatisticamente significativa, não foi tão pronunciada como, por exemplo, quando se comparou a quantidade de bloqueio em função da intensidade do pulso despolarizante. Nessa situação, a Tx3-4 mostrou-se muito mais eficaz em inibir 37a do que 37b em pulsos despolarizantes mais intensos (Figura 22). Logo, pulsos despolarizantes mais fortes são capazes de reverter o bloqueio da Tx3-4 mais em 37b que em 37a, sugerindo que nessa última isoforma, a Tx3-4 pode estar se ligando com mais avidéz. A inclusão do éxon 37a em canais tipo-N aumenta a densidade da corrente de cálcio que esses canais conduzem. A importância fisiológica disso é que quantidades maiores de cálcio entram na célula em resposta a um potencial de ação. Esse aumento se dá pois canais contendo 37a, uma vez ativados, permanecem abertos por tempo maior, além de que esses canais possuem cinética de inativação mais lenta que canais contendo 37b (Castiglioni et al., 2006). Não obstante, a condutância de canais únicos não difere entre canais contendo 37a ou 37b. Juntos, esses dados sugerem que a Tx3-4 pode ter uma afinidade maior pelos canais tipo-N no estado aberto, já que em 37a a inibição foi maior.

Já foi mostrado que ~35% dos neurônios nos DRGs expressam a isoforma 37a dos canais tipo-N. Desses, ~75% são responsivos à capsaicina e de pequeno diâmetro, portanto nociceptores (Bell et al., 2004). Não é sabido ao certo qual a proporção de neurônios que expressam ambas as isoformas ou que expressam uma ou outra isoforma exclusivamente. Nossos achados sobre o efeito da Tx3-4 sobre correntes de cálcio em DRGs de camundongos *bb* e selvagem condizem com essas análises. Foi observado, no grupo selvagem, duas populações aparentemente distintas quanto ao percentual de inibição exercido pela Tx3-4. Interessantemente, 7 (~41%) das 17 células analisadas apresentaram percentual de inibição maior e que não seguiu uma distribuição gaussiana quando analisado sob teste de variância, dentro do grupo total de células. Em animais *bb* a distribuição de todas as células passou no teste de normalidade. Isso sugere que as células mais significativamente inibidas pela Tx3-4 podem ser células que expressam a isoforma 37a. Isso não

exclui a possibilidade de que a Tx3-4 exerça ação preferencial sobre isoformas de canais contendo outras variantes de splicing ainda não identificadas, assim como não exclui a hipótese de que outros mecanismos não conhecidos possam contribuir pra esse perfil diferencial de inibição. De fato, os genes Cav2.1 e Cav2.3 também possuem sítios de splicing na região do éxon 37 (Gray et al., 2007) cuja função fisiológica ainda não foi elucidada. Da mesma forma, o éxon 18, cujo splicing também causa alterações funcionais nos canais tipo-N (Lin et al., 2004), também é encontrado nos canais Ca_v2.3.

Interessantemente e diferente do esperado, a toxina Phα1β não mostrou diferenças relevantes no bloqueio de 37a ou de 37b. Logo, a maior eficácia em inibir os níveis de cálcio preferencialmente em neurônios pequenos, verificados nos experimentos de imagem de cálcio (Figura 16), pode ser devido à ação dessa toxina em mecanismos *downstream* à entrada de cálcio por canais sensíveis a voltagem, por exemplo, na modulação de fosfolipase C com consequente alteração da produção de IP3 e liberação de cálcio de estoques internos. Novas abordagens experimentais utilizando inibidores/ativadores de PLC serão necessárias para responder essa questão.

- Das toxinas do pool Tx3 testadas, a Tx3-4 inibiu com maior eficácia o aumento dos níveis de Ca^{2+} induzidos por KCl em DRGs. Não houve distinção do efeito inibitório entre neurônios de diferentes diâmetros.
- Ph α 1 β inibiu aumento dos níveis de Ca^{2+} induzidos por KCl com maior eficiência em neurônios pequenos (<30 μ m) que em grandes (>30 μ m).
- Ph α 1 β inibiu aumento dos níveis de Ca^{2+} induzidos por capsaicina, sem mostrar efeito aditivo com SB366791, sugerindo que Ph α 1 β atua por meio da via da ativação de receptores TRPV1.
- Efeito inibitório da Ph α 1 β no aumento dos níveis de Ca^{2+} induzidos por capsaicina, é mais pronunciado, comparado à MVIIA, em DRGs de animais previamente submetidos a processo inflamatório com CFA.
- Ambas Ph α 1 β e Tx3-4 inibem parcialmente correntes Tipo-N impedindo bloqueio adicional da ω -conotoxina GVIA, sugerindo que as primeiras podem se ligar ao poro dos canais Tipo-N.
- Tx3-4 bloqueia canais tipo-N contendo o éxon 37a com maior eficácia que canais 37b, principalmente frente a pulsos despolarizantes mais intensos, além da cinética de bloqueio ser mais rápida. Ph α 1 β não mostrou efeito discriminativo aparente entre as isoformas 37a e 37b.
- Neurônios DRG's de camundongos selvagem apresentam populações distintas quanto ao percentual de inibição da corrente de cálcio pela Tx3-4, enquanto que em DRGs de animais bb o perfil de inibição segue distribuição normal.

- Altier C, Khosravani H, Evans RM, Hameed S, Peloquin JB, Vartian BA, Chen L, Beedle AM, Ferguson SS, Mezghrani A, Dubel SJ, Bourinet E, McRory JE, Zamponi GW (2006) ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nat Neurosci* 9:31-40.
- Andrade A, Denome S, Jiang YQ, Marangoudakis S, Lipscombe D Opioid inhibition of N-type Ca²⁺ channels and spinal analgesia couple to alternative splicing. *Nat Neurosci* 13:1249-1256.
- 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.
- Basbaum AI, Woolf CJ (1999) Pain. *Curr Biol* 9:R429-431.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-284.
- Bell TJ, Thaler C, Castiglioni AJ, Helton TD, Lipscombe D (2004) Cell-specific alternative splicing increases calcium channel current density in the pain pathway. *Neuron* 41:127-138.
- Besson JM (1999) The neurobiology of pain. *Lancet* 353:1610-1615.
- Birnbaumer L, Qin N, Olcese R, Tareilus E, Platano D, Costantin J, Stefani E (1998) Structures and functions of calcium channel beta subunits. *J Bioenerg Biomembr* 30:357-375.
- Black DL (1998) Splicing in the inner ear: a familiar tune, but what are the instruments? *Neuron* 20:165-168.
- Boland LM, Morrill JA, Bean BP (1994) omega-Conotoxin block of N-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 14:5011-5027.
- Brennan F, Carr DB, Cousins M (2007) Pain management: a fundamental human right. *Anesth Analg* 105:205-221.
- Cardenas CG, Del Mar LP, Scroggs RS (1995) Variation in serotonergic inhibition of calcium channel currents in four types of rat sensory neurons differentiated by membrane properties. *J Neurophysiol* 74:1870-1879.

- 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.
- Castiglioni AJ, Raingo J, Lipscombe D (2006) Alternative splicing in the C-terminus of CaV2.2 controls expression and gating of N-type calcium channels. *J Physiol* 576:119-134.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
- Chizh BA, O'Donnell MB, Napolitano A, Wang J, Brooke AC, Aylott MC, Bullman JN, Gray EJ, Lai RY, Williams PM, Appleby JM (2007) The effects of the TRPV1 antagonist SB-705498 on TRPV1 receptor-mediated activity and inflammatory hyperalgesia in humans. *Pain* 132:132-141.
- Cooper GP, Manalis RS (1984) Cadmium: effects on transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Eur J Pharmacol* 99:251-256.
- 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.
- de Castro Junior CJ, Pinheiro AC, Guatimosim C, Cordeiro MN, Souza AH, Richardson M, Romano-Silva MA, Prado MA, Gomez MV (2008) Tx3-4 a toxin from the venom of spider *Phoneutria nigriventer* blocks calcium channels associated with exocytosis. *Neurosci Lett* 439:170-172.
- 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.
- Eckert SP, Taddese A, McCleskey EW (1997) Isolation and culture of rat sensory neurons having distinct sensory modalities. *J Neurosci Methods* 77:183-190.

- Ellinor PT, Zhang JF, Horne WA, Tsien RW (1994) Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin. *Nature* 372:272-275.
- Eun SY, Jung SJ, Park YK, Kwak J, Kim SJ, Kim J (2001) Effects of capsaicin on Ca(2+) release from the intracellular Ca(2+) stores in the dorsal root ganglion cells of adult rats. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1114-1120.
- Evans AR, Nicol GD, Vasko MR (1996) Differential regulation of evoked peptide release by voltage-sensitive calcium channels in rat sensory neurons. *Brain Res* 712:265-273.
- Goldberg YP, MacFarlane J, MacDonald ML, Thompson J, Dube MP, Mattice M, Fraser R, Young C, Hossain S, Pape T, Payne B, Radomski C, Donaldson G, Ives E, Cox J, Younghusband HB, Green R, Duff A, Boltshauser E, Grinspan GA, Dimon JH, Sibley BG, Andria G, Toscano E, Kerdraon J, Bowsher D, Pimstone SN, Samuels ME, Sherrington R, Hayden MR (2007) Loss-of-function mutations in the Nav1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations. *Clin Genet* 71:311-319.
- Gomes DA, Guatimosim C, Gomez RS, Leite MF, Vieira LB, Prado MA, Romano-Silva MA, Gomez MV (2004) Effect of halothane on the release of [Ca²⁺]_i in dorsal root ganglion neurons. *Neuroreport* 15:1187-1190.
- 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.
- Gray AC, Raingo J, Lipscombe D (2007) Neuronal calcium channels: Splicing for optimal performance. *Cell Calcium* 42:409-417.
- Gruner W, Silva LR (1994) Omega-conotoxin sensitivity and presynaptic inhibition of glutamatergic sensory neurotransmission in vitro. *J Neurosci* 14:2800-2808.

- 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.
- Gudermann T, Flockerzi V (2005) TRP channels as new pharmacological targets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371:241-244.
- Gunthorpe MJ, Rami HK, Jerman JC, Smart D, Gill CH, Soffin EM, Luis Hannan S, Lappin SC, Egerton J, Smith GD, Worby A, Howett L, Owen D, Nasir S, Davies CH, Thompson M, Wyman PA, Randall AD, Davis JB (2004) Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. *Neuropharmacology* 46:133-149.
- Hagenacker T, Ledwig D, Busselberg D (2008) Feedback mechanisms in the regulation of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in the peripheral nociceptive system: role of TRPV-1 and pain related receptors. *Cell Calcium* 43:215-227.
- Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB (2000) Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 88:205-215.
- Helton TD, Horne WA (2002) Alternative splicing of the beta 4 subunit has alpha1 subunit subtype-specific effects on Ca^{2+} channel gating. *J Neurosci* 22:1573-1582.
- Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 302:2141-2144.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.

- Kim CH, Oh Y, Chung JM, Chung K (2002) Changes in three subtypes of tetrodotoxin sensitive sodium channel expression in the axotomized dorsal root ganglion in the rat. *Neurosci Lett* 323:125-128.
- Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M, Hofmann F (1999) Molecular diversity of the calcium channel $\alpha_2\delta$ subunit. *J Neurosci* 19:684-691.
- 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^+ currents controlling Ca^{2+} oscillation frequency in GH3 cells. *J Neurochem* 72:1472-1481.
- Leao RM, Cruz JS, Diniz CR, Cordeiro MN, Beirao PS (2000) Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology* 39:1756-1767.
- Lee Y, Lee CH, Oh U (2005) Painful channels in sensory neurons. *Mol Cells* 20:315-324.
- Lin Y, McDonough SI, Lipscombe D (2004) Alternative splicing in the voltage-sensing region of N-Type $CaV2.2$ channels modulates channel kinetics. *J Neurophysiol* 92:2820-2830.
- Lin Z, Haus S, Edgerton J, Lipscombe D (1997) Identification of functionally distinct isoforms of the N-type Ca^{2+} channel in rat sympathetic ganglia and brain. *Neuron* 18:153-166.
- Lipscombe D (2005) Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Curr Opin Neurobiol* 15:358-363.
- Lipscombe D, Pan JQ, Gray AC (2002) Functional diversity in neuronal voltage-gated calcium channels by alternative splicing of $Ca(v)\alpha_1$. *Mol Neurobiol* 26:21-44.
- Loeser JD, Melzack R (1999) Pain: an overview. *Lancet* 353:1607-1609.
- Lu SG, Gold MS (2008) Inflammation-induced increase in evoked calcium transients in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 153:279-288.
- Lu SG, Zhang X, Gold MS (2006) Intracellular calcium regulation among subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 577:169-190.

- Lucas S (1988) Spiders in Brazil. *Toxicon* 26:759-772.
- 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, Gold MS (1999) Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol* 61:835-856.
- McDonough SI, Boland LM, Mintz IM, Bean BP (2002) Interactions among toxins that inhibit N-type and P-type calcium channels. *J Gen Physiol* 119:313-328.
- Meder W, Fink K, Gothert M (1997) Involvement of different calcium channels in K⁺- and veratridine-induced increases of cytosolic calcium concentration in rat cerebral cortical synaptosomes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356:797-805.
- Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky SG, Kaiserman I, Ahdut R, Demirgoren S, Rahamimoff R (1999) Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev* 79:1019-1088.
- Miljanich GP, Ramachandran J (1995) Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:707-734.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
- Miller RJ (2001) Rocking and rolling with Ca²⁺ channels. *Trends Neurosci* 24:445-449.
- Minke B, Cook B (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 82:429-472.
- 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.
- Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP (2009) Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov* 8:69-85.

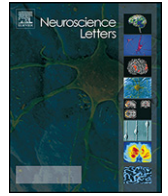
- Navaratnam DS, Bell TJ, Tu TD, Cohen EL, Oberholtzer JC (1997) Differential distribution of Ca²⁺-activated K⁺ channel splice variants among hair cells along the tonotopic axis of the chick cochlea. *Neuron* 19:1077-1085.
- Niiyama Y, Kawamata T, Yamamoto J, Furuse S, Namiki A (2009) SB366791, a TRPV1 antagonist, potentiates analgesic effects of systemic morphine in a murine model of bone cancer pain. *Br J Anaesth* 102:251-258.
- Novakovic SD, Levinson SR, Schachner M, Shrager P (1998) Disruption and reorganization of sodium channels in experimental allergic neuritis. *Muscle Nerve* 21:1019-1032.
- Pinheiro AC, da Silva AJ, Prado MA, Cordeiro MD, Richardson M, Batista MC, de Castro Junior CJ, Massensini AR, Guatimosim C, Romano-Silva MA, Kushmerick C, Gomez MV (2009) Phoneutria spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. *Hippocampus*.
- Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF (2002) Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* 25:319-325.
- 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.
- Prado WA (2001) Involvement of calcium in pain and antinociception. *Braz J Med Biol Res* 34:449-461.
- Raino J, Castiglioni AJ, Lipscombe D (2007) Alternative splicing controls G protein-dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors. *Nat Neurosci* 10:285-292.
- 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 Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem J* 296 (Pt 2):313-319.
- Russo CM, Brose WG (1998) Chronic pain. *Annu Rev Med* 49:123-133.
- Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Minowa O, Kazuno A, Han W, Matsuda Y, Yamanaka H, Osanai M, Noda T, Tanabe T (2000) Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage-dependent Ca²⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6132-6137.
- Schmucker D, Clemens JC, Shu H, Worby CA, Xiao J, Muda M, Dixon JE, Zipursky SL (2000) *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* 101:671-684.
- Scott K, Zuker C (1998) TRP, TRPL and trouble in photoreceptor cells. *Curr Opin Neurobiol* 8:383-388.
- Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67:11-19.
- Souza AH, Ferreira J, Cordeiro Mdo N, Vieira LB, De Castro CJ, Trevisan G, Reis H, Souza IA, Richardson M, Prado MA, Prado VF, Gomez MV (2008) Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph alpha 1beta toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain* 140:115-126.
- Staats PS, Hekmat H, Staats AW (2004) The psychological behaviorism theory of pain and the placebo: its principles and results of research application. *Adv Psychosom Med* 25:28-40.
- Takahashi T, Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366:156-158.

- Thaler C, Gray AC, Lipscombe D (2004) Cumulative inactivation of N-type CaV2.2 calcium channels modified by alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5675-5679.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531-543.
- 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.
- Tsien RY (1988) Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium. *Trends Neurosci* 11:419-424.
- Vanegas H, Schaible HG (2004) Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Brain Res Rev* 46:295-309.
- Vedder H, Otten U (1991) Biosynthesis and release of tachykinins from rat sensory neurons in culture. *J Neurosci Res* 30:288-299.
- Verpoorten N, Claeys KG, Deprez L, Jacobs A, Van Gerwen V, Lagae L, Arts WF, De Meirleir L, Keymolen K, Ceuterick-de Groote C, De Jonghe P, Timmerman V, Nelis E (2006) Novel frameshift and splice site mutations in the neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 gene (NTRK1) associated with hereditary sensory neuropathy type IV. *Neuromuscul Disord* 16:19-25.
- Vieira LB, Kushmerick C, Reis HJ, Diniz CR, Cordeiro MN, Prado MA, Kalapothakis E, Romano-Silva MA, Gomez MV (2003) PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K⁺-evoked increase in [Ca²⁺]_i and Ca²⁺-dependent glutamate release in synaptosomes. *Neurochem Int* 42:277-282.
- Vieira LB, Kushmerick C, Hildebrand ME, Garcia E, Stea A, Cordeiro MN, Richardson M, Gomez MV, Snutch TP (2005) Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *J Pharmacol Exp Ther* 314:1370-1377.

- Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA (1998) Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* 18:6319-6330.
- Woolf CJ, Ma Q (2007) Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* 55:353-364.
- Yu L, Yang F, Luo H, Liu FY, Han JS, Xing GG, Wan Y (2008) The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant. *Mol Pain* 4:61.
- Zamponi GW, Lewis RJ, Todorovic SM, Arneric SP, Snutch TP (2009) Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. *Brain Res Rev* 60:84-89.
- Zhang WY, Li Wan Po A (1994) The effectiveness of topically applied capsaicin. A meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 46:517-522.

8 ANEXOS



Tx3-4 a toxin from the venom of spider *Phoneutria nigriventer* blocks calcium channels associated with exocytosis

Célio José de Castro Junior^{a,*}, Ana Cristina N. Pinheiro^a, Cristina Guatimosim^b, Marta N. Cordeiro^c, Alessandra H. Souza^a, Michael Richardson^c, Marco A. Romano-Silva^d, Marco Antônio M. Prado^a, Marcus V. Gomez^{a,e}

^a Departamento Farmacologia Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, 30550-010 Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Núcleo de Pós-graduação Santa Casa, Belo Horizonte, Minas Gerais Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2008

Accepted 1 May 2008

Keywords:

Phoneutria toxin
Calcium channels
Exocytosis
Synaptosomes
 ω -CgTX MVIIC
 ω -CgTX GVIA
 ω -Aga IVA

ABSTRACT

The purpose of the present work was to investigate the pharmacological action of a calcium channel-blocking toxin from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, Tx3-4 on calcium channels coupled to exocytosis of synaptic vesicles. Tx3-4 blocked KCl-induced exocytosis of synaptic vesicles with an IC50 of 1.1 nM. To investigate whether the target of Tx3-4 overlaps with known calcium channels that mediate calcium entry and exocytosis, we used ω -toxins that interact selectively with neuronal calcium channels. The results indicate that the main population of voltage-sensitive calcium channels altered by Tx3-4 is P/Q calcium channels. In conclusion, Tx3-4 is a potent inhibitor of calcium channels involved in the KCl-induced exocytosis of synaptic vesicles in brain cortical synaptosomes.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Voltage-sensitive calcium channels (VSCC) have a key role in regulating diverse cellular functions, including neuronal communication [7,19]. The opening of VSCC Ca²⁺ channels may produce a localized rise in Ca²⁺ and exocytosis of neurotransmitters. Thus, calcium permeates nerve endings through VSCC triggering exocytosis of synaptic vesicles docked at the active zones.

Electrophysiological studies have classified VSCC into T (low-voltage activated) and L-, N-, P-, Q- and R-types (high-voltage activated) [23,24]. Peptides isolated from the venom of the spiders or cone snails have been used to distinguish the different types of calcium channels. These peptides can inhibit current through specific channels with nanomolar potency [1]. The venom of the spider *Phoneutria nigriventer* contains several neurotoxins peptides with actions such as inhibition of the inactivation of Na⁺ channels [3], blockage of K⁺ channels [10], blockage of Ca²⁺ channels [5] and inhibition of ⁴⁵Ca²⁺ influx in depolarized synaptosomes [15]. Thus, *Phoneutria nigriventer* spider venom contains a cocktail of toxins that affects ionic channels (see review [8]) and most of these

peptide toxins are calcium channel blockers that may be used to capture prey.

The aim of this paper was to investigate, on rat brain cortical synaptosomes, the KCl-induced increase on exocytosis of synaptic vesicles in the presence of Tx3-4. We extend the study comparing the interaction of Tx3-4 with others toxins calcium channel blockers (reviewed by Olivera et al. [17]) on exocytosis. We suggest that Tx3-4 is an antagonist of calcium channels coupled to exocytotic release of neurotransmitters.

Tx3-4 purified according Cordeiro et al., 1993 is a protein of 8449 Da. FM2-10 was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). ω -CgTX MVIIC, ω -CgTX GVIA and ω -AGA IVA, Fura-2 acetoximethyl ester (Fura-2AM) and Percoll were obtained from Sigma Chemical Co. (MO, USA).

All animal procedures were approved by a local Ethics Committee and followed the guidelines for the Use and Care of Animals for Research issued by the NIH. Male wistar rats (180–200 g) were killed by decapitation and their brains rapidly (<1 min) removed and homogenized 1:10 (w/v) in 0.32 M sucrose solution containing 0.25 mM dithiothreitol and 1.0 mM EDTA. The homogenate centrifuged (1000 × g for 10 min) and synaptosomes were purified from the supernatant by discontinuous Percoll-density gradient

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 2707; fax: +55 31 3409 2983.
E-mail address: celiojuniior@yahoo.com.br (C.J. de Castro Junior).

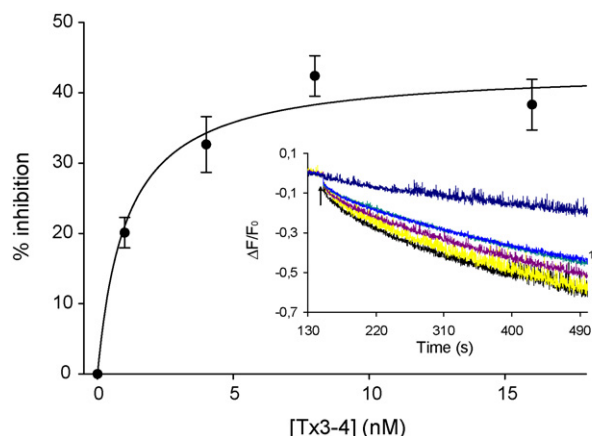


Fig. 1. Effect of Tx3-4 on KCl-induced exocytosis. Rat cerebrocortical synaptosomes were incubated in KRH in the presence of FM2-10 (50 μ M). Tx3-4 (1.0, 4.0, 8.0 and 16 nM) was added 5 min before depolarization by 30 mM KCl. The plot shows the mean \pm S.E.M. for the percent of fluorescence inhibition induced by Tx3-4. The line represents the curve fitting generated by non-linear regression, $f = ax/(b+x)$. The insert shows the fluorescence traces in the absence/presence of 30 mM KCl and Tx3-4 at the indicated concentrations. The arrow indicates the addition of 30 mM KCl.

centrifugation [6], essentially as described [20]. The isolated nerve terminals were resuspended in Krebs–Ringer–Hepes medium (KRH): (124 mM NaCl; 1.3 mM CaCl_2 , 4.0 mM KCl; 1.2 mM MgSO_4 10 mM glucose, 25 mM Hepes, pH 7.4), to a protein concentration of 10 mg/ml, divided into aliquots of 1 ml kept on ice for the experiments.

The exocytosis measurements were performed in synaptosomes (500 μ l) diluted to 1.0 ml with KRH medium in a stirred cuvette and incubated with FM2-10 (50 μ M) and 1.3 mM calcium for 3 min at 37 $^\circ\text{C}$ as previously done for FM1-43 [9,11]. Vesicle cycling was stimulated with 30 mM KCl and otherwise stated for 45 s. The sample was washed with two short 10 s spins to remove externally bound dye, and resuspended in 2 ml of fresh KRH. The synaptosomes were stirred at 37 $^\circ\text{C}$ for approximately 5 min to further remove dye from the plasma membrane. Labelled vesicles were released during a second round of vesicle cycling, stimulated with KCl in KRH medium. We measured the decrease in fluorescence ($(F - F_0)/F_0$) when the dye was exocytosed in a Shimadzu Spectrophotometer model RF-5301 PC, exciting at 488 nm and collecting at 570 nm. The fluorescence decay was analyzed at an average of 480–490 s. The dye FM1-43 has been used previously to measure exocytosis in synaptosomes [9,13], but FM2-10 is more easily washed from external membranes giving a lower background signal, which it was used this study.

Analysis for the significance of the differences between the toxins treatment were performed by one-way analysis of variance.

Fig. 1 and its insert shows the concentration curve for the inhibitory effect of Tx3-4 on the exocytosis of synaptic vesicles measured with FM2-10. Tx3-4 at the concentrations of 1.0, 4.0, 8.0 and 16.0 nM inhibited the KCl-induced exocytosis of synaptic vesicles by 20 ± 2.1 , 33 ± 3.9 , 42 ± 2.9 and $38 \pm 3.6\%$, respectively, $P < 0.05$. Thus the inhibitory effect of Tx3-4 on the KCl-induced exocytosis of synaptic vesicles reached a plateau at 16.0 nM with an IC_{50} of 1.1 nM.

Next we tested for the overlapping between Tx3-4 and other toxins, calcium channel blockers, on the exocytosis of synaptic vesicles (Fig. 2). Tx3-4 (10 nM) reduced by $37 \pm 2.8\%$ the 30 mM KCl-induced exocytosis of synaptic vesicle, whereas the reduction evoked by ω -CgTX-MVIIC (2.5 μ M) and ω -Aga-IVA (30 nM) were lower 21 ± 3.5 and $10 \pm 5.0\%$, respectively, $P < 0.05$. The ω -CgTX GVIA (1.0 μ M), blocker of N-type calcium channel, caused a small and no significant

effect on the KCl-induced exocytosis ($P > 0.05$). The joint application of Tx3-4 and ω -CgTX MVIIC did not induce higher inhibition on exocytosis than that induced by Tx3-4 alone, $P > 0.05$. In contrast, the joint use of Tx3-4 (10 nM) and Aga-IVA (30 nM) caused an additive inhibitory effect of $53 \pm 3.9\%$ on the 30 mM KCl-induced exocytosis of synaptic vesicles ($P < 0.05$). Otherwise the association of Tx3-4 (10 nM) with ω -CgTX GVIA (1.0 μ M) caused inhibition on the exocytosis that was, however, not statistically different from the inhibition induced by Tx3-4 alone ($P > 0.05$). Cd^{2+} (100 μ M), an inespecific blocker of calcium channels, inhibited by $54 \pm 3.8\%$ the KCl-induced exocytosis, $P < 0.05$.

Measurements of FMs dyes decay [4,9,13] provide a good indication of transmitter release of synaptosomes. KCl-induced decrease in fluorescence in the calcium absence (EGTA 8 mM) was greatly diminished by about 25% of control conditions using 2 mM calcium (data not shown). In the present paper, the FM labeling decay induced by KCl depolarization was also greatly diminished in the presence of Tx3-4 and conotoxins and thus, dependent of active exocytosis. We take advantage of this technique to show that Tx3-4 caused a dose-dependent inhibition of exocytosis. Exocytosis of synaptic vesicles is triggered by a raise in local calcium concentration and is tightly coupled to a selective calcium channel subtype. Tx3-4, ω -Aga-IVA and ω -conotoxin MVIIC inhibited the exocytotic responses induced by KCl depolarization of nerve terminals. Tx3-4 caused a dose-dependent inhibition of exocytosis with an IC_{50} of 1.1 nM. The small and not significant effect on exocytosis induced by ω -CgTX GVIA suggests that N-type calcium channel does not contribute much to exocytosis of central nerve terminals [21]. N-type calcium channels are more prevalent in peripheral nerve terminals and are largely responsible for synaptic transmission in autonomic and sensory terminals [16]. Considerable research in the last decade has focused on potential role of N-type calcium channel inhibitors for development of novel analgesic drugs [2]. The various VSCC-regulated components of

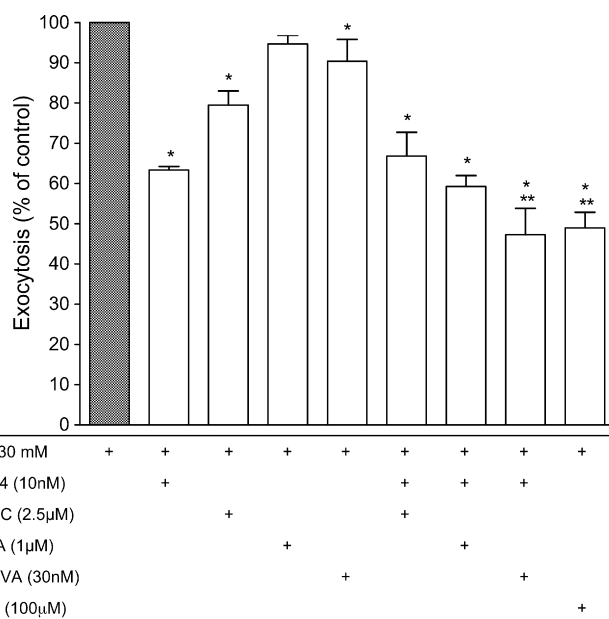


Fig. 2. Effect of Tx3-4, ω -conotoxin MVIIC, ω -CgTx GVIA, ω -Aga IVA and cadmium on exocytosis induced by 30 mM KCl. Rat cerebrocortical synaptosomes were incubated in KRH in the presence of FM2-10 (50 μ M). The toxins and cadmium were added 5 min before depolarization by 30 mM KCl. Columns show the percent of exocytosis inhibition induced by 10 nM Tx3-4, 2.5 μ M ω -conotoxin MVIIC, 1.0 μ M ω -CgTx GVIA, 30 nM ω -Aga IVA or 100 μ M cadmium on the fluorescence induced by 30 mM KCl (control). Columns show the mean \pm S.E.M. for at least three experiments. * $P < 0.05$ compared to the control 30 mM KCl and ** $P > 0.05$ compared to the Tx3-4 value.

transmitter release and electrical signaling contribute to numerous physiological processes that are potential targets for therapeutic intervention.

At the concentration of 30 nM ω -AgaIVA blocks P-type calcium channels [18] without interfering with the Q-type channel. The P-type [14] and Q-type calcium currents are quite similar and both currents are completely blocked by saturating concentration of ω -conotoxin MVIIC. The data showing the lack of an additive inhibitory effect between the Tx3-4 plus saturating concentrations of ω -conotoxin MVIIC and also the observed additive inhibitory effect on exocytosis induced by the joint use of 10 nM Tx3-4 and 30 nM ω -Aga-IVA suggests that Tx3-4 may acts on P/Q type calcium channels in nerve terminals. P/Q-type calcium channels are most important for transmitter release at central terminals [9,22]. However, considering that ω -conotoxin MVIIC and ω -CgTX GVIA compete for the same binding site on the N-type calcium channel [12], Tx3-4 may also affects N-type calcium channel. Tx3-4 has homology structure with Phoneutria ω -Ptx-IIA that was shown blocks N-type calcium channels of rat dorsal root ganglion [5].

Multiple types of calcium channels coexist in nerve terminals, and they regulate jointly calcium entry and synaptic vesicles exocytosis. Tx3-4 may binds to brain synaptosomes in multiple binding sites and with the present experiments is no possible to exclude the participation of more than one calcium channel involved on the Tx3-4 inhibition of the KCl-induced increase of exocytosis of nerve terminals. The joint use of Tx3-4 and conotoxins do not completely block the vesicle exocytosis suggesting the presence of additional resistant exocytotic channel.

The control of the calcium-dependent secretion of neurotransmitters from presynaptic nerve terminal is one the most important function to initiate the synaptic transmission. Tx3-4 shows a very potent inhibition of exocytosis with an IC_{50} of 1.1 nM. Conotoxins, well-known calcium channels blockers, also inhibited KCl-induced exocytosis but with higher concentrations than that used by Tx3-4. Thus, Tx3-4 may represents a potent tool to study the participation of calcium channels on neurotransmitter release from nerve terminals.

Acknowledgements

This study was supported by grants of CNPq/MCT (Instituto do Milenio), Fapemig, and Capes. We thank A.S. Pereira for technical assistance.

References

- [1] M.E. Adams, R.A. Myers, J.S. Imperial, B.M. Olivera, Toxotyping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms, *Biochemistry* 32 (1993) 12566–12570.
- [2] C. Altier, G.W. Zamponi, Targeting Ca^{2+} channels to treat pain: T-type versus N-type, *Trends Pharmacol. Sci.* 25 (2004) 465–470.
- [3] D.A. Araujo, M.N. Cordeiro, C.R. Diniz, P.S. Beirao, Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current, *Naumyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 347 (1993) 205–208.
- [4] W.J. Betz, G.S. Bewick, Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction, *Science* 255 (1992) 200–203.
- [5] A.C. Cassola, H. Jaffe, H.M. Fales, S. Castro Afeche, F. Magnoli, J. Cipolla-Neto, Omega-phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider *Phoneutria nigriventer*, *Pflugers Arch.* 436 (1998) 545–552.
- [6] P.R. Dunkley, J.W. Heath, S.M. Harrison, P.E. Jarvie, P.J. Glenfield, J.A. Rostas, A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions, *Brain Res.* 441 (1988) 59–71.
- [7] K. Dunlap, J.I. Luebke, T.J. Turner, Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons, *Trends Neurosci.* 18 (1995) 89–98.
- [8] M.V. Gomez, E. Kalapothakis, C. Guatimosim, M.A. Prado, *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels, *Cell. Mol. Neurobiol.* 22 (2002) 579–588.
- [9] C. Guatimosim, M.A. Romano-Silva, J.S. Cruz, P.S. Beirao, E. Kalapothakis, T. Moraes-Santos, M.N. Cordeiro, C.R. Diniz, M.V. Gomez, M.A. Prado, A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis, *Br. J. Pharmacol.* 122 (1997) 591–597.
- [10] C. Kushmerick, E. Kalapothakis, P.S. Beirao, C.L. Penaforte, V.F. Prado, J.S. Cruz, C.R. Diniz, M.N. Cordeiro, M.V. Gomez, M.A. Romano-Silva, M.A. Prado, *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K^{+} currents controlling Ca^{2+} oscillation frequency in GH3 cells, *J. Neurochem.* 72 (1999) 1472–1481.
- [11] B. Marks, H.T. McMahon, Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals, *Curr. Biol.* 8 (1998) 740–749.
- [12] S.I. McDonough, L.M. Boland, I.M. Mintz, B.P. Bean, Interactions among toxins that inhibit N-type and P-type calcium channels, *J. Gen. Physiol.* 119 (2002) 313–328.
- [13] M.K. Meffert, B.A. Premack, H. Schulman, Nitric oxide stimulates Ca^{2+} -independent synaptic vesicle release, *Neuron* 12 (1994) 1235–1244.
- [14] I.M. Mintz, M.E. Adams, B.P. Bean, P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons, *Neuron* 9 (1992) 85–95.
- [15] D.M. Miranda, M.A. Romano-Silva, E. Kalapothakis, C.R. Diniz, M.N. Cordeiro, T.M. Santos, M.A. Prado, M.V. Gomez, *Phoneutria nigriventer* toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes, *Neuroreport* 9 (1998) 1371–1373.
- [16] S. Mochida, Z.H. Sheng, C. Baker, H. Kobayashi, W.A. Catterall, Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca^{2+} channels, *Neuron* 17 (1996) 781–788.
- [17] B.M. Olivera, G.P. Miljanich, J. Ramachandran, M.E. Adams, Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins, *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994) 823–867.
- [18] A. Randall, R.W. Tsien, Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons, *J. Neurosci.* 15 (1995) 2995–3012.
- [19] H. Reuter, Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain, *Curr. Opin. Neurobiol.* 6 (1996) 331–337.
- [20] M.A. Romano-Silva, R. Ribeiro-Santos, A.M. Ribeiro, M.V. Gomez, C.R. Diniz, M.N. Cordeiro, M.J. Brammer, Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca^{2+} entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarisation, *Biochem. J.* 296 (Pt 2) (1993) 313–319.
- [21] J.B. Suszkiw, M.M. Murawsky, M. Shi, Further characterization of phasic calcium influx in rat cerebrocortical synaptosomes: inferences regarding calcium channel type(s) in nerve endings, *J. Neurochem.* 52 (1989) 1260–1269.
- [22] T. Takahashi, A. Momiyama, Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission, *Nature* 366 (1993) 156–158.
- [23] T.J. Turner, M.E. Adams, K. Dunlap, Multiple Ca^{2+} channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 9518–9522.
- [24] J.F. Zhang, A.D. Randall, P.T. Ellinor, W.A. Horne, W.A. Sather, T. Tanabe, T.L. Schwarz, R.W. Tsien, Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons, *Neuropharmacology* 32 (1993) 1075–1088.



Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph α 1 β toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom

Alessandra H. Souza^a, Juliano Ferreira^b, Marta do Nascimento Cordeiro^c,
Luciene Bruno Vieira^a, Celio J. De Castro^a, Gabriela Trevisan^b, Helton Reis^a,
Ivana Assis Souza^a, Michael Richardson^c, Marco A.M. Prado^{a,f}, Vânia F. Prado^{d,f},
Marcus Vinicius Gomez^{e,g,*}

^a Departamento de Farmacologia, ICB, UFMG, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Química UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^c Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Núcleo Pós Graduação, Santa Casa de Belo Horizonte, Brazil

^f Robarts Research Institute, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

^g Laboratório de Neurociência, Faculdade de Medicina, UFMG, 30130-100, Brazil

Received 16 April 2008; received in revised form 10 June 2008; accepted 14 July 2008

Abstract

Calcium influx through neuronal voltage-sensitive calcium channels (VSCC_S) mediates nociceptive information in the spinal dorsal horn. In fact, spinally administered VSCC_S blockers, such as ω -conotoxin MVIIA, have analgesic effect apart of their low therapeutic index and many side effects. Here we study the analgesic potential of Ph α 1 β , a calcium channel blocker, in rodent models of acute and persistent pain. Spinally administered Ph α 1 β showed higher efficacy and long-lasting analgesia in a thermal model of pain, when compared with ω -conotoxin MVIIA. Moreover, Ph α 1 β was more effective and potent than ω -conotoxin MVIIA not only to prevent, but especially to reverse, previously installed persistent chemical and neuropathic pain. Furthermore, the analgesic action of both toxins are related with the inhibition of Ca²⁺-evoked release of pro-nociceptive neurotransmitter, glutamate, from rat spinal cord synaptosomes and decrease of glutamate overflow in cerebrospinal fluid. When side effects were assessed, we found that Ph α 1 β had a therapeutic index wider than ω -conotoxin MVIIA. Finally, recombinant Ph α 1 β expressed in *Escherichia coli* showed marked analgesic activity similar to the native toxin. Taken together, the present study demonstrates that native and recombinant Ph α 1 β have analgesic effects in rodent models of pain, suggesting that this toxin may have potential to be used as a drug in the control of persistent pathological pain.

© 2008 International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phoneutria toxin; ω -Conotoxin MVIIA; Analgesic action; Recombinant toxin; Side effects

1. Introduction

Neuronal VSCC_S (voltage-sensitive calcium channels) are found in presynaptic nerve terminals where they allow calcium influx and depolarization-induced transmitter release from both central and peripheral

* Corresponding author. Address: Departamento de Farmacologia, ICB, UFMG, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil. Tel.: +55 31 3409 2720; fax: +55 31 3409 2983.

E-mail address: gomez@icb.ufmg.br (M.V. Gomez).

nerves [23]. The calcium channels in spinal cord have an important role modulating the release of key pro-nociceptive neurotransmitters, such as glutamate and neuropeptides. Thus, considerable research in the last decade has focused on N-type calcium channel inhibitors for development of novel analgesic drugs [2]. The ω -conotoxin MVIIA is a selective, reversible and potent blocker of N-type VSCC_S [15,35] and inhibits both neuronal excitability and neurotransmission [3,23]. ω -Conotoxin MVIIA was originally isolated from the cone snail *Conus magnus* and was subsequently synthesized and called ziconotide. Ziconotide produces antinociception in animal models of acute [3,19,20] and persistent pain. Due to its peptide nature, ziconotide is not orally available and it must be delivered directly into the CNS via intrathecal administration [31]. Moreover, intrathecal infusion of ziconotide (Prialt[®]) has analgesic effect in humans and was recently approved by several government regulatory bodies worldwide for the treatment of severe chronic pain. However, ziconotide has a narrow therapeutic window and produces some serious side effects in analgesic doses [25,32]. Thus, there is need to investigate new VSCC_S blockers with analgesic properties and that may warrant less adverse side effects.

Toxins obtained from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, popularly known as armed spider, have been extensively investigated by our group [9]. These toxins have a broad range of actions, including activation of Na⁺ channels, blockade of K⁺ and Ca²⁺ channels, the latter with consequent decrease in calcium-dependent glutamate release in synaptosomes [12,26,27]. One purified fraction of the *Phoneutria* venom, called PhTx3, contains six neurotoxic peptides isoforms, PnTx3-1 to 6 [6]. The neurotoxin PnTx3-6, here called as Ph α 1 β , reversibly and non-specifically inhibited high-voltage-activated Ca²⁺ channels, namely L-(Ca_v1.2), N-(Ca_v2.2), P/Q-(Ca_v2.1), and R-(Ca_v2.3) type, with varying potency (N > R > P/Q > L) in heterologous and native systems [34]. Here we demonstrate, for the first time, that Ph α 1 β has analgesic action in rodent models of pain, with a therapeutic window 4 times larger than ziconotide. Moreover, we generate a recombinant form of Ph α 1 β that shares the analgesic properties of the native toxin.

2. Materials and methods

2.1. Drugs

Native Ph α 1 β was purified by a combination of gel filtration, reverse phase FPLC/FPLC and ion exchange HPLC, as previously described [6]. ω -Conotoxin MVIIA was purchased from Latoxan (Valence, France). The stock solutions of the drugs were prepared in PBS in siliconised plastic tubes, maintained at -18 °C and diluted to the desired concentration just before use. Glutamate

dehydrogenase type II (EC 1.4.1.3), NADP⁺, glutamic acid and fura-2 acetoxymethylester (AM) were obtained from Sigma (MO, USA). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Animals

Male adult Swiss mice (30–40 g) or Wistar rats (180–250 g) were acclimatized in the laboratory for at least 2 h before testing and they were used only once throughout the experiments. While in the home cage environment, the animals were allowed free access to water and food. Room temperature was maintained at 22 ± 1 °C and room illumination was on a 12/12 h light/dark cycle. The experiments were carried out in accordance with current guidelines for the care of laboratory animals and ethical guidelines for investigations of experiments in conscious animals [41] and were authorized by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais.

2.3. Intrathecal (i.t.) injections

The i.t. injections were performed in accordance with the method previously described [13,22]. Briefly, a volume of 5 μ L for mice and 10 μ L for rats was administered with a 28-gauge needle connected to a 10 μ L Hamilton micro syringe, while the animal was lightly restrained to maintain the position of the needle. Puncture of the dura was indicated behaviorally by a slight flick of the tail. Behavioral evaluation was performed blindly with respect to drug administration.

2.4. Hot-plate test

The hot-plate test was used to measure acute thermal nociception according to the previously described method [39], with minor modifications. Mice were placed into a glass cylinder of 24 cm diameter on the heated surface (55 ± 0.1 °C), and the time between placement and the licking of the paws, or jumping, was recorded as index of response latency. The cut-off time was 45 s to avoid tissue damage. Each animal was tested before administration of the drugs in order to obtain the baseline. Animals were administered with 5 μ L of vehicle (phosphate-buffered saline, PBS), Ph α 1 β (30–300 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (0.1–10 pmol/site) from 0.5 to 48 h before the hot-plate test.

2.5. Formalin test

Acute neurogenic and persistent inflammatory nociception were evaluated using the formalin test [8] with minor modifications. Sixty microliters of saline containing 2.5% formalin was injected subcutaneously into the right dorsal hind paw. The rat was immediately placed

in a polycarbonate box positioned in front of a mirror for behavior observations. Nociceptive behavior was quantified by counting the time of licking, flinching and lifting of the injected hind paw. The measurements were taken in two phases: on the first phase (neurogenic) were evaluated during the period from 0 to 5 min and on the second phase (inflammatory) from 15 to 30 min after formalin injection. Intrathecal administration of the test agents was performed using a 10 μ L micro syringe containing vehicle (PBS), Ph α 1 β (30–200 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (10–200 pmol/site). To assess the preventive or the curative antinociceptive action, drugs were administered 0.16–24 h before or 0.16 h (10 min) after formalin injection.

2.6. Measurements of cerebrospinal fluid (CSF) glutamate levels

Formalin-induced nociception is related with increased levels of excitatory amino acids, as glutamate, in cerebrospinal fluid, CSF [20]. To address this possibility, we examined the effect the Ph α 1 β and ω -conotoxin MVIIA on glutamate levels of CSF after formalin injection. Rats received Ph α 1 β (200 pmol/site) and ω -conotoxin MVIIA (100 pmol/site) 3 h before or 9 min after formalin injection (post-treatment). The rats were killed with halothane 15 min after formalin injection and the CSF was extracted using cistern magna puncture technique. Glutamate measurement was performed enzymatically following the increase in the fluorescence due to the production of NADPH in the presence of glutamate dehydrogenase and NADP⁺ [24]. To start the assay, NADP⁺ (1.0 mM) and glutamate dehydrogenase (50 U) were added to the CSF samples 10 min after the emitted fluorescence was measured [28]. The excitation wavelength was set at 360 nm and the emission wavelength to 450 nm using a PTI spectrofluorimeter.

2.7. Synaptosomal preparation

Synaptosomes were prepared from spinal cord of rats. Male Wistar rats (180–250 g) were decapitated and spinal cord were quickly removed and placed in aerated (with 95% O₂/5% CO₂) ice-cold modified Krebs–Ringer buffer with minor modifications. The spinal cord was dissected from two rats and homogenized in 14 mL of ice-cold 0.32 M sucrose, and the crude synaptosomal pellet (P₂) was prepared by differential centrifugation with 1000g for 5 min followed by 15,000g for 20 min as previously described [17]. Protein was assayed by Bradford method [4].

2.8. Glutamate release in spinal cord synaptosomes

In all synaptosomal experiments, the P₂ pellet was resuspended in 4.5 mL of Krebs–Ringer buffer, aerated with 95% O₂/5% CO₂. For the test, 500 μ L of the synap-

tosomal suspension was diluted with 1500 μ L of Krebs buffer containing 5 μ L containing NADP⁺ (1 mM), glutamate dehydrogenase (50 U) and Ph α 1 β (1.25–7.5 μ M) or ω -conotoxin MVIIA (1.25–7.5 μ M). Toxins were added 100 s before stimulation with 100 μ M capsaicin. This assay relies on generation of NADPH by glutamate dehydrogenase in the presence of glutamate, with NADPH being measured fluorometrically [24]. The excitation wavelength was set at 360 nm and emission wavelength to 450 nm in a PTI spectrofluorimeter.

2.9. Measurement of [Ca²⁺]_i

Synaptosomes were loaded with 5 μ M fura-2 AM (stock solution 1 mM in DMSO) for measurements of intrasynaptosomal free calcium concentration [Ca²⁺]_i in synaptosomes. The assays were performed in a PTI spectrofluorimeter according to Gryniewicz et al. [11] with minor modifications as previously described [28]. CaCl₂ was added to synaptosomal suspension at the beginning of each fluorimetric assay (1.0 mM final concentration). Synaptosomes were stirred throughout the experiment in a cuvette maintained at 35 °C. Toxins were added to the synaptosomal suspension 100 s prior to stimulation with 100 μ M capsaicin. The [Ca²⁺]_i increase induced by membrane depolarization is strictly dependent on the presence of extracellular Ca²⁺ in these conditions [28].

2.10. Quantification of side effects

The side effects were quantified as previously described [30]. Rats received PBS, Ph α 1 β (200–1000 pmol/site), recombinant Ph α 1 β (200–1000 pmol/site) and ω -conotoxin MVIIA (10–600 pmol/site) by i.t. route and side effects were measured immediately after injection. Rats were placed in an open field 15 min for behavioral observations. A seven-point scale was used to quantify side effects with a maximum of three points for serpentine tail movements and whole body shaking and one point for the presence of allodynia (assessed via a light brushstroke to the flank). For an unrestrained rat, the absence of serpentine tail movements and discernible body shaking resulted in respective score of zero points. Mild serpentine tail movement or slight shaking or trembling of the body was each scored as one point. Moderate serpentine tail movement and whole body shaking with or without splaying of the hind limbs resulted in respective scores of two points. Continuous serpentine tail movement and severe body shaking were given the respective maximum scores of three points.

2.11. Neuropathic pain model

For induction of chronic mononeuropathy, male mice were first anesthetized by intraperitoneal injection

of 90 mg/kg of ketamine plus 3 mg/kg of xylazine hydrochloride. Then, a partial ligation of the right sciatic nerve was made by tying one-third to one-half of the dorsal portion of the sciatic nerve, using a similar procedure to that described by Malmberg and Basbaum [18]. In sham-operated mice, the nerve was exposed without ligation. Seven days after surgical procedure the mechanical sensitivity was measured to confirm the development of allodynia.

The measurement of mechanical paw withdrawal threshold was carried out using the up–down paradigm as described previously by Chaplan et al. [5]. Briefly, mice were first acclimatized (1–2 h) in individual clear Plexiglas boxes (9 × 7 × 11 cm) on an elevated wire mesh platform to allow the access to the plantar surface of the hind paws. von Frey filaments of increasing stiffness (0.02–10 g) were applied to the mice hind paw plantar surface with a pressure causing the filament to bend. Absence of a paw lifting after 5 s led to the use of the next filament with increasing weight, and paw lifting indicated a positive response and led to the use of next weaker filament. This paradigm continued until a total of six measurements or until four consecutive positive or four consecutive negative responses had occurred. The 50% mechanical paw withdraw threshold (PWT) response was then calculated from the resulting scores as described previously by Dixon [7]. The 50% PWT was expressed in grams (g), and was evaluated several times after intrathecal injection of Ph α 1 β .

2.12. Recombinant toxin

2.12.1. Plasmid construction

The coding region for the toxin was produced by PCR. Two overlapping oligonucleotides, T \times 36F (5'-CAT CCC GCG TGG TGA AAT TTG CAC CGA TGA CTG TGA ATG CTG CGG CTG TGA CAA CCA ATG TTA TTG CCC GCC GGG TTC CT-3') and T \times 36R (5'-TTT CTT TTT TAC GGT TAC AAA AAT ATT TAT TTG CAT GTG CAC ACG AGC ATT TAA AGA TAC CCA GCG AGG AAC CCG GCG GG-3'), were used as template for the PCR and two other oligonucleotides PnT \times 36ECOF (5'-AAT TGA ATT CAT CGA GGG AAG GGC TTG CAT CCC GCG TGG-3') and PnT \times 36PSTR (5'-AAT TCT GCA GTT AAG CTT TTT TAC ATT TTT CTT TTT TAC-3') were used as primers of the PCR. Primers were designed using the *Escherichia coli* codon preference and were synthesized by IDT – Integrated DNA Technologies. Amplification reaction contained the template oligonucleotides in a 0.1 μ M concentration, the amplification primers in a 1 μ M concentration, 250 μ M of each deoxynucleotide triphosphate and 2 U of the thermostable recombinant *Taq* polymerase. Each cycle consisted of denaturing the DNA at 94 °C for 1 min, annealing the primers for 1 min at 55 °C, and then

extending the primers at 72 °C for 1 min. This cycle was repeated 40 times. After the final cycle samples were chilled at 4 °C.

The amplification product was purified using the QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen, USA), digested with EcoRI and PstI and cloned into pBADmycHis-C (Invitrogen, Carlsbad, CA 92006, USA). The plasmid obtained (PnT \times 36MycHis) encodes a 10.9 kDa Ph α 1 β recombinant protein which is tagged at the N-terminus with the peptide sequence M D P S S R S A A G T I W E F I E G R and at the C-terminus with the Myc epitope and six histidine residues (Y V E Q K L I S E E D L N S A V D H H H H H H) (Fig. 7). The plasmid was purified using the Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, USA). To ensure that no mutation had been introduced by the polymerase, clones had their sequence determined by automatic sequencing using the dideoxynucleotide chain-termination reaction [33].

2.12.2. Expression and purification of the fusion protein

Escherichia coli (BL21 strain) cells were transformed with PnT \times 36MycHis. Expression of the fusion protein was induced by 0.2% L-arabinose at 37 °C. After 4 h of growth in the presence of L-arabinose, cells were harvested by centrifugation at 4000g for 20 min, suspended in 10 mL of Lysis buffer B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent (Pierce, Rockford, IL 61105, USA) and cell debris were removed by centrifugation. The soluble fusion protein was initially affinity-purified from the bacterial lysates using the B-PER 6 \times His Fusion Protein Spin Purification Kit (Pierce, Rockford, IL 61105, USA) and further purified using the Amicon Ultra-4 centrifugal filter device (Millipore Corporation, Bilerica, MA, USA).

2.13. Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SEM, ID $_{50}$ values (i.e. the dose of compounds that reduces nociceptive responses to the order of 50% relative to the control value) are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. Data were analyzed by one or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni, Dunnett or Student–Newman–Keuls when appropriate. Dose–response curves in the hot-plate and formalin tests were analyzed by one-way ANOVA with time treated as a within-subject factor. Post-hoc tests (Dunnett) were carried out when appropriate. The level of significance was set at $P < 0.05$. The percent of antinociception (i.e. % increase latency time to licking their paws or jumping from hot-plate test) was determined for each experimental group using the following formula: (%) antinociception = $100 \times [(experiment - control)/control]$. The percent of maximal inhibition in the formalin test was determined for each experimental group using the following formula (%)

inhibition = $100 \times [(\text{control} - \text{experiment})/\text{control}]$. The ID_{50} and DT_{50} values were determined by non-linear regression analysis using sigmoidal dose–response equation from individual experiments using GraphPad Software 4.0 (GraphPad, USA).

For the *in vitro* experiments, the results were expressed as mean \pm SEM. The data were analyzed by one or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls test and the statistical significance criterion was $P < 0.05$.

3. Results

3.1. $Ph\alpha 1\beta$ has antinociceptive effect in rodent models of pain

Initially, we tested $Ph\alpha 1\beta$, and compared its effect with that of ω -conotoxin MVIIA, in an acute model of thermal pain, the hot-plate test. The intrathecal (i.t.) administration of $Ph\alpha 1\beta$ (200 pmol/site) in mice produced a delayed, but long-lasting, antinociceptive action in the hot-plate test, from 3 to 24 h after injection (Fig. 1A and C). The maximum antinociceptive effect (I_{max}) was $81 \pm 6\%$ and the effective dose to produce 50% effect (ED_{50}) was 120 (70–205) pmol/site, 5 h after $Ph\alpha 1\beta$ administration. Comparatively, i.t. administration of ω -conotoxin MVIIA (10 pmol/site) induced

more short-lasting antinociception (from 2 to 5 h), with an I_{max} of $70 \pm 28\%$ and ED_{50} value of 0.17 (0.013–2.26) pmol/site, 5 h after its injection (Fig. 1B and D). Thus, $Ph\alpha 1\beta$ was less potent than ω -conotoxin MVIIA to induce antinociception in an acute pain model in mice, but its effect was persisted longer than ω -conotoxin MVIIA.

Next, we assessed the effect of $Ph\alpha 1\beta$ in a model of persistent inflammatory pain in rat, the formalin model. The pre-treatment with $Ph\alpha 1\beta$ (200 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (100 pmol/site) from 0.16 to 24 h produced antinociception in both neurogenic and inflammatory phases of the formalin test (Fig. 2). Similar to the thermal model, the antinociceptive action of $Ph\alpha 1\beta$ was longer than that of ω -conotoxin MVIIA in the formalin test (lasting 3 and 24 h in the neurogenic and inflammatory phase, respectively, Fig. 2A and B). The antinociceptive action of ω -conotoxin MVIIA in this test lasts only 3 h in both neurogenic and inflammatory pain (Fig. 2C and D). Moreover, $Ph\alpha 1\beta$ was also capable of reducing the second phase of formalin-induced nociception as early as 10 min before formalin administration (Fig. 2B).

When administered before formalin injection (pre-treatment), $Ph\alpha 1\beta$ was as effective and potent as ω -conotoxin MVIIA to produce antinociception (Fig. 3A–D). In the neurogenic phase, the I_{max} values were

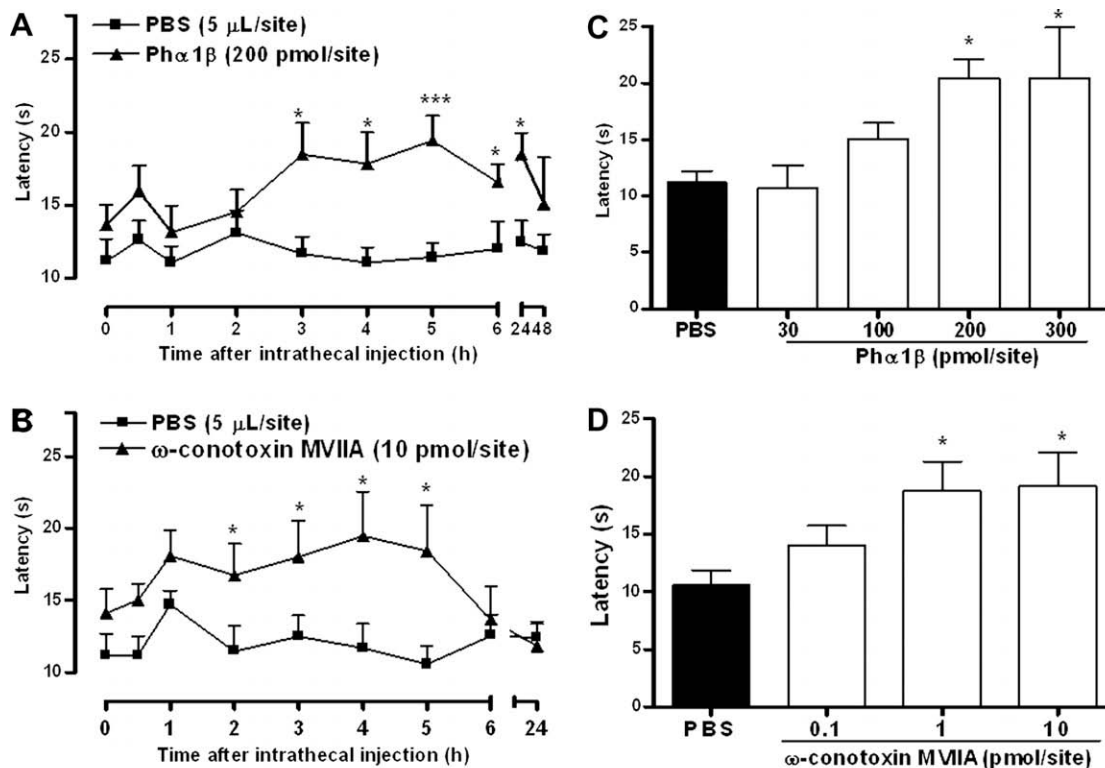


Fig. 1. Time-course (A and B) and dose–response (C and D) curves for the antinociceptive effect produced by intrathecal administration of $Ph\alpha 1\beta$ (A and C) (30–300 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (B) (0.1–10 pmol/site) in the hot-plate test in mice. For dose–response curves, drugs were injected 5 h prior of the test. Data are reported as mean \pm SEM for $n = 12$ –16 per group. $^*P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ compared to PBS, one- (C and D) or two-way (A and B) ANOVA followed by Student–Newman–Keuls and Bonferroni tests, respectively.

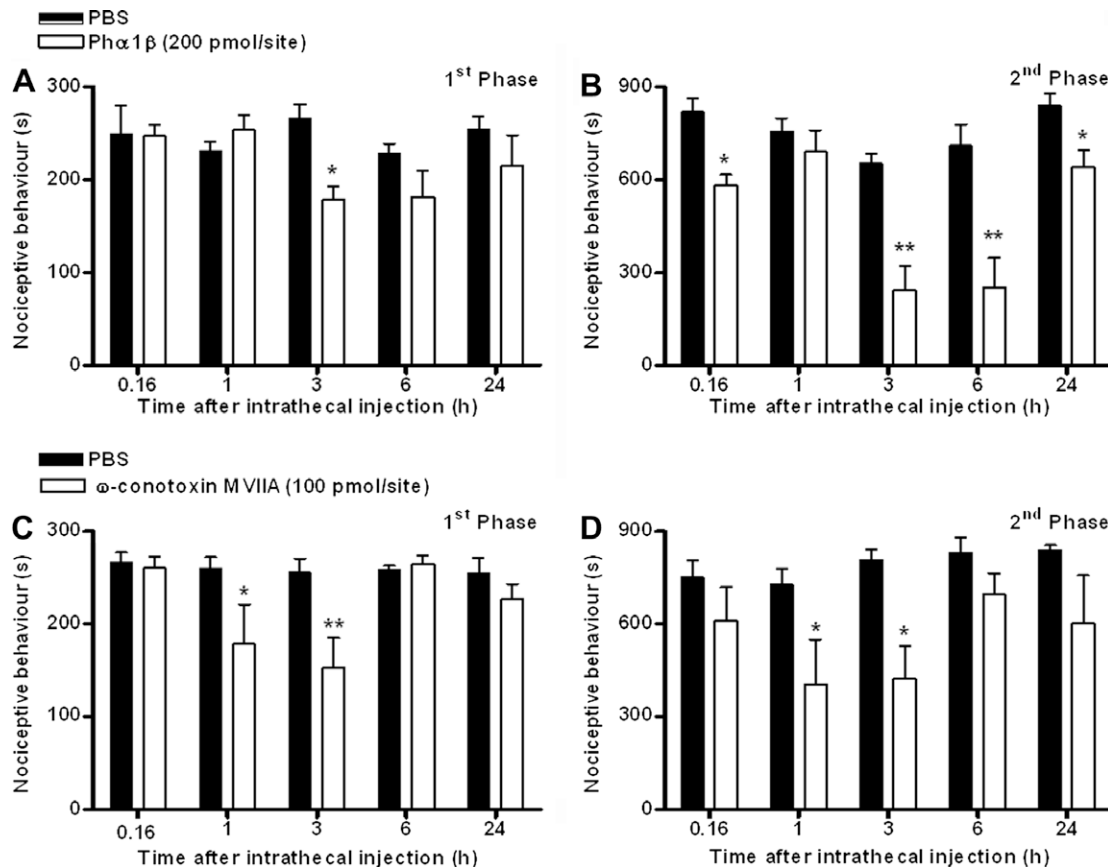


Fig. 2. Time-course curve for the antinociceptive effect produced by intrathecal pre-treatment of Ph α 1 β (200 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (100 pmol/site) administered from 0.16 to 24 h before formalin injection on neurogenic (A and C) and inflammatory (B and D) phases of the test in rats. Data are reported as mean \pm SEM for $n = 5$ –8 per group. * $P < 0.05$, compared to PBS group, two-way ANOVA followed by Bonferroni test.

55 \pm 15% and 76 \pm 9% for Ph α 1 β (67 pmol/site) and ω -conotoxin MVIIA (200 pmol/site), respectively. In the inflammatory phase of formalin-induced nociception, the I_{\max} values were 67 \pm 9% and 73 \pm 11% and the ID₅₀ values were 48 (25–92) and 63 (27–145) pmol/site for Ph α 1 β and ω -conotoxin MVIIA, respectively. Of note, the post-treatment (administered 9 min after formalin injection) with Ph α 1 β was more effective than and as potent as its pre-treatment, with I_{\max} of 87 \pm 5% and ID₅₀ of 50 (25–75) pmol/site (Fig. 3E). Nevertheless, the efficacy of ω -conotoxin MVIIA was reduced when it was administered after formalin injection with an I_{\max} value of 37 \pm 14% (Fig. 3F). Thus, different from ω -conotoxin MVIIA, Ph α 1 β was more effective to reverse an established nociceptive process.

3.2. The analgesic effect of Ph α 1 β is related to the reduction of glutamate release in spinal cord

In the spinal cord the neurotransmitter glutamate is an important mediator of pain, including that induced by formalin. As previously described [20], formalin injection increases glutamate levels in CSF animals. Both the intrathecal pre and post-treatment with Ph α 1 β (200 pmol/site) almost blocked the increase in CSF glu-

tamate levels induced by formalin in rats, with inhibitions of 78 \pm 6% and 80 \pm 13%, respectively (Fig. 4A and B). Pre-treatment with ω -conotoxin MVIIA was also able to reduce formalin-induced increase CSF glutamate levels, with an inhibition of 74 \pm 17% (Fig. 4C).

We further explored the mechanism of Ph α 1 β action using a spinal cord synaptosomal preparation *in vitro*. When spinal cord synaptosomes were stimulated with capsaicin (100 μ M, to specifically activate the spinal terminals of nociceptors) they release glutamate (Fig. 5A and B). Similar to observed *in vivo*, both Ph α 1 β or ω -conotoxin MVIIA almost abolished capsaicin-evoked glutamate release in a concentration-dependent manner, with an IC₅₀ value of 2.1 (0.8–5.4) and 4.8 (3.0–7.8) μ M, respectively. Moreover, both Ph α 1 β and ω -conotoxin MVIIA partially, but significantly, reduced capsaicin-induced increase of [Ca²⁺]_i in spinal cord synaptosomes (Fig. 5C and D), with observed I_{\max} values of 45 \pm 10% and 51 \pm 4%, respectively.

3.3. Ph α 1 β has antinociceptive effect in a neuropathic pain model

Directed by the analgesic effects in different types of pain measurement observed for Ph α 1 β , we were inter-

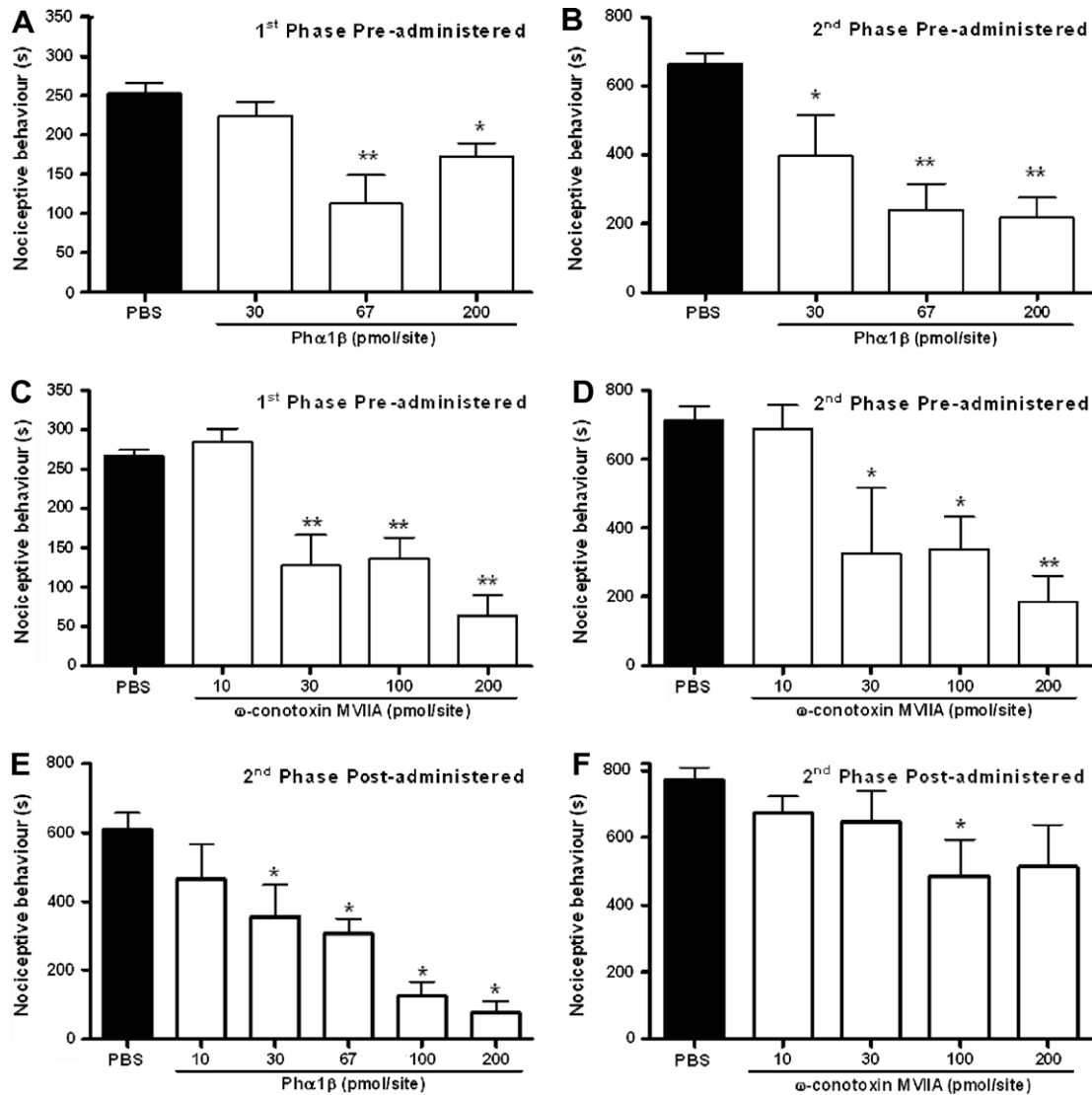


Fig. 3. (A–C) Effect of pre-treatment of Ph α 1 β (30–200 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (10–200 pmol/site) 3 h prior formalin test on the dose-response during the neurogenic (A and C) and inflammatory (B and D) phases of the formalin test in rat. (D and E) Effect post-treatment of Ph α 1 β (10–200 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (10–200 pmol/site) 9 min after formalin intraplantar formalin injection in the dose-response curve during inflammatory phase (E and F) of the formalin test in rat. Data are reported as mean \pm SEM for $n = 4$ –12 per group. * $P < 0.05$, compared to PBS group, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

ested to learn whether this novel toxin would control neuropathic pain as well. The partial sciatic nerve lesion caused a decrease on paw withdrawal from von Frey filaments measured 7 days after de surgical procedure (the value of 50% PWT diminished from 1.59 ± 0.36 g at baseline to 0.24 ± 0.08 g after lesion in operated group), whereas sham-operated group did not demonstrated tactile allodynia (the value of 50% PWT were 2.17 ± 0.43 and 2.32 ± 0.35 g before and after sham procedure, respectively). The i.t. administration of 30 pmol/site of Ph α 1 β caused a statistically significant anti-allodynic effect from 1 to 4 h after injection (Fig. 6A). Moreover, the i.t. administration of 30 pmol/site of Ph α 1 β did not alter normal mechanical sensitivity of the animals (Fig. 6B).

3.4. Ph α 1 β presents reduced side effects in rodents

We next assessed the possible side effects induced by intrathecal administration of Ph α 1 β in rodents. With doses capable of producing intense antinociceptive effects in mice, Ph α 1 β (200 pmol/site) and ω -conotoxin MVIIA (10 pmol/site) did not alter any parameter in rota-rod, open field and grip force tests in mice (data not shown). We did not detect any alteration in gross behaviors of mice treated with Ph α 1 β (200 pmol/site), but observed that some mice treated with ω -conotoxin MVIIA (10 pmol/site) developed serpentine tail movements. As previously described [19] intrathecal administration with ω -conotoxin MVIIA (10–200 pmol/site) induced dose-related side effects (including serpentine

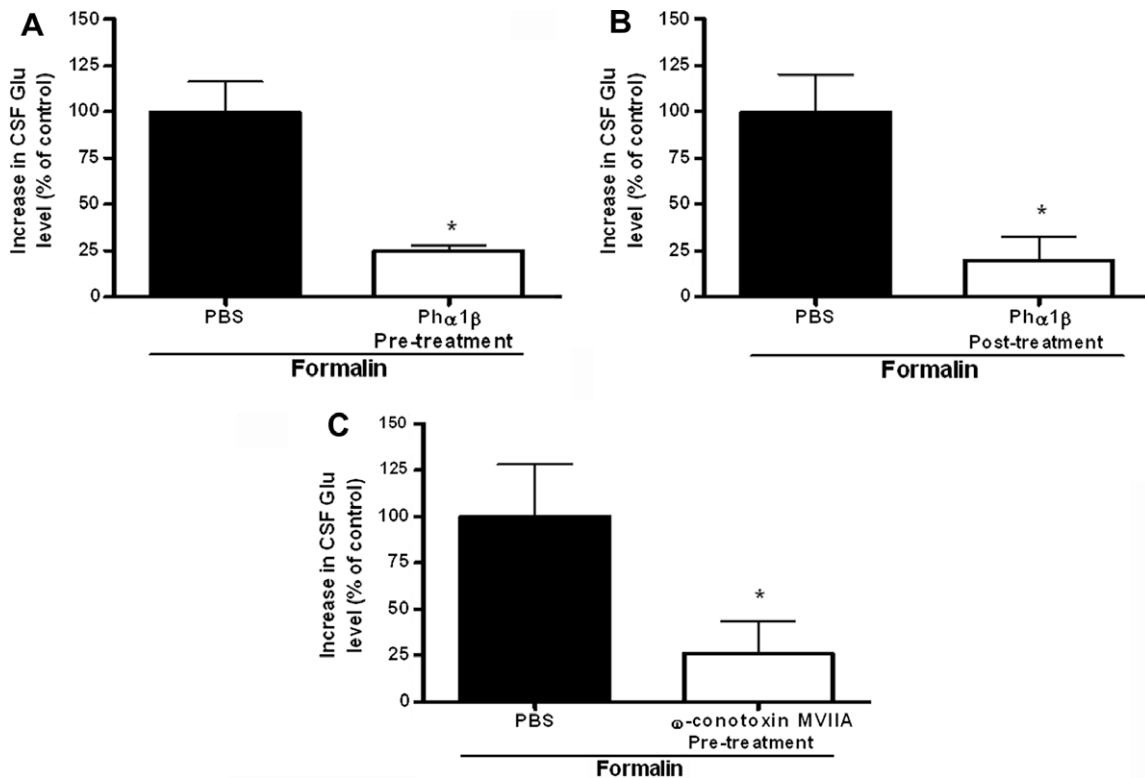


Fig. 4. Glutamate levels in the cerebrospinal fluid (CSF) of rats pre (A and C) or post-treated (B) with Ph α 1 β (200 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (200 pmol/site) in the formalin test. Data are reported as mean \pm SEM for $n = 3$ –4 per group. * $P < 0.05$, compared to PBS group.

tail movements and intermittent mild body shakes) in rats (Fig. 7). These side effects were observed with doses as low as those necessary to induce antinociception in rats (≥ 10 pmol/site), with a DT_{50} value of 287 (147–562) pmol/site. We observed that i.t. treatment with Ph α 1 β also induced side effects in rats, but only with doses higher than that necessary to induce maximal antinociceptive effect (≥ 300 pmol/site) and with DT_{50} value of 788 (485–1278) pmol/site (Fig. 7). When compared with their potencies to reduce the inflammatory phase of formalin-induced nociception in rats, the calculated therapeutic window (DT_{50}/DI_{50}) of Ph α 1 β and ω -conotoxin MVIIA were 16 and 4, respectively.

The intrathecal (i.t.) administration of Ph α 1 β (200 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (100 pmol/site) in rats caused mild hypotension with recovery to normal values after 3 h (data not shown).

3.5. Recombinant Ph α 1 β possess analgesic effect similar to native toxin

In order to become effective as a therapeutic agent it is necessary to obtain a less limited source for obtaining the toxin. In order to do that, we cloned the cDNA fragment that encodes the mature peptide of the Ph α 1 β into the vector pBADmycHisC (Invitrogen, USA) and used this construct to produce a recombinant Ph α 1 β in the bacteria *E. coli*. The recombinant Ph α 1 β , a 10,894 kDa

peptide, is tagged at the N-terminus with a peptide 19 amino acid residues long and at the C-terminus with a peptide 23 amino acid residues long, which include the Myc epitope and six histidine residues (Fig. 8A). Immunoblot analysis shows that recombinant Ph α 1 β can be specifically recognized by horse polyclonal antibodies against *P. nigriventer* total venom (Fig. 8B).

We used the formalin test for the initial evaluation of whether the recombinant toxin would be functional. As can be observed in Fig. 8C, recombinant Ph α 1 β (200 pmol/site) was as effective as native toxin to produce analgesic effect in the inflammatory phase of formalin-induced pain.

4. Discussion

Here we introduce a novel pharmacological agent for the control of pain, the Ph α 1 β toxin, previously shown to be reversibly blocker of high-voltage VSCCs. Although the toxin seems to show some preference N-type channels among the HVA Ca^{2+} channel subtypes tested, higher concentrations do interfere with other subtypes [34]. Our results show that in animal models Ph α 1 β presents a number of advantages when compared to the clinically used ω -conotoxin MVIIA.

Insults in peripheral tissues, such as skin, joints and viscera, release several algogenic mediators that in turn activate nociceptors and sensitize them for other painful

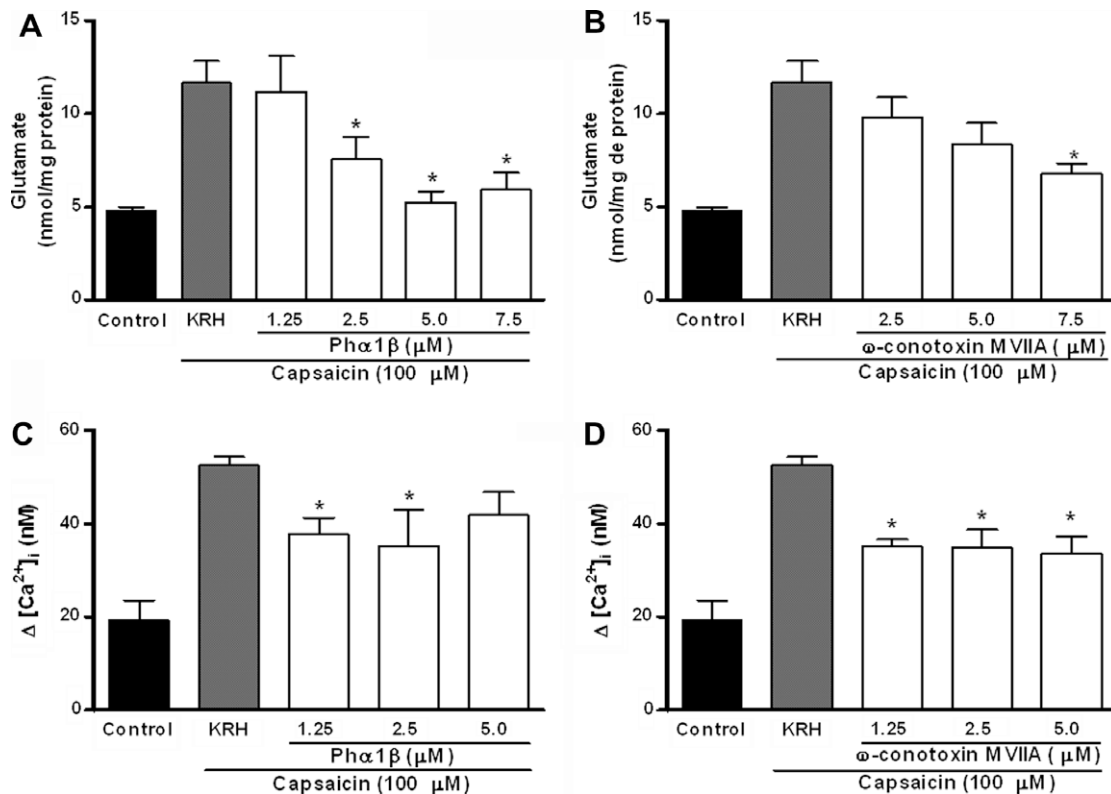


Fig. 5. The effect of Ph α 1 β and ω -conotoxin MVIIA (1.25–7.5 μ M) in capsaicin-stimulated glutamate release (A and B) or [Ca²⁺]_i increases (B and D) rat spinal cord synaptosomes. Data are reported as mean \pm SEM for $n = 3$ –6 per group. * $P < 0.05$, compared to KRH group, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

stimulus. Activation of nociceptors in the periphery produces messages which converge in the dorsal horn of the spinal cord which process the nociceptive information and project it to the cerebral cortex via a relay in the thalamus, eliciting pain [38]. There is convincing evidence by pharmacological, electrophysiological and molecular biology studies indicating that VSCC, especially from the N-type, exert a critical role in controlling nociceptive processes in the spinal cord [2,29,31].

The present study shows that a novel antagonist of high threshold VSCCs administered into lumbar intrathecal space was capable to induce potent antinociceptive effect on the classical tests for measuring acute and persistent pain. The formalin test is useful for examining possible effects on acute nociception versus persistent pain, because it produces a biphasic behavioral response with a well-resolved transition from acute pain to a more persistent pain state. The first phase of which is a measure of the direct activation of nociceptors and the second phase reflects ongoing peripheral input acting on dorsal horn neurons sensitized by the input arising in the first phase [14]. Hence, Ph α 1 β is capable of reducing pain in both normal and early sensitized spinal nociceptive transmission with a long-lasting course for its antinociceptive effect. Of particular interest from a clinical point of view is the observation that Ph α 1 β not only pre-

vented phase-2 behavior when administered before formalin injection, but it also reversed phase-2 behavior when it was administered after formalin injection. These observations raise the possibility that, with respect to persistent clinical pain states, Ph α 1 β might be useful not only for pre-emptive analgesia (when pain can be anticipated, in example postsurgical pain), but also for the more common situation in which treatment is sought long after the pain state has been established [21]. ω -Conotoxin can also reverse an established pain, but it is less potent and efficacious than Ph α 1 β to produce such effect. Further studies are needed to assess possible antinociceptive effects of Ph α 1 β in other clinically relevant models of pain.

Ph α 1 β or ω -conotoxin MVIIA also produce a potent analgesic effect in the hot-plate, a test that represents a model of acute thermal pain where tissue injury does not occur. The low potency of Ph α 1 β compared with ω -conotoxin MVIIA to produce analgesia in the hot-plate test could be an interesting characteristic, since acute thermal pain has an important physiological protective function in the preservation of living organisms and its block in some circumstances should be avoided.

N-type VSCCs in the spinal cord have an important role modulating the release of key pro-nociceptive neurotransmitters, such as glutamate. In agreement with

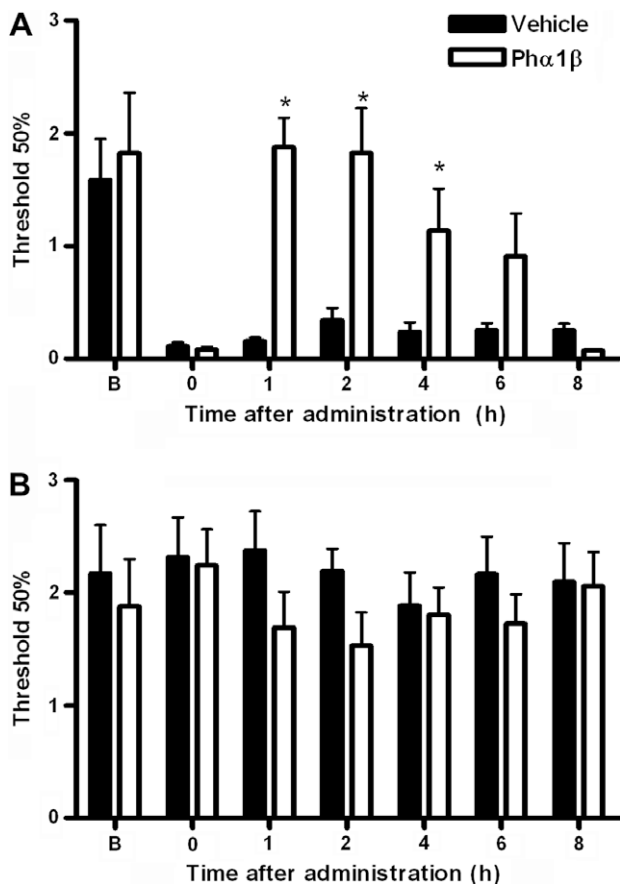


Fig. 6. (A) Effect intrathecal (i.t.) administration of Ph α 1 β (30 pmol/site) on the mechanical allodynia induced by partial sciatic nerve injury in mice. The effects of Ph α 1 β are expressed as 50% paw withdraw threshold. (B) Effect of i.t. administration of Ph α 1 β (30 pmol/site) normal mechanical sensitivity in mice. Each point represents the mean of 6–7 animals and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance levels in comparison with PBS-treated group. Statistical analysis was determined using two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, * $P < 0.05$.

the behavioral data, both toxins were able to reduce glutamate overspill in CFS in response to formalin treatment, an effect likely caused by the efficient inhibition

of evoked glutamate release from nerve terminal due to inhibition of calcium influx. Moreover, in isolated nerve terminals obtained from the spinal cord, both toxins blocked glutamate release evoked by capsaicin. The stimuli used for these *in vitro* investigations, capsaicin, activates nociceptors, strongly suggesting that the effect of the toxins is related to their ability to inhibit glutamatergic release. Interestingly, Ph α 1 β presented potency about 3 times higher than ω -conotoxin MVIIA to block the evoked release of glutamate. Furthermore, our results agree with previous findings demonstrating that N-type calcium channels could be preferentially coupled to the release of glutamate in the enhanced nociceptive transmission at the spinal level following formalin inflammation [10]. Thus, the decrease in neurotransmitter release from the presynaptic terminals by the reduction of calcium influx would reduce the activity of the dorsal horn neurons and thereby increase the threshold for nociceptive response.

Injury to peripheral nerves often results in a persistent neuropathic pain condition that is characterized by spontaneous pain, hyperalgesia and allodynia [18,37]. Injury to the nerve can produce changes in dorsal horn function and pain. This facilitated processing may be mediated in part by voltage-sensitive calcium channels (see [40] for review). Convergent observations obtained in a variety of pre-clinical models have emphasized the anti-hyperalgesic and anti-allodynic effects resulting from the block of the high-voltage-activated N-type and low-voltage-activated T-type voltage-sensitive channels at the spinal level. Studies with antagonists for the P/Q- and the L-type channels have shown low efficacy. Accordingly, we have found that intrathecal injection of Ph α 1 β was capable of reversing nerve injury-induced mechanical allodynia. This is an important finding since the available analgesic drugs often have limited therapeutic value in the management of neuropathic pain and they may, in fact, represent a risk to the patient due to their common side effects [37].

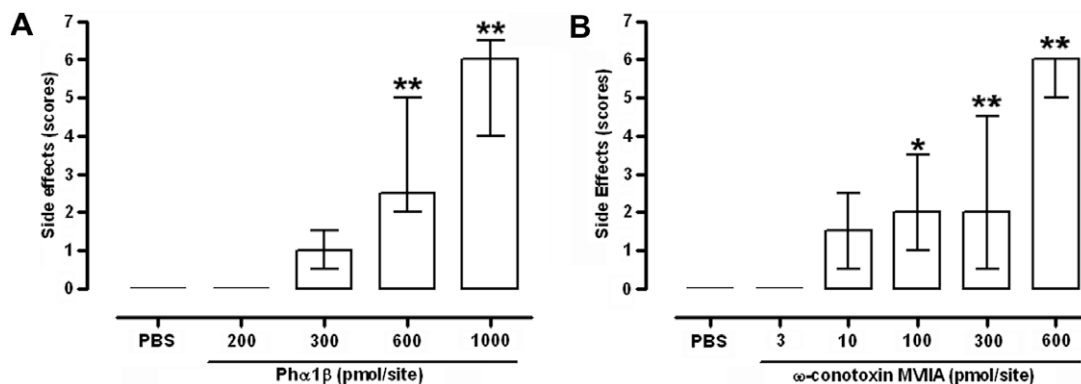


Fig. 7. Side effects produced by intrathecal administration of Ph α 1 β (200–1000 pmol/site, (A) or ω -conotoxin MVIIA (3–600 pmol/site, (B) in rats. Data are reported as median \pm quartiles for $n = 3$ –6 per group. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ compared to PBS, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

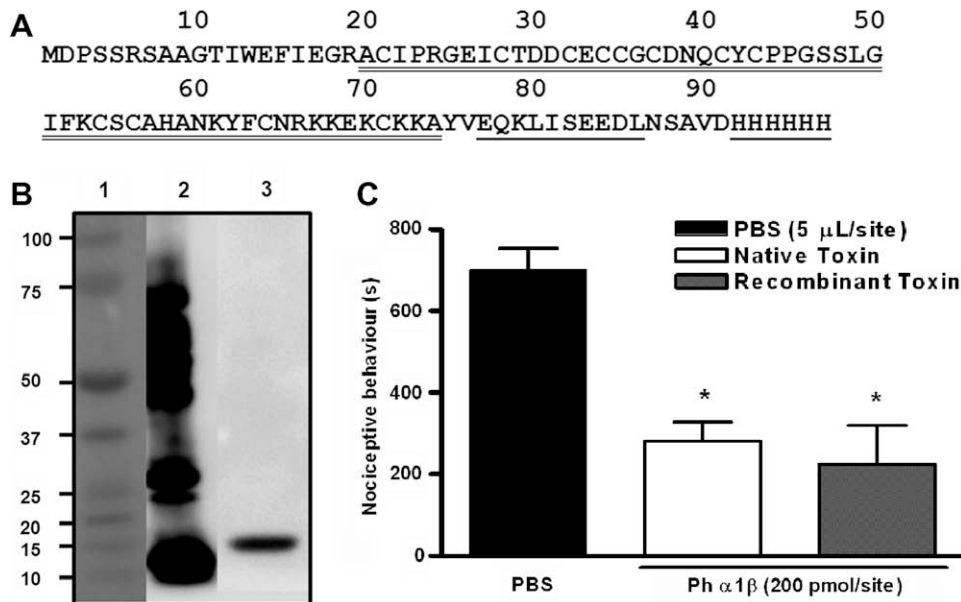


Fig. 8. Recombinant Ph α 1 β also produces analgesic effects in the formalin test. (A) Amino acid residues sequence of recombinant Ph α 1 β purified from bacterial extracts. The 55 amino acid residues long peptide that corresponds to the mature toxin purified from the spider venom is double underlined. The myc epitope sequence and the six histidine residues at the C-terminal end of the peptide were underlined. (B) Immunoblot analysis of purified fraction of recombinant Ph α 1 β . Lane 1: molecular weight marker, size of the bands is indicated on the left. Lane 2: 1.5 μ g of *P. nigriventer* total venom. Lane 3: sample of purified recombinant Ph α 1 β . (C) Effect of post-treatment with native or recombinant Ph α 1 β (200 pmol/site) during inflammatory phase of the formalin test in rat. Data are reported as mean \pm SEM for $n = 3$ –5 per group. * $P < 0.05$, compared to PBS group, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

It has been shown that intrathecal injection of ω -conotoxins in rats consistently caused serpentine tail movements and whole body shaking, suggestive of cerebellar-related motor alterations [19,30,31]. Furthermore, serpentine tail movements and whole body shaking could be rarely detected in mice, a result that we have reproduced (not shown). As ziconotide can produce side effects in human, these results suggest that rats are more sensitive and perhaps more predictive to detect side effects of VSCC blockers injected intrathecally.

It is noteworthy that Ph α 1 β is capable of producing maximal analgesia with doses in which it did not induce potential side effects. In contrast, the maximal analgesia induced by ω -conotoxin MVIIA could only be observed in doses that caused severe side effects. These findings suggest that, different from ω -conotoxin MVIIA, dose-titration with Ph α 1 β in a clinical setting could be possible. Thus, Ph α 1 β has a higher therapeutic index and may have superior efficacy for the relief of pain that could enable its use in a clinical setting. However, more pre-clinical and toxicological tests must be conducted prior to the use of Ph α 1 β in humans. In this respect, the fact that we were able to obtain a functional recombinant Ph α 1 β that produces a response similar to that of the native toxin may facilitate future pre-clinical and clinical studies.

The better analgesic profile of Ph α 1 β compared with ω -conotoxin MVIIA (i.e. lower potency in acute physio-

logical pain, greater potency in persistent pathological pain and larger therapeutic window) can be explained by several factors, including different affinities of toxins for the activated states or splice variants of N-type VSCCs and binding in other types of VSCCs [1,16,36]. In fact, different from ω -conotoxin MVIIA, Ph α 1 β also can act on other types of VSCCs that are involved in pain transmission in the spinal cord, such as P/Q, R and L, that could improve its analgesic action [34]. Since our previous electrophysiological study was only focused in VSCCs, we cannot exclude a role for other ion channels, such as TRP or ionotropic glutamate receptors, in the antinociceptive response caused by Ph α 1 β . Further, studies must be carried out to elucidate this point. The present study demonstrates that both native as well as the recombinant Ph α 1 β have analgesic effect in rodent models of pain, suggesting that this toxin has the potential to be used as a drug in the control of persistent pathological pain.

Acknowledgements

Supported by Instituto do Milenio MCT/CNPq, Capes, Pronex and Fapemig. The authors A.H.S., J.F., M.N.C., L.B.V., M.R., M.A.M.P., V.F.P. and M.V.G. declare they have deposited a patent covering the use of Ph α 1 β for pain management.

References

- [1] Altier C, Dale CS, Kisilevsky AE, Chapman K, Castiglioni AJ, Matthews EA, et al. Differential role of N-type calcium channel splice isoforms in pain. *J Neurosci* 2007;27:6363–73.
- [2] Altier C, Zamponi GW. Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:465–70.
- [3] Bowersox SS, Gadbois T, Singh T, Pettus M, Wang YX, Luther RR. Selective N-type neuronal voltage-sensitive calcium channel blocker, SNX-111, produces spinal antinociception in rat models of acute, persistent and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:1243–9.
- [4] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [5] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994;53:55–63.
- [6] Cordeiro Mdo N, de sueiredo SG, Valentim Ado C, Diniz CR, von Eickstedt VR, Gilroy J, et al. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon* 1993;31:35–42.
- [7] Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1980;20:441–62.
- [8] Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4:161–74.
- [9] Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MA. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:579–88.
- [10] Gruner W, Silva LR. Omega-conotoxin sensitivity and presynaptic inhibition of glutamatergic sensory neurotransmission in vitro. *J Neurosci* 1994;14:2800–8.
- [11] Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440–50.
- [12] Guatimosim C, Romano-Silva MA, Cruz JS, Beirao PS, Kalapothakis E, Moraes-Santos T, et al. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Br J Pharmacol* 1997;122:591–7.
- [13] Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 1980;67:313–6.
- [14] Ji RR, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* 2001;8:1–10.
- [15] Kristipati R, Nadasdi L, Tarczy-Hornoch K, Lau K, Miljanich GP, Ramachandran J, et al. Characterization of the binding of omega-conopeptides to different classes of non-L-type neuronal calcium channels. *Mol Cell Neurosci* 1994;5:219–28.
- [16] Lewis RJ, Nielsen KJ, Craik DJ, Loughnan ML, Adams DA, Sharpe IA, et al. Novel omega-conotoxins from *Conus catus* discriminate among neuronal calcium channel subtypes. *J Biol Chem* 2000;275:35335–44.
- [17] Li X, Eisenach JC. Alpha2A-adrenoceptor stimulation reduces capsaicin-induced glutamate release from spinal cord synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:939–44.
- [18] Malmberg AB, Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 1998;76:215–22.
- [19] Malmberg AB, Yaksh TL. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J Neurosci* 1994;14:4882–90.
- [20] Malmberg AB, Yaksh TL. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci* 1995;15:2768–76.
- [21] Mathur SV. Ziconotide: a new pharmacological class of drug for the management of pain. *Semin Anesth* 2000;19:67–75.
- [22] Mestre C, Pelissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschaliere A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1994;32:197–200.
- [23] Miljanich GP, Ramachandran J. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:707–34.
- [24] Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem* 1987;49:50–7.
- [25] Penn RD, Paice JA. Adverse effects associated with the intrathecal administration of ziconotide. *Pain* 2000;85:291–6.
- [26] Prado MA, Guatimosim C, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Romano-Silva MA. 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* 1996;314:145–50.
- [27] Reis HJ, Prado MA, Kalapothakis E, Cordeiro MN, Diniz CR, De Marco LA, et al. Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3–4) from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem J* 1999;343:413–8.
- [28] Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos R, Ribeiro AM, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, et al. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTx2 and potassium depolarization. *Biochem J* 1993;296:313–9.
- [29] Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Kazuno A, Matsuda Y, Nonaka T, et al. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. *EMBO J* 2001;20:2349–56.
- [30] Smith MT, Cabot PJ, Ross FB, Robertson AD, Lewis RJ. The novel N-type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose-dependent antinociception after intrathecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices. *Pain* 2002;96:119–27.
- [31] Snutch TP. Targeting chronic and neuropathic pain: the N-type calcium channel comes of age. *NeuroRx* 2005;2:662–70.
- [32] Staats PS, Hekmat H, Staats AW. The psychological behaviorism theory of pain and the placebo: its principles and results of research application. *Adv Psychosom Med* 2004;25:28–40.
- [33] Takahashi T, Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 1993;366:156–8.
- [34] Vieira LB, Kushmerick C, Hildebrand ME, Garcia E, Stea A, Cordeiro MN, et al. Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:1370–7.
- [35] Wang YX, Bezprozvannaya S, Bowersox SS, Nadasdi L, Miljanich G, Mezo G, et al. Peripheral versus central potencies of N-type voltage-sensitive calcium channel blockers. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1998;357:159–68.
- [36] Winquist RJ, Pan JQ, Gribkoff VK. Use-dependent blockade of Cav2.2 voltage-gated calcium channels for neuropathic pain. *Biochem Pharmacol* 2005;70:489–99.
- [37] Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 1999;353:1959–64.
- [38] Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000;288:1765–9.
- [39] Woolfe G, MacDonald A. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. *J Pharmacol Exp Ther* 1944;80:300–7.
- [40] Yaksh TL. Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. *J Pain* 2006;7:S13–30.
- [41] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109–10.

Phoneutria Spider Toxins Block Ischemia-Induced Glutamate Release, Neuronal Death, and Loss of Neurotransmission in Hippocampus

Ana Cristina do Nascimento Pinheiro,¹ Adriano Jesus da Silva,² Marco Antonio M. Prado,^{3,4,5,6} Marta do Nascimento Cordeiro,⁷ Michael Richardson,⁷ Monalise Costa Batista,¹ Célio José de Castro Junior,¹ André Ricardo Massensini,² Cristina Guatimosim,⁸ Marco A. Romano-Silva,¹ Christopher Kushmerick,² and Marcus Vinicius Gomez^{1,9*}

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the effect of spider toxins on brain injury induced by oxygen deprivation and low glucose (ODLG) insult on slices of rat hippocampus. After ODLG insult cell viability in hippocampal slices was assessed by confocal microscopy and epifluorescence using the live/dead kit containing calcein-AM and ethidium homodimer and CA1 population spike amplitude recording during stimulation of Schaffer collateral fibers. Spider toxins Tx3–3 or Tx3–4 and conus toxins, ω -conotoxin GVIA or ω -conotoxin MVIIC are calcium channel blockers and protected against neuronal damage in slices subjected to ODLG insult. Confocal imaging of CA1 region of rat hippocampal slices subject to ischemic insult treated with Tx3–3, Tx3–4, ω -conotoxin GVIA or ω -conotoxin MVIIC showed a decrease in cell death that amounted to $68 \pm 4.2\%$, $77 \pm 3.8\%$, $32 \pm 2.3\%$, and $46 \pm 2.9\%$, respectively. This neuroprotective effect of Tx3–4 was corroborated by electrophysiological recordings of population spikes amplitudes in CA1. The neuroprotection promoted on hippocampal slices by Tx3–3 or Tx3–4 was also observed when the toxins were applied 10, 20, 30, 60, 90, or 120 min after induction of the ODLG injury. During the ischemic insult, glutamate release from slices was increased by 71% (from 7.0 ± 0.3 nM/mg of protein control slices not subjected to ischemia to 12 ± 0.4 nM/mg of protein in slices exposed to ischemia). Tx3–3, Tx3–4, ω -conotoxin GVIA or ω -conotoxin MVIIC inhibited the ischemia-induced increase on glutamate release by 54, 72, 60, and 70%, respectively. Thus Tx3–3 and Tx3–4 provided robust ischemic neuroprotection showing potential as a novel class of agent that exerts neuroprotection in an in vitro model of brain ischemia.
© 2009 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: calcium channels blockers; ischemia; neuroprotection

¹Laboratório Neurociência, Faculdade Medicina UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil; ²Departamento Fisiológica e Biofísica, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil; ³Robarts Research Institute, University of Western Ontario, London, Canada; ⁴Department of Physiology and Pharmacology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada; ⁵Department of Anatomy and Cell Biology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada; ⁶Programa em Farmacologia Bioquímica e Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ⁷Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte-MG, Brazil; ⁸Departamento de Morfologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil; ⁹Núcleo de Pós-graduação Santa Casa, Belo Horizonte, MG, Brazil
Grant sponsors: CNPq/MCT (Instituto do Milênio), PRONEX-MG, Fapemig, and Capes.

*Correspondence to: Marcus Vinicius Gomez, Laboratório de Neurociência-Faculdade Medicina UFMG, 30130-100-Belo Horizonte-MG-Brazil.

E-mail: marcusvgomez@gmail.com.br

Accepted for publication 19 January 2009

DOI 10.1002/hipo.20580

Published online 15 April 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

INTRODUCTION

Cell calcium plays a key role in mediating ischemic neuronal damage (Kristian and Siesjo, 1996) and its intracellular concentration is critically regulated. Electrophysiology, pharmacology and genetics techniques have been used to characterize several types of high voltage-dependent calcium channels (VDCC). These channels are classified as L-, N-, P-, Q-, R-, or T-type based on the biophysical and pharmacological properties of the currents they mediate (Mintz et al., 1992; Dunlap et al., 1995; Randal and Tsien, 1995). The presynaptic Ca^{2+} influx that generates glutamate release during brain ischemia is mediated via VDCC. It has been shown that P- and Q-type calcium channels contribute significantly to glutamate release in vivo (Valentino et al., 1993) and in vitro (Guatimosim et al., 1997) making these channels targets for therapeutic intervention in excitotoxic neuronal death.

The strategy for prey capture through the actions of a mixture of toxins directed toward multiple molecular targets is widely prevalent in arthropods. Among them, the venom of the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer* has been investigated and it was showed to contain a mixture of toxins that affect ionic channels (for review see Gomez et al., 2002; Pinheiro et al., 2006). The toxins Tx3–3 and Tx3–4 purified from the venom (Cordeiro et al., 1993) inhibit calcium influx (Miranda et al., 1998; 2001) and exocytosis (Guatimosim et al., 1997) in synaptosomes by targeting P/Q calcium channels in nerve endings. Moreover these toxins also inhibit glutamate release in synaptosomes (Prado et al., 1996; Reis et al., 1999). Activation of glutamate excitatory amino acid transmitter receptors and intracellular accumulation of calcium are strongly implicated in the promotion of neuronal degeneration after brain ischemia (Siesjo, 1990). Thus VDCC blockers, especially those that block excitatory transmitter release and calcium influx might be expected to be neuroprotective after ischemic insult to the brain. The aim of the present article was to study the action of these purified toxins, Tx3–3 and Tx3–4, on in vitro hippocampal ischemia induced by oxygen and glucose deprivation (ODLG).

MATERIALS AND METHODS

Drugs

The Tx3-3 and Tx3-4 were purified from the PhTx3 fraction of the venom of the spider *P. nigriventer* by a combination of gel filtration, reverse phase FPLC on Pep-Rpc and Pro-Rpc columns, reverse phase high-performance liquid chromatography (HPLC) on Vydac C18, and ion exchange HPLC on cationic and anionic columns (Cordeiro et al., 1993). By mass spectroscopy analysis Tx3-3 and Tx3-4 have molecular weights of 6,300 and 8,449, respectively. The snail toxins ω -conotoxin MVIIC and ω -conotoxin GVIA were obtained from Peptides, Japan. All other chemicals were of analytical grade.

Hippocampal Slices

All procedures were approved by a local Ethics Committee and followed the guidelines for the Use and Care of Animals for Research issued by the NIH. Wistar rats (180–200 g) were killed by decapitation and their brain rapidly (<1 min) removed and submerged in cold (4°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mMol/L): 127 NaCl, 2 KCl, 10 glucose, 1.2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 MgSO₄, 127 NaCl, 2 KCl, 10 glucose, 1.2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, 10 HEPES bubbled with 95% O₂/5% CO₂. Both *hippocampi* were dissected and 7–8 transverse slices (0.4 mm) were obtained with a McIlwain Tissue Chopper (Brinkman Instruments, UK). The first three (septal) slices of each hippocampus were discarded and the other slices were placed on nylon mesh platforms in a covered incubation chamber. The slices were submerged on ACSF bubbled with 95% O₂/5% CO₂ for 60–90 min at 36.5°C to recovery from the trauma. The slices used for oxygen deprivation low glucose (ODLG) insult were transferred to small chambers (25 ml). After 30 min the slices on their floating nylon platforms were transferred to insult chambers (25 ml) containing 95% N₂/5% CO₂ bubbled ACSF with 4 mmol/L glucose for 10 min at 36.5°C in the presence or absence of the test toxins (Monette et al., 1998). Treatments (test toxins) were present for 30 min before, and during 10 min of ODLG insult on hippocampus. Thus, the slices obtained from the same animal were incubated in ischemic and control conditions. For each experiment, 3–4 slices were incubated together on the perfusion chamber with or without toxin during the ischemic insult. Thereafter, the slices were washed (with ACSF) during the 4-h reperfusion period before assessing neuronal viability.

Confocal Microscopy

To analyze cell viability slices were stained with 6 mmol/L ethidium homodimer-AM and 4 mmol/L calcein-AM (live/dead assay, Molecular Probes, Eugene, OR) for 30 min and then washed for 15 min in 2 ml of 95% O₂/5% CO₂ ACSF at room temperature. During the staining procedure slices were

protected from light. Viable cells showed green fluorescence of calcein and dead cells were indicated by the red fluorescence of ethidium homodimer. Images were acquired using an Axiovert 200M using the ApoTome system or a LEICA SP5 confocal microscope to obtain optical sections of the tissue. Objectives used were 20× dry, 40× water immersion (1.2 NA) and a 63× oil immersion (1.4 NA). Confocal images showing specific red-fluorescent nucleic acid staining of dead cells were collected and used to quantify the ischemia-induced neurotoxicity. We used the Confocal Assistant software to combine consecutive optical sections (1,024 × 1,024) from a Z-series to create image reconstructions. To improve images for quantitative analysis, they were processed using the median filter. Quantification of dead cells required identification of their nuclei fluorescently stained with ethidium homodimer. In the current approach, we define nucleus as connected pixels that were above a threshold. This threshold was calculated using the image histogram, and pixels below the threshold were set to 0. Regions in the CA1 area of hippocampus were selected from the threshold images and analyzed using the MetaMorph Imaging System to calculate the percentage of threshold area in the image which reflects the number of dead cells.

To test for the neuroprotective effect of Tx3-3 or Tx3-4 treatments, after induction of ischemia, hippocampal slices were submitted to ODLG insult for 10 min and after the onset of the ischemia they were reperfused for 10, 20, 30, 60, 90, or 120 min in ACSF with 10.0 mM glucose bubbled with 95% O₂/5% CO₂ at 36.5°C. After the above periods of time, the slices were treated/not treated with of Tx3-3 (8 nM) or Tx3-4 (8.0 nM) for 30 min. Thereafter, the slices were washed with ACSF with 10.0 mM glucose during the 4-h reperfusion period before assessing neuronal viability. The morphological analysis of dead cells was performed in eight fields per slice from three different experiments in control (ischemic) or treated experiments (100 cells were counted/field).

Electrophysiology

Experiments were performed “blind” in the sense that the experimenter did not know if the sample tested contained toxin or blank until after the data was recorded and analyzed. Slices for electrophysiology were prepared as described above, except that a vibrating slicer (Model 752m, Campden Instruments) was used. Schaffer collateral fibers were stimulated using a platinum/iridium concentric electrode connected to a constant current isolated stimulator that delivered 1 mA stimuli of 0.2 ms duration. Recordings were obtained via glass micropipettes (tip diameter 5–10 microns) filled with a CSF connected to an Axoclamp 2D amplifier (Molecular Devices) under the control of WCP software (Strathclyde Electrophysiological Software, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland). For each experiment, population spikes amplitudes were recorded from three slices which were then exposed to oxygen and glucose deprivation for 10 min with or without 20 min before incubation with toxin (or blank). The slices were then incubated for 4 h, after which population spikes amplitudes were recorded again

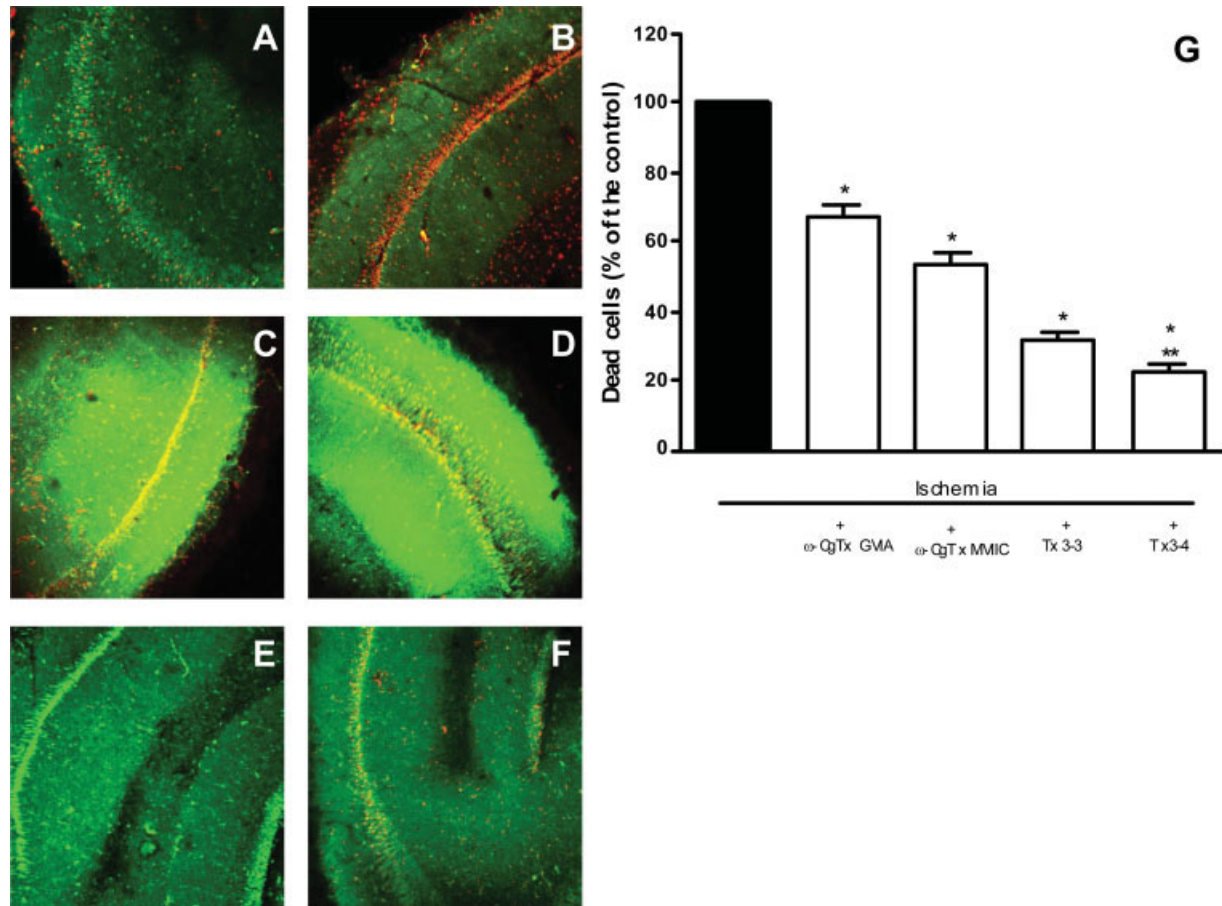


FIGURE 1. Confocal images ($10\times$ magnification) of representative hippocampal slices showing control slice not submitted to ischemia (A); hippocampal slices submitted to ischemia (B) and hippocampal slices subjected to ischemia in the presence of $1.0\ \mu\text{M}$ ω -conotoxin GVIA (C), 100-nM ω -conotoxin MVIIC (D), $8.0\ \text{nM}$ Tx3-3 (E), and $8.0\ \text{nM}$ Tx3-4 (F). The red color indicates dead cells and the green color live cells. The G graph shows the percent of dead cells on hippocampal CA1 region of the slices submitted to ischemia insult no treated (black bar) and treated ischemic slices

by $1.0\ \mu\text{M}$ ω -conotoxin GVIA, $100\ \text{nM}$ ω -conotoxin MVIIC, $8.0\ \text{nM}$ of Tx3-3 or $8.0\ \text{nM}$ of Tx3-4 (white bars). Dead cells in the treated slices are given as percentage of the respective ischemic untreated slices (B). The results express the mean \pm standard error of mean (SEM) of dead cells in eight fields of at least three different experiments. (100 cells were counted/field). For other details, see Methods section. *Different from ischemic slice without treatment, $P < 0.05$. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

and compared with their initial values. Results shown are from three independent experiments, each of which included a positive control for the effect of ischemia and the blanks served as negative controls to guarantee that the observed protection was due specifically to the toxin. In addition, Sham-ODLG experiments were performed in which the slices underwent identical handling but were not exposed to ODLG solution.

Glutamate Release Assay

After ODLG insult the incubation medium containing hippocampal slices was centrifuged ($1000g$ for 1min) and the supernatant was collected for glutamate assay. Protein in the pellet was measured as described by Bradford (1976). Glutamate measurement in the supernatant was performed enzymatically after the increase in the fluorescence due to the production of NADPH^+ in the presence of glutamate dehydrogenase and NADP^+ (Nicholls et al., 1987). To start the assay, NADP^+

($1.0\ \text{mM}$) and glutamate dehydrogenase ($50\ \text{units}$) were added to the samples and the emitted fluorescence was measured (Romano-Silva et al., 1993). The excitation wavelength was set at $360\ \text{nm}$ and the emission wavelength to $450\ \text{nm}$ using a PTI spectrofluorimeter.

Statistics

Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) with a significance level of $P < 0.05$.

RESULTS

The neuroprotection effect of ω -GVIA, ω -MVIIC, Tx3-3 and Tx3-4 toxins was tested against the neuronal death induced in CA1 hippocampal slices submitted to ODLG insult. Figure 1 shows confocal images of control slice not subjected

to ischemia (A), ischemic slice not treated (B) and ischemic slices treated with 1 μ M of ω -GVIA (C), 100 nM of ω -MVIIC (D), 8.0 nM of Tx3-3 (E) or 8.0 nM of Tx3-4, (F). Hippocampal slices submitted to ODLG insult in the presence of the spider toxins showed that the green live cells were abundant with a virtual exclusion of red dead cells indicating a robust protection of deprived slices treated with the Tx3-3 or Tx3-4 toxins. Cell protection effect was also observed for the Conus toxins ω -GVIA, ω -MVIIC, blockers of N- and N-P/Q types of calcium channels, respectively, but with less efficacy compared with spider toxins at the tested concentrations, see in bar presentation, Figure 1G. The confocal images of treated deprived slices with Tx3-3 and Tx3-4 were almost similar to nondeprived control or sham slices (not shown). The quantitative analysis of the neuroprotection induced by 1.0 μ M ω -conotoxin GVIA or 100 nM ω -conotoxin MVIIC were $32 \pm 2.3\%$ and $46 \pm 2.9\%$ percent, respectively. Spider toxins Tx3-3 and Tx3-4 yield percentage of blockage of 68 ± 4.2 and $77 \pm 3.8\%$, respectively (Fig. 1G). Hippocampal slices subjected to ODLG insult in the presence of ω -Conotoxin MVIIC showed greater protection than that induced by ω -conotoxin GVIA ($P < 0.05$). However, they were both less efficient than the spider toxins. Despite the small difference, the neuroprotection induced by Tx3-4 was significantly higher than that induced by Tx3-3, $P < 0.05$. The neuroprotective effect of the spider toxins at the concentration of 4.0 nM was lower (about 30%), whereas at the concentration of 16 nM, the neuroprotection effect was not statistically different from that observed with 8.0 nM, $P > 0.05$ (data not shown).

We next tested functional protection of CA1 neurotransmission by recording population spike amplitude before and after ischemic insult (Fig. 2). For these experiments, we focused on Tx3-4, which was the most protective toxin based on the experiments of Figure 1. In nontreated slices, 10 min ischemic insult resulted in almost complete abolition of the population spike amplitude recorded 4 h later. Without treatment, slices lost $95.3 \pm 2.4\%$ of the population spike amplitude recorded before ischemic insult. With treatment with 16 nM Tx3-4, population spike amplitudes loss was reduced to $47 \pm 4.4\%$. In sham ODLG experiments population spike amplitudes loss was less than 10%. Thus, the observed neuroprotection by Tx3-4 translated into functional preservation of CA1 neurotransmission.

The neuroprotection induced by spider toxins, Tx3-3 and Tx3-4, added to the incubation medium 10, 20, 30, 60, 90, or 120 min after the onset of the hippocampal ischemia is shown in Figure 3. In comparison with ischemic slices which were not treated with the toxins, both Tx3-3 (8 nM) and Tx3-4 (8.0 nM), they significantly attenuated overall hippocampal ischemic neuronal damage on all periods of time used on this study ($P < 0.05$). The percentage values for the neuroprotection induced by Tx3-3 were $62 \pm 3.2\%$, $56 \pm 4.6\%$, $65 \pm 4.8\%$, $48 \pm 3.6\%$, $36 \pm 4.3\%$, and $19 \pm 3.0\%$, respectively ($P < 0.05$). For Tx3-4, the values were $66 \pm 4.2\%$, $63 \pm 3.2\%$, $65 \pm 4.6\%$, $66 \pm 3.7\%$, $36 \pm 3.7\%$, and $12 \pm 3.6\%$, respectively ($P < 0.05$).

Hippocampus

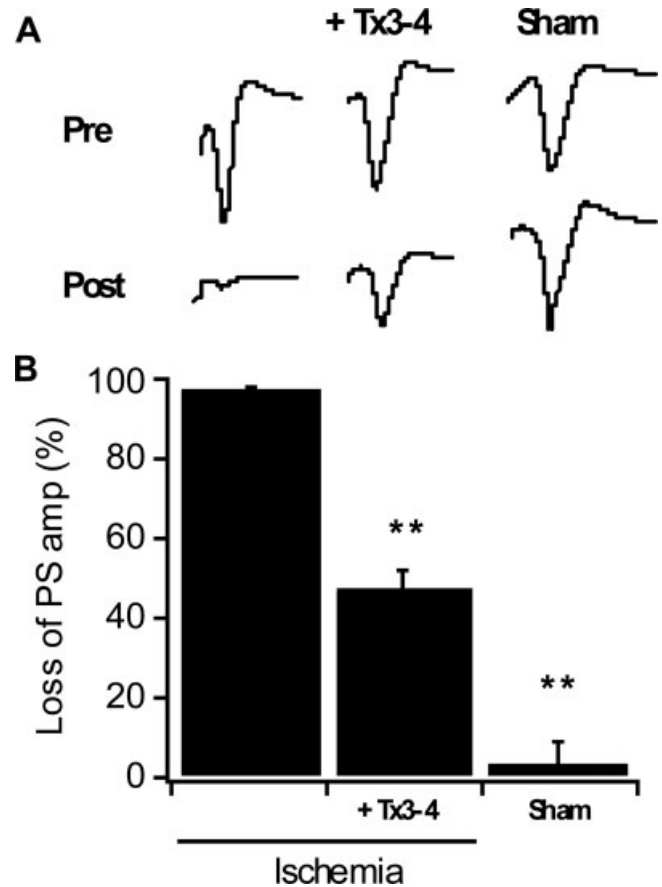


FIGURE 2. Tx3-4 protects against population spike loss in CA1. Population spikes amplitudes were measured before (Pre) and after (Post) ODLG treatment and 4-h recovery, or after an equivalent period without ODLG and without toxin (sham). Loss of population spike amplitude was calculated as the percentage difference in amplitude in the Post recording compared with Pre. (A) This shows representative traces from slices subject to ODLG insult with or without Tx3-4, or sham-treated slices. (B) This shows the quantification of three independent experiments. Bar height represents the population spikes amplitudes, mean and error bars are 1 SEM. (**difference in mean statistically significant, $P < 0.01$, paired student *t*-test).

It is well known that in the process of ischemia, a pivotal change is the increase on glutamate release, the main excitatory neurotransmitter in the central nervous system. Based on the known actions of the *Phonotria* toxins in VGCC, we hypothesized that they may decrease glutamate secretion induced by ischemic conditions. Hence, we measured glutamate release from hippocampus slices submitted to ischemia in the presence of calcium channel blocker toxins from conus and spider toxins. The glutamate release from hippocampal slices not subjected to ischemia was 7.0 ± 0.3 nmol/mg protein, whereas in the ischemic condition induced by ODLG insult, glutamate release increased to 12 ± 0.4 nmol/mg protein or about 71% more than that of the control not subjected to ischemia (Fig. 4). ω -Conotoxin MVIIC (100 nM), ω -Conotoxin GVIA (1.0 μ M), Tx3-3 (8.0 nM) or Tx3-4 (8.0 nM) inhibited the ischemia-induced release of glutamate to values of 9.0 ± 0.7 , 8.5 ± 0.7 ,

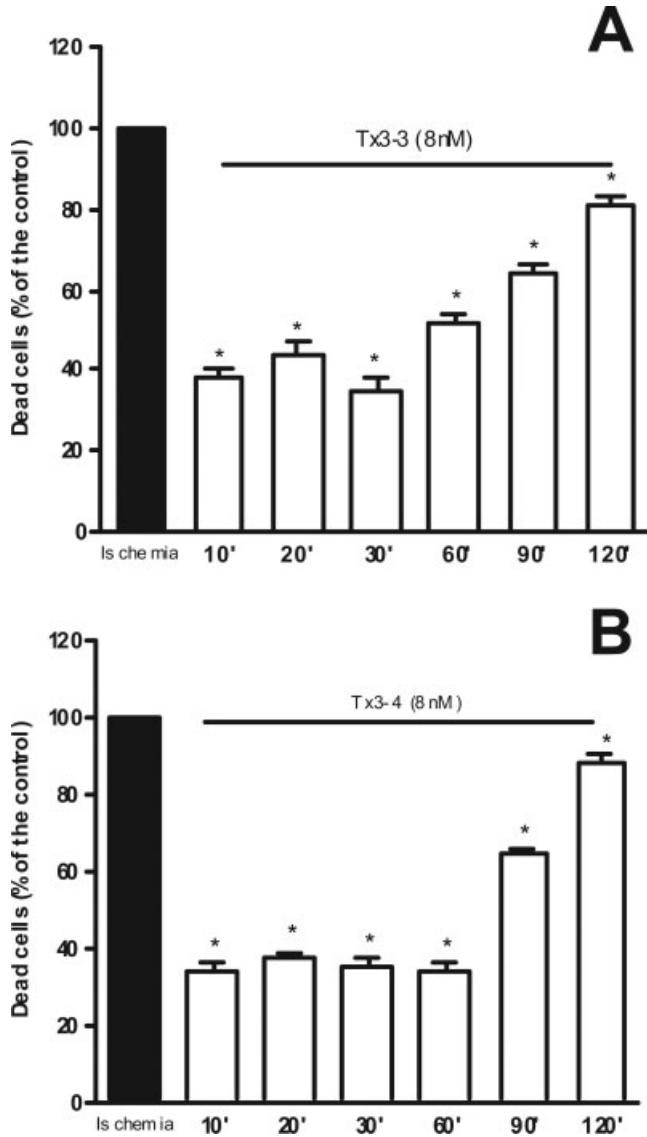


FIGURE 3. Time course of the neuroprotection induced by Tx3-3 or Tx3-4 toxins applied after the onset of the ischemia in hippocampal slices. Hippocampal slices were submitted to ODLG insult for 10 min and after that they were incubated for 10, 20, 30, 60, 90, or 120 min in ACSF, 10-mM glucose bubbled with 95% O₂/5% CO₂ at 36.5°C and cell viability was assessed by the homodimer-AM/calcein-AM assay. After the above times, they were not treated (black bars) or treated (white bars) with Tx3-3, 8.0 nM (A) or Tx3-4, 8.0 nM (B) for 30 min. Thereafter, the slices were washed with ACSF 10 mM glucose during the 4-h reperfusion period before assessing neuronal viability regarding control slices. The results express the mean ± SEM of dead cells in eight fields of at least three different experiments. (100 cells were counted/field). For other details, see Methods section.

9.7 ± 1.0, and 8.5 ± 0.9 nmol/mg of protein, respectively (*P* < 0.05). The glutamate released from slices not subjected to ischemia (control) was different from that observed on slices subjected to ischemia in the presence of the toxins (*P* < 0.05). Thus, the inhibition of glutamate release by conus or spider toxins was only partial.

DISCUSSION

The glutamate-Ca²⁺ neurotoxicity hypothesis (Choi, 1988) states that excessive release of glutamate causes pathological elevation of intracellular Ca²⁺ concentration which activates calcium-dependent processes leading to cell death. One cause of excessive glutamate release in the brain is ischemia. The hippocampus has one of the highest rates of oxygen consumption in the brain (Nishizaki et al., 1988), which may make it particularly susceptible to the glucose and oxygen deprivation protocol used in in vitro model of ischemia.

Previously we have shown that Tx3-3 and Tx3-4 inhibit calcium influx (Miranda et al., 1998, 2001) and exocytosis (Guatimosim et al., 1997; Castro Junior et al. 2008) in isolated nerve endings. Here, we showed that these toxins inhibited the increase in glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus CA1 that result from the in vitro ischemia. Moreover, Tx3-3 and Tx3-4 were also effective preventing the in vitro neuronal cell death when they were applied after the onset of the induced ischemia. The first examination for the in vivo neuroprotection induced by the toxins showed that rats treated with Tx3-4, had partial recovery of the locomotor activity (data not shown). These data suggest that peptide toxins with high selectivity for ionic channels may be useful drugs in clinical settings that require multiple strategies against pathologies such as stroke.

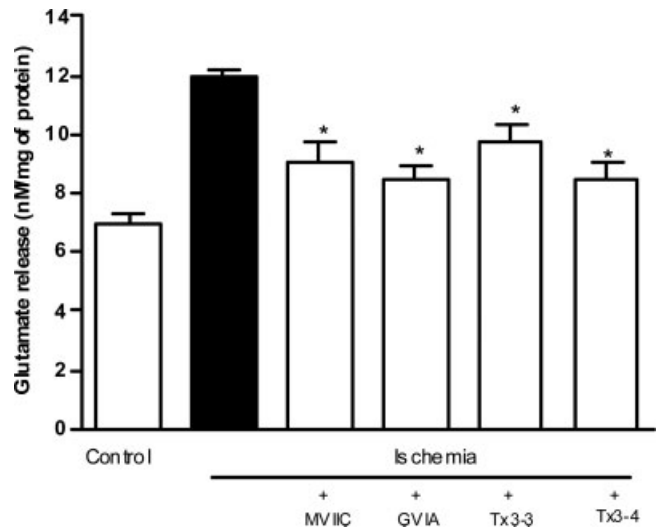


FIGURE 4. Effect of conus and spider toxins on glutamate release induced by oxygen and glucose deprivation. Hippocampal slices submitted to ischemia were separated from the incubation medium by centrifugation and analysis of glutamate content was performed on the supernatant. The results express the means ± SEM of glutamate release by slices (nMol/mg protein). Control slices were not subjected to ischemia and ischemic slices were treated/not treated with 1.0 μM ω-conotoxin GVIA, 100 nM ω-conotoxin MVIIC, 8.0 nM Tx3-3 or 8.0 nM Tx3-4. For other details, see Methods section.

We have used concentrations of spider and conotoxins that reduces glutamate release induced by ischemia (Fig. 4). However, based on the in vitro neuronal protection data it seems that Tx3-3 and Tx3-4 are more efficient than conus toxins in the protection of neuronal damage. On a previous publication (Miranda et al., 2001), we have shown that Tx3-3 and Tx3-4, were more efficient than ω -conotoxin MVIIC to inhibit the increase in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx induced by synaptosome depolarization.

Among the conus toxins, ω -conotoxin MVIIC, which blocks N- and P/Q-type calcium channels showed greater cell protection than ω -conotoxin GVIA, a selective blocker of N-type calcium channels. Nevertheless, the neuroprotection induced by ω -conotoxin GVIA agrees with previous data that indicate N-type calcium channels controls 40% of glutamate release in the hippocampus (Wu and Saggau, 1994).

There are two types of neurotransmitter release, synaptic and nonsynaptic (nonexocytotic) (Vizi, 2000). During ischemia the model of nonsynaptic release of neurotransmitter is increased (Milusheva et al., 2003). Previously we have shown that the Phoneutria toxin Tx3-4 decrease Ca^{2+} -independent release of glutamate (Reis et al., 1999). The synaptic release of the excitatory neurotransmitter glutamate is regulated by more than one calcium channel blocker (Olivera et al., 1994) and Tx3-3 and Tx3-4 are N- and P/Q-type Ca^{2+} -channel blockers (Prado et al., 1996; Guatimosim et al., 1997; de Castro Junior et al., 2008). It was suggested that broad-spectrum neuronal Ca^{2+} channel blockers may be better cytoprotective agents than more specific neuronal Ca^{2+} channel blockers (Maroto et al., 1996). Our data agree with this assumption.

Excitotoxicity is considered to be the predominant mechanism of cell death in stroke and chronic neurodegenerative disorders. Excitotoxicity results from an excessive release and inadequate uptake of glutamate and one of the neuroprotective strategies is based on the prevention of excessive release of glutamate (Miljannich and Ramachandran, 1995; Ginsberg, 1998). Thus, it was suggested that neuroprotection induced by calcium channel blockers may be due to a reduction on glutamate release. Despite this, conus toxin SNX-111, a very poor blocker of potassium-induced glutamate release in hippocampus, protects the tissue from ischemic damage whereas SNX-230, which is a potent blocker of glutamate release, in hippocampus, is ineffective as a neuroprotective agent (Valentino et al., 1993). These results imply that, at least for conopeptides, there is no correlation between the block of excitatory amino acid release and neuroprotective efficacy. Therefore, the events leading to neuronal damage after global ischemia are more complex than those implied by the excitotoxicity hypothesis (Choi, 1998).

There is a large body of factors involved in brain ischemia with compelling evidence that hyper stimulation of glutamate receptors and subsequent Ca^{2+} -induced free radical injury plays a central role in triggering neuronal damage. Glutamate excitotoxicity due to massive release of glutamate during ischemia is one of the major factors (Lipton, 1999). Here, we have shown that conus and spider toxins, calcium channel blockers, inhibited glutamate release and reduced neuronal damage. Consider-

ing the physiological role of voltage-gated calcium channels it is possible to assume that activation of neuronal VDCCs in conjunction with glutamate receptors contribute to development of neuronal death (Kriegelstein et al., 1996). Thus, pharmacological agents, such as the spider toxins, which act selectively on both, might be valuable as part of the therapeutic strategy to reduce damage provoked by stroke.

REFERENCES

- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Castro Junior CJ, Pinheiro AC, Guatimosim C, Cordeiro MN, Souza AH, Richardson M, Romano-Silva JA, Prado MA, Gomez MV. 2008. Tx3-4 a toxin from the venom of spider *Phoneutria nigriventer* blocks calcium channels associated with exocytosis. *Neurosci Lett* 439:170–172.
- Choi DW. 1988. Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465–469.
- Cordeiro MN, Figueiredo SG, Valentim AC, Diniz CR, Eickstedt RD, Goroy J, Richardson M. 1993. Purification and amino acid sequences of six TX3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* 31:35–42.
- Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. 1995. Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci* 18:89–98.
- Ginsberg MD. 1998. Efficacy of calcium channel blockers in brain ischemia: A critical assessment. In Kriegelstein J, editor. *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. pp 65–73.
- Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MAM. 2002. *Phoneutria nigriventer* venom a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol* 22:579–587.
- Guatimosim C, Romano-Silva MA, Cruz JS, Beirao PS, Kalapothakis E, Moraes-Santos T, Cordeiro MN, Diniz CR, Gomez MV, Prado MAM. 1997. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Br J Pharmacol* 122:591–597.
- Kriegelstein J, Lippert K, Pösch G. 1996. Apparent independent action of nimodipine and glutamate antagonists to protect cultured neurons against glutamate-induced damage. *Neuropharmacology* 35:1737–1742.
- Kristian T, Siesjö BK. 1996. Calcium related damage in ischemia. *Life Sci* 59:357–367.
- Lipton P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431–1568.
- Maroto R, de la Fuente MT, Zapater P, Abad F, Esquerro E, Garcia AG. 1996. Effects of ω -conotoxin MVIIC on veratridine-induced cytotoxicity and cytosolic Ca^{2+} oscillations. *Brain Res* 714:209–214.
- Miljannich GP, Ramachandran L. 1995. Antagonists of neuronal calcium channels. Structure, function and therapeutic implications. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 35:707–734.
- Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, Adams ME. 1992. P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega Aga IVA. *Nature* 355:827–829.
- Milusheva E, Sperlag B, Shikova L, Tretter BM, Adam-Vizi V, Vizi ES. 2003. Non-synaptic release of [^3H]noradrenaline in response to oxidative stress combined with mitochondrial dysfunction in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 120:771–781.
- Miranda DM, Romano-Silva MA, Kalapothakis E, Diniz CR, Cordeiro MN, Moraes-Santos T, Prado MAM, Gomez MV. 1998.

- Phoneutria nigriventer* toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes. *Neuroreport* 9:1371–1373.
- Miranda DM, Romano-Silva MA, Kalapothakis E, Diniz CR, Cordeiro MN, Moraes Santos T, De Marco L, Prado MAM, Gomez MV. 2001. Spider neurotoxins block the beta scorpion toxin-induced calcium uptake in rat brain cortical synaptosomes. *Brain Res Bull* 15:533–536.
- Monette R, Small DL, Mealing G, Morley P. 1998. A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Res. Brain Res Protoc* 2:99–108.
- Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J. 1987. Calcium dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem* 49:50–57.
- Nishizaki T, Yanaychi R, Tanimoto M, Okada Y. 1988. Effects of temperature on the oxygen consumption in thin slices from different brain regions. *Neurosci Lett* 86:301–305.
- Olivera BM, Miljanich G, Ramachandran J, Adams ME. 1994. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Ann Rev Biochem* 63:823–867.
- Pinheiro ACN, Gomez RS, Massensini AR, Cordeiro MN, Richardson M, Romano-Silva MA, Prado MAM, De Marco LA, Gomez MV. 2006. Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Neurochem Int* 49:543–547.
- Prado MAM, Guatimosim C, Gomes 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* 314:145–150.
- Randal AD, Tsien RW. 1995. Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} Channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15:2995–3012.
- Reis HJ, Prado MAM, Kalapothakis E, Cordeiro MN, Diniz CR, De Marco L, Gomez MV, Romano-Silva MA. 1999. Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutria toxin3-4) from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem J* 343:413–418.
- Romano-Silva MA, Ribeiro AM, Ribeiro-Santos R, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Brammer MJ. 1993. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for calcium entry linked to rapid glutamate release: Studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTx2 and potassium depolarization. *Biochem J* 269:313–319.
- Siesjo BK. 1990. Calcium in the brain under physiological and pathological conditions. *Eur Neurol* 30:39–41.
- Valentino K, Newcomb R, Gadbois T, Singh T, Bowersox S, Bitner S, Justice A, Yamashiro D, Hoffman BB, Ciaranello R, Miljanich G, Ramachandran J. 1993. selective N-type calcium channelant agonist protects against neuronal loss after global cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7894–7897.
- Vizi ES. 2000. Role of high-affinity receptors and membrane transporters in nonsynaptic communication and drug action in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 52:63–89.
- Wu LG, Saggau P. 1994. Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. *J Neurosci* 14:5613–5622.



EFFECTS OF NEW PHONEUTRIA SPIDER TOXINS ON GLUTAMATE RELEASE AND $[Ca^{2+}]_i$ IN RAT CORTICAL SYNAPTOSOMES

D. S. CARNEIRO¹, L. B. VIEIRA^{1,3}, M. N. CORDEIRO², M. RICHARDSON², C. J. CASTRO-
JUNIOR³, M. V. GOMEZ³✉, H. J. REIS¹

1 Laboratório de Neurofarmacologia, Departamento de Farmacologia, ICB-UFMG. Av. Antônio Carlos, 6627. Campus Pampulha. BH-MG, CEP 31270-901, Brazil.

2 Centro de Pesquisas Prof. Carlos Ribeiro Diniz, Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, BH-MG, CEP 30550-010, Brazil.

3 INCT de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina – UFMG. Av Alfredo Balena, 190. BH-MG, CEP 30130-100, Brazil

✉ Marcus V. Gomez, PhD; Laboratório de Neurociência, Faculdade de Medicina – UFMG. Av. Alfredo Balena 190, Campus Saúde. 30130-100, Belo Horizonte, MG, Brazil

Tel: +55 31 3248-9650; Fax: +55 31 3409-2685; E-mail: marcusvgomez@gmail.com

Received October 15th, 2009; Accepted December 23th, 2009; Published January 30th, 2010

Abstract – Studies revealed that the venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer* contains potent neurotoxins that caused excitatory symptoms such as salivation, lachrymation, priapism, convulsions, flaccid and spastic paralysis. It was also reported that the main mechanism of action of those neurotoxins are effects on ion channels such as inhibition of the inactivation of Na^+ channels, blockage of K^+ channels and blockage of calcium channels. The venom from *Phoneutria keyserlingi*, as might be expected, contains a series of polypeptides that are very similar, but not identical, to the proteins previously obtained from the venom of *P. nigriventer* in terms of their amino acid sequences and biological activities. We evaluated the effects of some of the toxins of *P. nigriventer* and *P. keyserlingi* on glutamate release and the decrease in $[Ca^{2+}]_i$ by using synaptosomes of rat brain cortices and fluorimetric assays. Sequence comparisons between the Phoneutria toxins of both the species showed great similarity in the location of cysteine residues. However, thus far, no pharmacological assays were performed to evaluate the extension of those biochemical modifications. Our results showed that differences between the amino acid sequences of Phoneutria toxins of both the species lead to the significant changes in the pharmacological properties of these toxins.

Key words: Spider venom, Synaptosomes, Glutamate release, Phoneutria toxins

INTRODUCTION

Several studies have revealed that the venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer* contains potent neurotoxins that can cause excitatory symptoms such as salivation, lachrymation, priapism, convulsions, flaccid and spastic paralysis of the anterior and posterior members, and death following intracerebral injection in mice (4; 22; 6). It was also reported that the main mechanism of action of these neurotoxins are effects on ion channels such as the inhibition of the inactivation of Na^+ channels (1), blockage of K^+ channels (11) and blockage of Ca^{2+} channels (9; 2, 25). Spider neurotoxins have been described as important tools for the future development of new biologically active molecules with potential

application in medicine and agriculture (5; 7; 18). In spite of the fact that various neurotoxins from *P. nigriventer* have been described, little is known about the venoms from other species of this genus. Toxins from the venom of *Phoneutria keyserlingi* elicited very similar toxic and lethal effects as those of *P. nigriventer* when tested in mice. However, their effects on ion channels remain unknown. Richardson and colleagues (20) reported that the venom from *P. keyserlingi*, as might be expected, contains a series of polypeptides that are very similar but not identical, to the proteins previously obtained from the venom of *P. nigriventer* in terms of their amino acid sequences and biological activities. Sequence comparisons showed great similarity in the location of cysteine residues when these toxins were compared with other toxins active in the Ca^{2+} channels. We are

currently studying the effects of some of these new toxins from the venom of *P. keyserlingi* and also some toxins from *P. nigriventer*, whose activities are not yet being assessed. Here, we describe the effect of PKTx23C3, PKTx28C4, and PKTx20C4 – neurotoxic peptides purified from the venom of *P. keyserlingi* and PNTx25A1, PNTx19C1, PNTx37C2 and PNTx19C2 obtained from the venom of *P. nigriventer* on glutamate release and the effect of PKTx23C3 and PKTx20C4 on decreasing $[Ca^{2+}]_i$ in the synaptosomes of rat brain cortices.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Glutamate dehydrogenase type II (EC1.4.1.3), NADP⁺, glutamate, acetoxymethylester sucrose, Percoll[®], EGTA and HEPES were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), and Fura-2 AM was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). ω -Aga IVA, ω -CgTX GVIA and ω -CmTX MVIIC were purchased from Peptides Inc. (Japan). All other reagents were of analytical grade.

Isolation of neurotoxins

The toxins were purified from the venom samples of *P. nigriventer* and *P. keyserlingi* by a combination of chromatographic steps, as previous described (3).

Purification of synaptosomes

Adult Wistar rats of both sexes (180–200 g) were killed by decapitation. The cortices were removed and homogenized in 1:10 (w/v) 0.32 M sucrose solution containing dithiothreitol (0.25 mM) and EDTA (1 mM). Homogenates were first centrifuged (1000 X g for 10 min) and synaptosomes were isolated by Percoll[®] gradient centrifugation (21). Synaptosomes were re-suspended in HEPES-buffered salt solution (HBSS: 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM glucose, 25 mM HEPES, adjusted to pH 7.4 with 5.0 M NaOH) at 10.0 mg/mL, divided into aliquots of 200 μ L and kept on ice until it used for the measurement of glutamate release or loaded with Fura-2 AM.

Measurement of continuous glutamate release

Glutamate release was assayed by monitoring the increase in fluorescence due to the production of NADPH in the presence of NADP⁺ and glutamate dehydrogenase (15). Briefly, synaptosomes (10 mg/mL) were incubated for 60 min in the same way as for measurement of Ca^{2+} (see below), washed with HBSS medium, and transferred to a cuvette (final synaptosomal concentration, 0.5–1.0 mg/mL), which was maintained at 35°C with constant stirring. At the start of each assay, CaCl₂ (1.0 mM), NADP⁺ (1.0 mM) and glutamate dehydrogenase (50 units) were added to the synaptosomes. The excitation wavelength was set at 360nm and the emission wavelength at 450 nm. CaCl₂ addition was omitted in the experiment performed in the presence of 1.0 mM EGTA in order to assess calcium-independent glutamate release under different conditions. Toxins were added 60 s before membrane depolarization with 33 mM KCl. After stabilization of the fluorescence signal at a plateau level, 5.0nmol of glutamate was added as an internal

standard. Data was expressed as nmol of glutamate per milligram of protein.

Measurements of intrasynaptosomal free Ca^{2+} concentration $[Ca^{2+}]_i$

Fura-2 AM (stock solution 1 mM DMSO) measurements of intrasynaptosomal free calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$ in synaptosomes were performed in a PTI spectrofluorimeter according to Grynkiwicz and colleagues (8) with minor modifications described previously (21; 17). Fluorescence emission was recorded at 500nm using 340/380 nm excitation ratio. CaCl₂ was added to the synaptosomal suspension at the beginning of each fluorimetric assay (1.0 mM final concentration). Toxins were added to the synaptosomal suspension 60 s before membrane depolarization with KCl (33 mM). The $[Ca^{2+}]_i$ increase induced by membrane depolarization is strictly dependent on the presence of extracellular Ca^{2+} in these conditions (21).

Statistical analysis

Results described are mean \pm S.E.M of at least three independent experiments. Statistical significance was by analysis of variance (ANOVA). A value of $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Effect of toxins on glutamate release from brain cortical synaptosomes

Table 1 shows the effect of PKTx23C3, PNTx19C1, PKTx28C4, PNTx25A1, PKTx20C4, PNTx37C2 and PNTx19C2 on K⁺-induced glutamate release. Only PKTx23C3 and PKTx20C4 decreased the KCl-evoked glutamate release from cerebrocortical synaptosomes (Figure 1). The concentration of PKTx23C3 and PKTx20C4 ranging, respectively, from 8nM to 300nM and 0.3 μ M to 3 μ M gradually decreased the KCl-evoked release of glutamate. The calculated IC₅₀ values for PKTx23C3 and PKTx20C4 inhibition were 116.4 nM and 1.48 μ M, respectively. In the absence of Ca^{2+} , in the reaction media (no added Ca^{2+} plus 2mM EGTA), the KCl-induced release of glutamate was 6.4 \pm 1.9nmol/mg of protein. This value represents the calcium-independent pool and 52% of the total glutamate release (Table 1) according to previous experiments (19) in the central nervous system.

Effect of PKTx23C3 and PKTx20C4 on calcium-independent release of glutamate

The KCl-induced release of glutamate is the sum of two components distinguished by their dependence, or independence, of extracellular Ca^{2+} (for a review, see (16)). The calcium-independent release was assayed in a medium lacking CaCl₂ and by adding 2.0mM EGTA 2

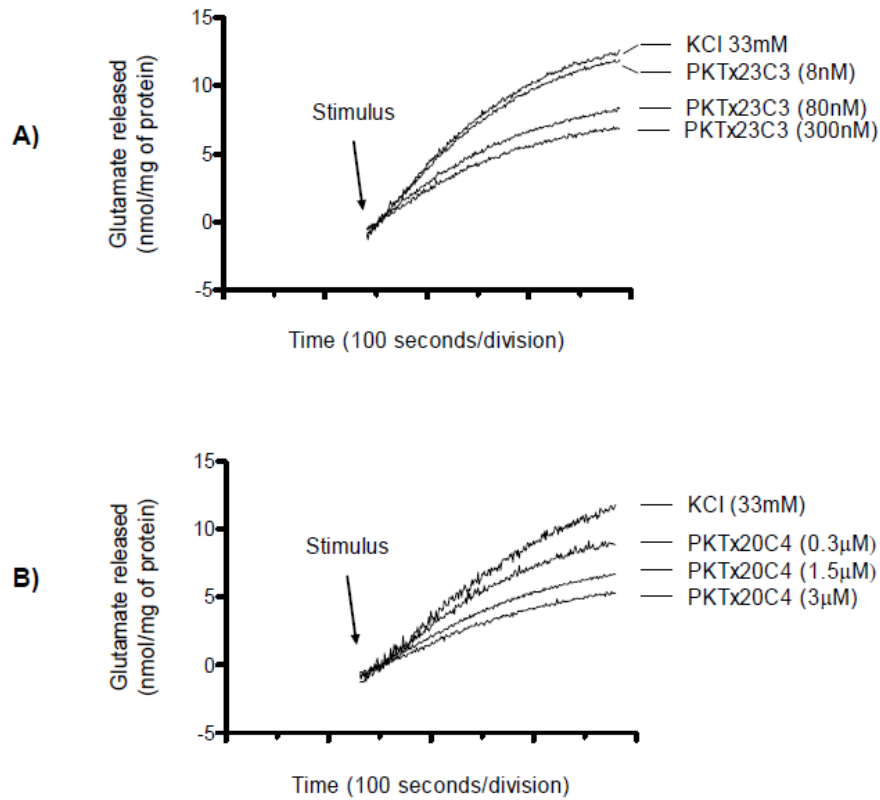


Figure 1. Effect of PKTx23C3 and PKTx20C4 isotoxins on glutamate release.

Synaptosomes, which are prepared as described in the Materials and Methods section, are depolarized with 33 mM KCl, and this is followed by the continuous release of glutamate. **(A)** Total release of glutamate from control and toxin-treated synaptosomes of PKTx23C3 (8.0, 80.0 and 300 nM). **(B)** Total release of glutamate from control and toxin-treated synaptosomes of PKTx20C4 (0.3, 1.5 and 3.0 μ M). All toxins are added 60 s before the addition of KCl. The figures show representatives curves from three independent experiments.

Table 1. Effect of *Phoneutria keyserlingi* and *Phoneutria nigriventer* isotoxins on glutamate release from depolarized cerebrocortical synaptosomes.

Toxin	Glutamate released (nmol/mg of protein)	Spider
PKTx23C3 (300nM)	6.9 \pm 2.7*	<i>Phoneutria keyserlingi</i>
PNTx19C1(12 μ M)	10.2 \pm 2.4	<i>Phoneutria nigriventer</i>
PKTx28C4 (3 μ M)	10.6 \pm 0.7	<i>Phoneutria keyserlingi</i>
PNTx25A1 (19 μ M)	10.3 \pm 0.8	<i>Phoneutria nigriventer</i>
PKTx20C4 (3 μ M)	5.9 \pm 0.3*	<i>Phoneutria keyserlingi</i>
PNTx37C2 (100nM)	12.8 \pm 1.3	<i>Phoneutria nigriventer</i>
PNTx19C2 (2 μ M)	10.3 \pm 1.0	<i>Phoneutria nigriventer</i>
EGTA (2mM)	6.4 \pm 1.9*	-
KCl (33mM)	12.4 \pm 0.5	-

*P<0.05 compared with control (33mM KCl)

min before depolarization with 33mM KCl. The resulting release in those conditions was around 52% of regular medium containing calcium. In the presence of PKTx23C3 (300nM) and PKTx20C4 (3 μ M), we did not observed any significant effect on calcium-independent glutamate release (Figure 2). These results indicated that the effects of PKTx23C3 and PKTx20C4 were restricted to the calcium-dependent (exocytotic) glutamate pool. After demonstrating that PKTx23C3 and PKTx20C4 possibly blocked the calcium-dependent glutamate release, we tested the effect of these toxins on the KCl-induced increase of synaptosomal $[Ca^{2+}]_i$.

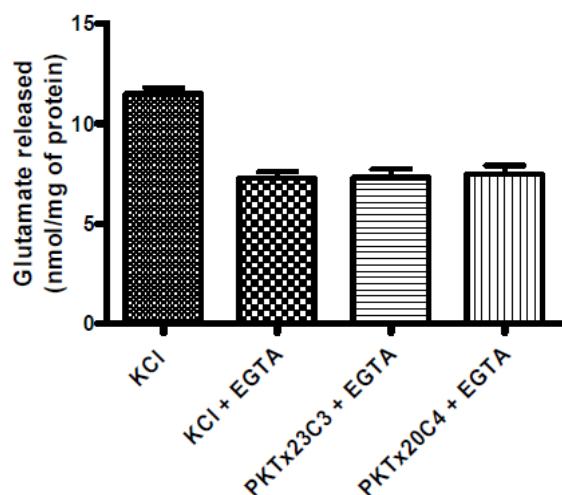


Figure 2. Effect of PKTx23C3 and PKTx20C4 on Ca^{2+} -independent release of glutamate.

The release of glutamate is performed in HBSS medium lacking calcium (1.0mM EGTA) and control or PKTx23C3 (300 nM) and PKTx20C4 (3 μ M) – exposed synaptosomes are depolarized by using 33 mM KCl. The amount of glutamate released under calcium-deprived conditions is similar to that shown in Table 1 for maximal concentration of those toxins. The mean values from five independent experiments are shown.

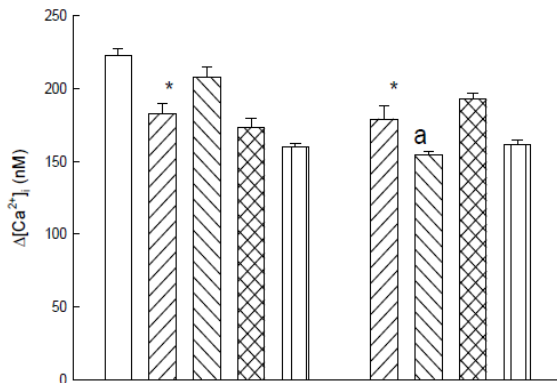
Effect of PKTx23C3 and PKTx20C4 on $[Ca^{2+}]_i$.

Depolarization with KCl (33mM) induced an increase of 250nM (from 250 to 500nM) on average $[Ca^{2+}]_i$ measured using Fura-2-AM in brain cortical synaptosomes. The toxins PKTx23C3 (300nM) or PKTx20C4 (3 μ M) were separately added 60 s before membrane depolarization with the synaptosomal suspension. The resulting release was approximately 79% (PKTx23C3) and 75% (PKTx20C4) of that measured in medium lacking toxins (Figure 3). In order to test whether the PKTx23C3 and PKTx20C4 targeted channels overlap with known neuronal subtypes of calcium channels, such as those blocked by ω -Aga IVA, ω -CgTX

GVIA and ω -CmTX MVIIC, we measured intracellular calcium changes induced by KCl (33mM) in the presence of different toxins. Figure 3 shows that the new Phoneytria toxins PKTx23C3 (300 nM) and PKTx20C4 (3 μ M) decreased the changes in $[Ca^{2+}]_i$ by about 20%, which was induced by 33 mM KCl when exposed to the synaptosomes 60 s before depolarization. To test for the overlapping of calcium channels inhibited by ω -Aga IVA (100nM), ω -CgTX GVIA (1 μ M) and PKTx23C3 (300nM), these toxins were incubated together (ω -Aga IVA + PKTx23C3 and ω -CgTX GVIA + PKTx23C3) 60 s before KCl (33 mM) depolarization. ω -Aga IVA and ω -CgTX GVIA, blockers of P- and N-type Ca^{2+} channels, respectively, caused a small inhibition of the KCl-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ (data not shown). The results caused by PKTx23C3 in association with either ω -Aga IVA or ω -CgTX GVIA was similar to that obtained with PKTx23C3 alone (Figure 3). Addition of PKTx23C3 (300 nM) with either ω -Aga IVA or ω -CgTX GVIA caused an inhibition that was not significantly different from that observed in the presence of PKTx23C3 (300 nM). These results might indicate that PKTx23C3 (300 nM) binds in the outer vestibule of the pore that is allosterically coupled to ω -Aga IVA interfering with the interaction between ω -Aga-IVA and P/Q calcium channel, in a similar way as describe to calcicludine, a toxin extracted from green mamba snake (26). Furthermore, the association of PKTx23C3 (300 nM) with ω -CmTX MVIIC caused an inhibition that was not different from that induced by ω -CmTX MVIIC alone (Figure 3 and data not shown).

The inhibition caused by PKTx20C4 in association with either ω -Aga IVA and ω -CgTX GVIA was similar to that obtained with PKTx20C4 alone (Figure 3). ω -Aga IVA (100nM), ω -CgTX GVIA (1 μ M) and PKTx20C4 (3 μ M) were incubated together (ω -Aga IVA + PKTx20C4 and ω -CgTX GVIA + PKTx20C4) 60 s before KCl (33mM) depolarization (Figure 3). The combined use of PKTx20C4 (3 μ M) with ω -Aga IVA (100nM) caused an inhibition that was significantly different from that observed in the presence of PKTx20C4 (3 μ M) alone. However, the association with either ω -CgTX GVIA or ω -CmTX MVIIC (1 μ M) caused an inhibition that was not significantly different from GVIA (1 μ M) or Aga IVA (100 nM) alone (data not shown).

Although the joint application of toxins (ω -Aga IVA (100 nM), ω -CgTX GVIA (1 μ M) ω -CmTX MVIIC (1 μ M) and PKTx23C3 (300 nM)) appears to cause an inhibition $[Ca^{2+}]_i$, the difference between this inhibition and that induced by PKTx23C3 alone failed to achieve statistical significance. On the other hand, the association between ω -Aga IVA with PKTx20C4 caused significant inhibition on $[Ca^{2+}]_i$, thus indicating that there was no overlap between both toxins.



KCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PKTx23C3	-	+	+	+	+	-	-	-	-
AgaIVA	-	-	+	-	-	-	+	-	-
GVIA	-	-	-	+	-	-	-	+	-
MVIIC	-	-	-	-	+	-	-	-	+
PKTx20C4	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Figure 3. Effect of calcium channel blockers, PKTx23C3 and PKTx20C4 on the increase in $[Ca^{2+}]_i$ in rat cortical synaptosomes.

Synaptosomes were obtained and loaded with fura-2 as described in the Materials and Methods section. They were incubated in HBSS medium containing 1.0 mM $CaCl_2$ for 60s in the presence of the toxins, alone or in combination (100 nM ω -Aga IVA; 1.0 μ M ω -CgTX GVIA; 1.0 μ M ω -CmTX MVIIC; 300 nM PKTx23C3; 3 μ M PKTx20C4) followed by depolarization with 33 mM KCl during 2.5 min. Results are expressed as mean \pm S.E.M. from five independent experiments. * means statistical difference compared with 33mM KCl ($P < 0,001$), and *a* means statistical difference compared with PKTx20C4 alone ($P < 0,05$).

DISCUSSION

Sequence of PNTx19C1 and its effect on glutamate release

In our study, we observed that the toxin PNTx19C1 had no significant effect in inhibiting the glutamate release evoked by KCl when used doses up to 12 μ M. The sequence of toxin

PNTx19C1 is not completely determined; however, we can see that it shows great similarity when compared to the sequences of toxins belonging to the family Tx3-6 which, as previously mentioned, have a great effect on the inhibition of calcium currents (20). We also noticed a chemical variation in the properties of amino acids existing on the PNTx3-6 and PNTx19C1 chain structure. The main changes occurred between hydrophobic amino acids and amino acids charged polarized (Figure 4C/D). One important modification in the amino acid positions is the alanine residue (position 1 in PNTx3-6 sequence) by glycine (in PNTx19C1). Such change might cause major effects on its biochemical and pharmacological properties.

Thus, we may suggest that no significant effect on the release of glutamate at the concentration of PNTx19C1 (12 μ M) might be explained by the changes in the polarization of the chain, which leads to a decrease in affinity between the channel and the toxin.

Sequences of PKTx28C4 and PNTx25A1 and their effects on glutamate release.

Recent studies have shown that these two new peptides extracted from spiders and *P. keyserlingi* and *P. nigriventer* have very toxic effects when injected into the thoracic cavity of rats and houseflies (20). However, in the present study, these peptides did not show significant effects in the inhibition of glutamate release evoked by KCl in rat brain synaptosomes. These two peptides have 43%–51% of sequence homology when compared to the toxins of the family Tx2 (20) (Figure 4E). It is known that the toxins of the family PNTx2 act by increasing the activation of sodium channels (1; 27; 20) and increasing the inflow of sodium ions in synaptosomes, thereby inducing depolarization of the membrane, calcium ions influx and release of glutamate in relation to TTX (21). The main amino acid changes observed when we compared both toxins with PnTx2-1 are the presence of a basic amino acid (position 1 in PKTx28C4 and PNTx25A1) and the alterations of several amino acids in the sequence of the remaining toxins. Investigations of the effects of both toxins on Na^+ influx must be performed to clarify if such changes are crucial to the structures and functions of those toxins.

Sequence of PNTx37C2 and its effect on the glutamate release.

The sequence of the toxin PNTx37C2 (unpublished data) showed great similarity to the

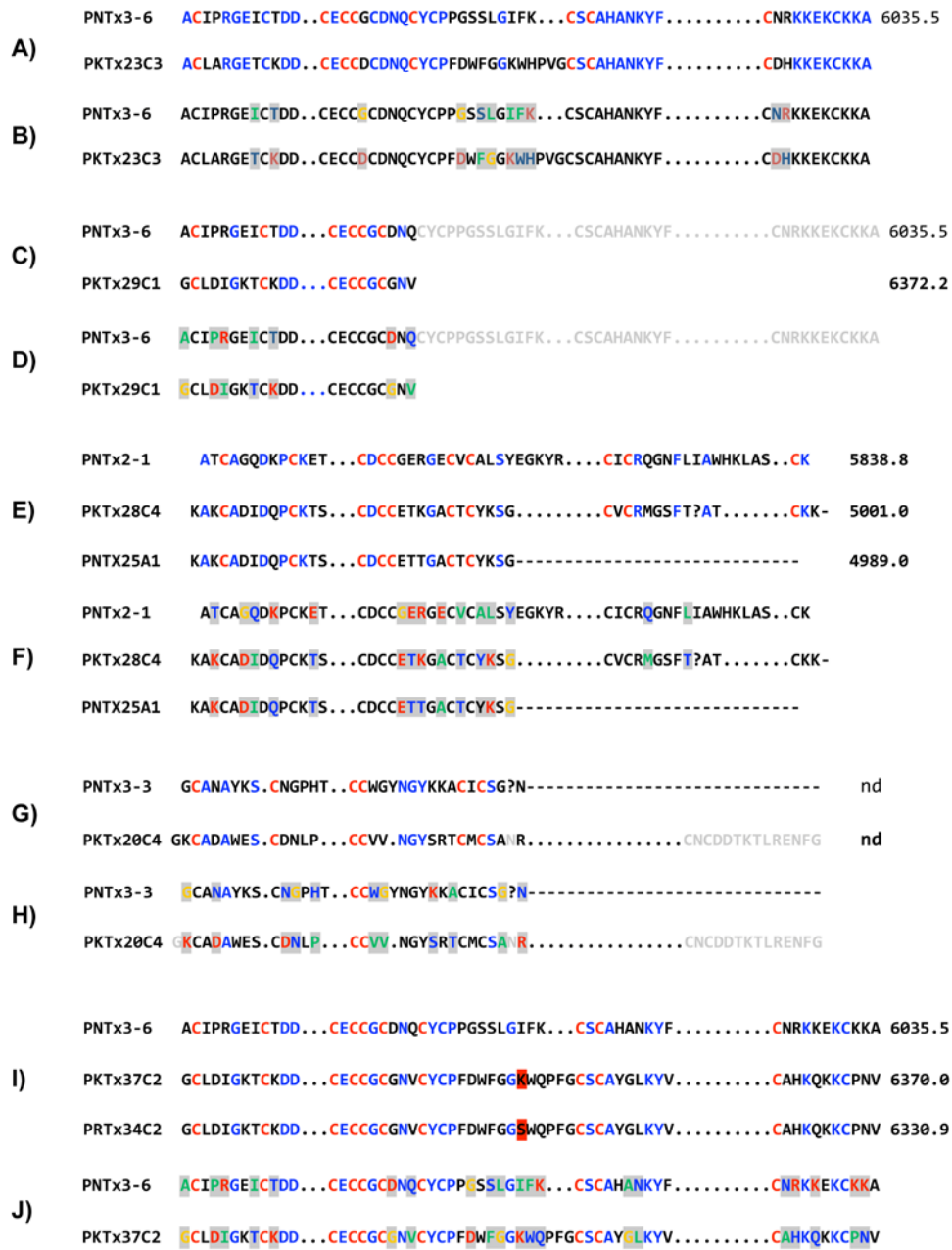


Figure 4. Chart of amino acid sequences alignments of Phoneutria toxins. The sequences are aligned according to the cysteine residues represented in red. Hydrophobic amino acids are shown in green, charged amino acids in red, polar residues in blue, and glycine in yellow. To further discussion see text.

toxins of the family Tx3, particularly PnTx3-6 (Figure 4I). As previously mentioned, the toxin PnTx3-6 operates mainly in N type channels (25). In our study, there was no inhibition of glutamate release by PNTx37C2. On comparing the amino acid sequences of PnTx3-6 and PnTx37C2, we found that both the toxins have the same number of cysteine residues and a homology of approximately 45% (Figure 6I and J). We also observed that the toxin PRTx34C2 extracted from the venom of the spider *P. reidy* (20) shows great similarity to PNTx37C2, differing with regard to only one residue (Figure 4I).

Sequence analysis showed that alanine at position 1 (PNTx3-6) was replaced by glycine (PNTx37C2) and the last amino acid (an alanine-PNTx3-6 by valine – PNTx37C2), which may have caused major changes in its biochemical and pharmacological properties. Such changes could vary the polarization or toxin linkage, which may reduce its affinity for N type calcium channels, thereby justifying the effects observed in our experiments.

Comparative analysis of the sequence of PKTx23C3 and its effects on calcium dependent glutamate release.

Richardson and colleagues (20) recently reported a comparison of the partial proteomes of the venoms of the following spiders: *P. keyserlingi*, *P. nigriventer* and *Phoneutria reidy*. It was shown that the toxins of the family Tx3, which were purified from the venom of the spider *P. nigriventer*, had great similarity (40%–50%) in their amino acid sequences when compared with toxins Agatoxins III and AgorTxB7a, which are toxins from the venom of the spider *Agelena orientalis* (10). Members of the family of Tx3-6 toxins are characterized by being the only ones to have cysteine residues in the sequence arranged CxCCxC (Figure 4A). It is known that these toxins have low toxicity when injected into mice but have great effect on the inactivation of calcium currents and release of glutamate-dependent calcium channels, acting mainly on the P/Q- type (25; 23).

We verified the inhibition of calcium-dependent glutamate release from rat cortical synaptosomes in the presence of PKTx23C3. The amino acid sequence of this toxin clearly indicates that it belongs to the family Tx3-6. It has the same number of cysteine residues positioned in similar locations in the chain of amino acids and a homology of approximately

70% when compared to the sequences of the other members of the Tx3-6 family (Figure 4A/B). We also noticed that the amino acids that differ between the two chains have different chemical properties. Exchanges occur between amino acids of different groups, namely, hydrophobic amino acids with chains, chains of amino acids and amino acids charged polarized (Figure 4B). Thus, we may suggest that the inhibition of lower intensity shown by PKTx23C3 when used in doses of 300nM when compared to PNTx3-6 can be explained by the presence of different amino acids between the two chains. Such changes could modify the polarization of the chain of this toxin by reducing its affinity for calcium channels, thus explaining the difference between the effects shown in both the toxins.

Sequence of PKTx20C4 and its effect on calcium dependent glutamate release.

The sequence of the toxin PKTx20C4 showed that it has a great similarity with toxins from the family Tx3, particularly with the toxin Tx3-3 (1; 27; 20). Tx3-3 when injected into the brains of mice at a dose of 5 μ g causes flaccid paralysis and rapid death between 10 and 30 min. Several studies have shown that the toxin PNTx3-3 is a potent inhibitor of calcium channels (17; 9; 13) blocking calcium current P/Q and R (12; 14).

In our study, PKTx20C4 (3 μ M) showed inhibition of 52.4% in the release of glutamate after depolarization with 33 mM KCl. As previously reported (24), preparation of brain cortical synaptosomes is ineffective as a tool for studying the effect of toxins directly on ion channels. However, we associated PKTx20C4 with classic calcium channel blockers in order to find out some interaction between the toxin and calcium channels. Our results showed more affinity by N type calcium channels since no additive effect was observed in the association of PKTx20C4 and ω -CgTX GVIA.

Comparison of their sequences revealed an important change between the PNTx3-3 chain and PKTx20C4. A glycine was replaced at position 1 in PNTx3 and PKTx20C4 gained extra two amino acids – glycine and lysine – plus other changes elsewhere in its chain. These modifications may affect the polarization of the structure of this toxin or may cause adjustment to the channel link by reducing its affinity to P/Q and R-type calcium channels or also by increasing its affinity for N type channel.

Acknowledgements –This study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq/MCT (Instituto do Milênio), FAPEMIG and CAPES.

REFERENCES

- Araujo, D. A., M. N. Cordeiro, et al., 1993. Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 347(2), 205-8.
- Cassola, A. C., H. Jaffe, et al., 1998. Omega-phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider *phoneutria nigriventer*. *Pflugers Arch* 436(4), 545-52.
- Cordeiro MN, Figueiredo SG, Valentim AC, Diniz CR, Eicksted RD, Goroy J, and Richardson M., 1993. Purification and amino acid sequences of six TX3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* 31, 35-42.
- Diniz, M. R. V., Paine, M. J. I., Diniz, C. R., Theakston, R. D. G., and Crampton, J. M., 1993. Sequence of the DNA coding for the lethal neurotoxin Tx1 from the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* predicts the synthesis and processing of a preprotoxin. *J. Biol. Chem.* 268,15340–15342.
- Escoubas, P., S. Diochot, et al., 2000. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie* 82(9-10), 893-907.
- Entwistle, I. D., R. A. Johnstone, et al., 1982. Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. *Toxicon* 20(6), 1059-67.
- Gomez, M. V., E. Kalapothakis, et al., 2002. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol* 22(5-6), 579-88.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, et al., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260(6), 3440-50.
- Guatimosim, C., M. A. Romano-Silva, et al., 1997. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Br J Pharmacol* 122(3), 591-7.
- Kozlov, S., A. Malyavka, et al., 2005. A novel strategy for the identification of toxin like structures in spider venom. *Proteins* 59(1), 131-40.
- 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⁺ currents controlling Ca²⁺ oscillation frequency in GH3 cells. *Journal of Neurochemistry* 72(4),1472-81.
- Leao, R. M., J. S. Cruz, et al., 2000. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-*phoneutria nigriventer* Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology* 39(10), 1756-67.
- Miranda, D. M., M. A. Romano-Silva, et al., 1998. *Phoneutria nigriventer* toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes. *Neuroreport* 9(7), 1371-3.
- Miranda, D. M., M. A. Romano-Silva, et al., 2001. Spider neurotoxins block the beta scorpion toxin-induced calcium uptake in rat brain cortical synaptosomes. *Brain Res Bull* 54(5), 533-6.
- Nicholls, D. G., T. S. Sihra, Sanchez-Prieto, J. 1987. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem* 49(1), 50-7.
- Nicholls DG., 1993. Ion channels and the regulation of neurotransmitter glutamate release. *Biochem Soc Trans* 21(1), 53-8.
- Prado, M. A., C. Guatimosim, et al., 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), 145-50.
- Rash, L. D. and Hodgson, W. C., 2002. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* 40(3), 225-54.
- 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),413-8.
- Richardson, M., A. M. Pimenta, et al., 2006. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 142(3-4), 173-87.
- Romano-Silva, M. A., R. Ribeiro-Santos, et al., 1993. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem J* 296(Pt 2), 313-9.
- Schenberg, S., and Lima, F. A., 1966. Pharmacology of the polypeptides from the venom of the spider *Phoneutria fera*. *Mem. Inst. Butantan.* 33, 627–638.
- Souza, A. H., J. Ferreira, et al., 2008. Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph alpha 1beta toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain* 140(1), 115-26.
- Vieira, L. B., C. Kushmerick, et al., 2003. PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K⁺-evoked increase in [Ca²⁺]_i and Ca²⁺-dependent glutamate release in synaptosomes. *Neurochem Int* 42(4), 277-82.
- Vieira, L. B., C. Kushmerick, et al., 2005. Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *J Pharmacol Exp Ther* 314(3), 1370-7.
- Wang, X., Du, L., and Peterson, B. Z. 2007. Calcicludine binding to the outer pore of L-type calcium channels is allosterically coupled to dihydropyridine binding. *Biochemistry* 46(25): 7590-98.
- Yonamine, C. M., L. R. Troncone, et al., 2004. Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal *Phoneutria nigriventer* spider toxin. *Toxicon* 44(2), 169-72.

The Effect of Spider Toxin PhTx3-4, ω -Conotoxins MVIIA and MVIIC on Glutamate Uptake and on Capsaicin-Induced Glutamate Release and $[Ca^{2+}]_i$ in Spinal cord Synaptosomes

Jomara M. Gonçalves · Juliano Ferreira · Marco Antonio M. Prado ·
Marta N. Cordeiro · Michael Richardson · Ana Cristina do Nascimento Pinheiro ·
Marco A. Romano Silva · Celio José de Castro Junior · Alessandra H. Souza ·
Marcus Vinicius Gomez

Received: 28 June 2010 / Accepted: 8 October 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract In spinal cord synaptosomes, the spider toxin PhTx3-4 inhibited capsaicin-stimulated release of glutamate in both calcium-dependent and -independent manners. In contrast, the conus toxins, ω -conotoxin MVIIA and ω -conotoxin MVIIC, only inhibited calcium-dependent glutamate release. PhTx3-4, but not ω -conotoxin MVIIA or ω -conotoxin MVIIC, is able to inhibit the uptake of glutamate by synaptosomes, and this inhibition in turn leads to a decrease in the Ca^{2+} -independent release of glutamate. No other polypeptide toxin so far described has this effect. PhTx3-4 and ω -conotoxins MVIIC and MVIIA are blockers of voltage-dependent calcium channels, and they significantly inhibited the capsaicin-induced rise of intracellular calcium $[Ca^{2+}]_i$ in spinal cord synaptosomes, which likely reflects calcium entry through voltage-gated calcium channels. The inhibition of the calcium-independent

glutamate release by PhTx3-4 suggests a potential use of the toxin to block abnormal glutamate release in pathological conditions such as pain.

Keywords Spider and conus toxins · Capsaicin · Glutamate release · Glutamate uptake intracellular calcium · Spinal cord synaptosomes

Introduction

Glutamate is a neurotransmitter that is critical for spinal excitatory synaptic transmission and for the generation and maintenance of spinal states such as pain hypersensitivity via activation of glutamate receptors (Souza et al. 2008). Understanding the regulation of synaptically and non-synaptically released glutamate is important in exploring novel molecular mechanisms and in developing therapeutic strategies. Glutamate release in the central nervous system has two components distinguished by their dependence on extracellular calcium (Nicholls et al. 1987); one involves exocytotic release via synaptic vesicles and second depends on the reversal of glutamate transporters.

Ca^{2+} influx through voltage-gated calcium channels (VGCCs) plays a key role in many physiological events. In neurons, VGCCs are involved in the integration of electrical signals by controlling vesicular release of neurotransmitters, activation of many key enzymes and modulation of Ca^{2+} -dependent ion channels (Reuter 1996). Spider and snail toxins have played a very important role in the identification and pharmacological definition of the distinct calcium channels (Adams et al. 1993; Gomez et al. 2002; Estrada et al. 2007; Minta et al. 2008). Glutamatergic synaptic transmission is affected in the central nervous system (CNS) by ω -conotoxin GVIA, or ω -conotoxin

J. M. Gonçalves · M. A. Romano Silva ·
C. J. de Castro Junior · A. H. Souza · M. V. Gomez (✉)
Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais,
Sala 114, Av. Alfredo Balena 190, Belo Horizonte, MG, Brazil
e-mail: marcusvgomez@gmail.com

J. Ferreira
Departamento de Química, Universidade Federal de Santa
Maria, Santa Maria, RS, Brazil

M. A. M. Prado
Robarts Research Institute, Department of Anatomy and Cell
Biology and Department of Physiology and Pharmacology,
University of Western Ontario, London, ON, Canada

M. N. Cordeiro · M. Richardson
Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brazil

A. C. do Nascimento Pinheiro · M. V. Gomez
Núcleo de Pós Graduação Santa Casa,
Belo Horizonte, MG, Brazil

MVIIC, blockers of N- and N-P/Q-type calcium channels, respectively.

The venom of the spider *Phoneutria nigriventer* contains several neurotoxic peptides with functions that include activation of Na⁺ channels (Araujo et al. 1993), and blockade of K⁺ (Kushmerick et al. 1999) and Ca²⁺ channels (Prado et al. 1996; Gomez et al. 2002; Guatimosim et al. 1996; Vieira et al. 2005; De Castro Junior et al. 2008). One of these toxins, PhTx3-4 (also known as ω -Phonetoxin IIA), caused inhibition of Ca²⁺ uptake (Miranda et al. 1998, 2001) and glutamate release (Reis et al. 1999) in rat brain synaptosomes, suggesting an effect on VGCCs. Electrophysiological data have shown that PhTx3-4 blocks N-type (Cassola et al. 1998) and P/Q-type calcium channels (dos Santos et al. 2002). We have previously shown that Ph $\alpha_1\beta$, an antinociceptive toxin from *Phoneutria* venom, shows some preference for N-type VACCs, abolishing capsaicin-induced glutamate release and calcium influx in isolated spinal cord synaptosomes (Souza et al. 2008).

The aim of this study is to investigate the effects of the spider toxin PhTx3-4 and conus toxins, ω -conotoxin MVIIA and ω -conotoxin MVIIC, blockers of VGCCs, on glutamate uptake and on capsaicin-induced glutamate release and [Ca²⁺]_i in spinal cord synaptosomes.

Materials and Methods

PhTx3-4, a 8,449 Da protein, was purified as described by Cordeiro et al. (1993). ω -conotoxin MVIIA, ω -conotoxin MVIIC, Fura-2 acetoximethyl ester (Fura-2AM), glutamate dehydrogenase and Percoll were obtained from Sigma Chemical Co. (MO, USA).

Synaptosomal Preparation

Synaptosomes were prepared from the spinal cords of male Wistar rats (180–250 g). These were decapitated, and their spinal cords were quickly removed and placed in aerated (95% O₂/5% CO₂) ice-cold Krebs–Ringer buffer. The spinal cords from two rats were homogenised in 14 ml of ice-cold 0.32 M sucrose, and a crude synaptosomal pellet (P₂) was prepared by differential centrifugation with 1,000×g for 5 min followed by 15,000×g for 20 min as previously described by Li and Eisenach (2001). Protein was assayed by the Bradford (1976) method. For experiments concerning glutamate release and [Ca²⁺]_i, the crude synaptosomal pellet (P₂) from spinal cord was resuspended in 4.5 ml of Krebs–Ringer–Hepes (KRH) buffer and was aerated with 95% O₂/5% CO₂. The KRH buffer contains, in mM: NaCl 135, KCl 4.8, Mg₂SO₄ 1.2, Hepes 12.5, glucose 10, CaCl₂ 2.0, NaHCO₃ 25 and KH₂PO₄ 1.2, and was

adjusted to pH 7.4. Calcium-independent glutamate release analysis was performed by removing calcium and adding 2.0 mM of EGTA to the KRH buffer. For glutamate release tests, 500 μ l of the synaptosomal suspension was diluted with 1,500 μ l of KRH buffer containing 5 μ l NADP⁺ (1.0 mM), glutamate dehydrogenase (50 U) and the toxins PhTx3-4, ω -conotoxin MVIIA or ω -conotoxin MVIIC at the concentrations described in the text. Toxins were added 100 s before stimulation with 100 μ M capsaicin. This assay relies on generation of NADPH by glutamate dehydrogenase in the presence of glutamate, with NADPH being measured fluorometrically (Nicholls et al. 1987). The excitation wavelength was set at 360 nm and emission wavelength was set at 450 nm in a Shimadzu spectrofluorimeter, model RF 5301PC.

Measurement of [Ca²⁺]_i

Synaptosomes were loaded with 5 μ M fura-2 AM (stock solution 1 mM in DMSO) for measurements of intrasynaptosomal free calcium concentration [Ca²⁺]_i. The assays were performed in a Shimadzu spectrofluorimeter according to Gryniewicz et al. (1985) with minor modifications as previously described (Romano-Silva et al. 1993). Synaptosomes were stirred throughout the experiment in a cuvette maintained at 35°C. CaCl₂ was added to the synaptosomal suspension at the beginning of each fluorimetric assay (1.0 mM final concentration). Toxins were added to the synaptosomal suspension 100 s prior to stimulation with 100 μ M capsaicin. For determination of the [Ca²⁺]_i, fluorescence emission was monitored at 510 nm, whilst continually switching excitation between 340 and 380 nm. The ratio of fluorescence following 340/380 nm excitation was calculated from each pair of observations. At the end of each experiment, calibration was performed by recording the maximum and minimum fluorescence values after addition of 15 μ l of 10% (w/v) SDS followed by addition of 40 μ l 400 mM EGTA/3 M TRIS. Autofluorescence was determined by using synaptosomes that had not been loaded with fura-2.

Glutamate Uptake

Spinal cord synaptosomes were diluted to a concentration of 0.5 mg/ml protein in ice-cold Krebs–Ringer buffer without CaCl₂. Aliquots of 500 μ l were added into tubes containing 2.0 mM CaCl₂ and incubated for 15 min at 35°C with 0.5 μ Ci of L-[³H]glutamate after preincubation period of 1 min with toxins PhTx3-4 (100 nM), ω -conotoxin MVIIC (50 nM), ω -conotoxin MVIIA (100 nM) or control experiments. The uptake was stopped by addition of 5 ml of ice-cold Krebs–Ringer buffer. Synaptosomes were separated from the incubation medium by

vacuum-filtration (2.3 μm pore size). The filters were washed twice with 5 ml of ice-cold Krebs–Ringer buffer containing 5 μM non-radioactive glutamate. The radioactivity in the filters was counted in scintillation vials containing 5 ml of modified Bray solution in the Tri Carb 2100 liquid scintillation apparatus. The c.p.m. were converted to d.p.m. after quenching and background correction.

Statistics

Analysis for the significance of the differences between the effects of the different toxins was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student–Newman–Keuls test.

Results

When spinal cord synaptosomes were stimulated with capsaicin (100 μM , to specifically activate the spinal terminal nociceptors), release of glutamate doubled when compared with control conditions (from 13.7 ± 0.9 nmol/mg protein

to 26.8 ± 1.5 nmol/mg protein, see Fig. 1, $P < 0.01$). The effects of PhTx3-4, ω -conotoxin MVIIA or ω -conotoxin MVIIC on the capsaicin-stimulated release of glutamate in spinal cord synaptosomes are shown in Fig. 1a–c, respectively. PhTx3-4 at a concentration of 35 or 70 nM had no significant effect on the capsaicin-induced release of glutamate in spinal cord synaptosomes. PhTx3-4 at a concentration of 105 nM reduced the capsaicin-induced increase of glutamate in spinal cord synaptosomes by about 35% (from 26.8 to 17.6 ± 1.6 nmol/mg protein, $P < 0.01$). At 140 nM, PhTx3-4 almost completely blocked glutamate release induced by capsaicin ($P < 0.001$). The ω -conotoxin MVIIA at concentrations of 70, 105 and 140 nM significantly inhibited capsaicin-induced increase in glutamate release to 20.2 ± 0.9 , 18.2 ± 0.9 and 17 ± 0.8 nmol/mg protein with an inhibition of 25, 32 and 37%, respectively. ω -conotoxin MVIIC at 25 and 35 nM reduced capsaicin-induced glutamate release in spinal cord synaptosomes to 18.5 ± 0.7 and 14.7 ± 0.6 nmol/mg protein, with an inhibition of 31 and 45%, respectively ($P \leq 0.01$ and 0.001). At higher concentrations, PhTx3-4, ω -conotoxin MVIIA or ω -conotoxin MVIIC were unable to detect further inhibition on the

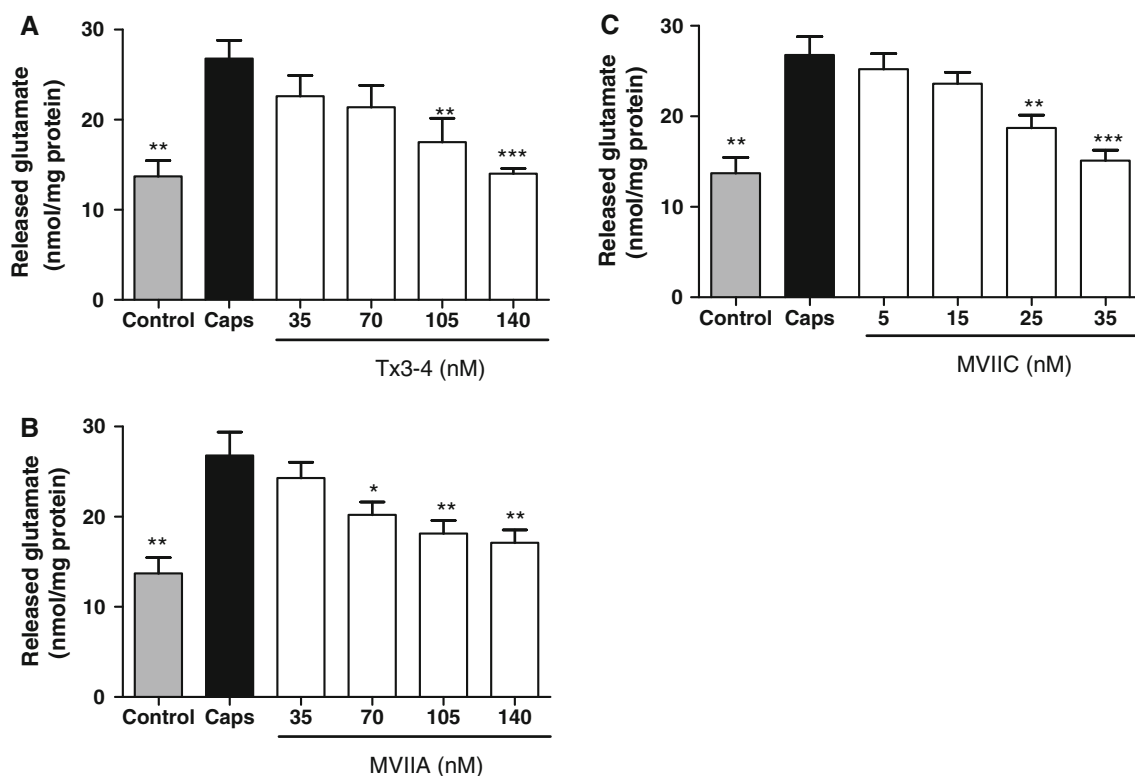


Fig. 1 The effects of PhTx3-4 (a), ω -conotoxin MVIIA (b) and ω -conotoxin MVIIC (c) on 100 μM capsaicin-stimulated glutamate release in spinal cord synaptosomes. The results show the mean \pm standard error of the mean (SEM) of glutamate release (nmol/mg protein) for five experiments. The control group data represent the glutamate release in the absence of capsaicin and the toxins. The other groups were stimulated with capsaicin in the

absence (Caps group, *black bar*) or presence of the toxins PhTx3-4 (35, 70, 105 and 140 nM), ω -conotoxin MVIIA (35, 70, 105 and 140 nM) or ω -conotoxin MVIIC (5, 15, 25 and 35 nM), *open bars*. The toxins were added 100 s before capsaicin addition. ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test, was used to determine statistical significance. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared with the capsaicin-stimulated group (Caps)

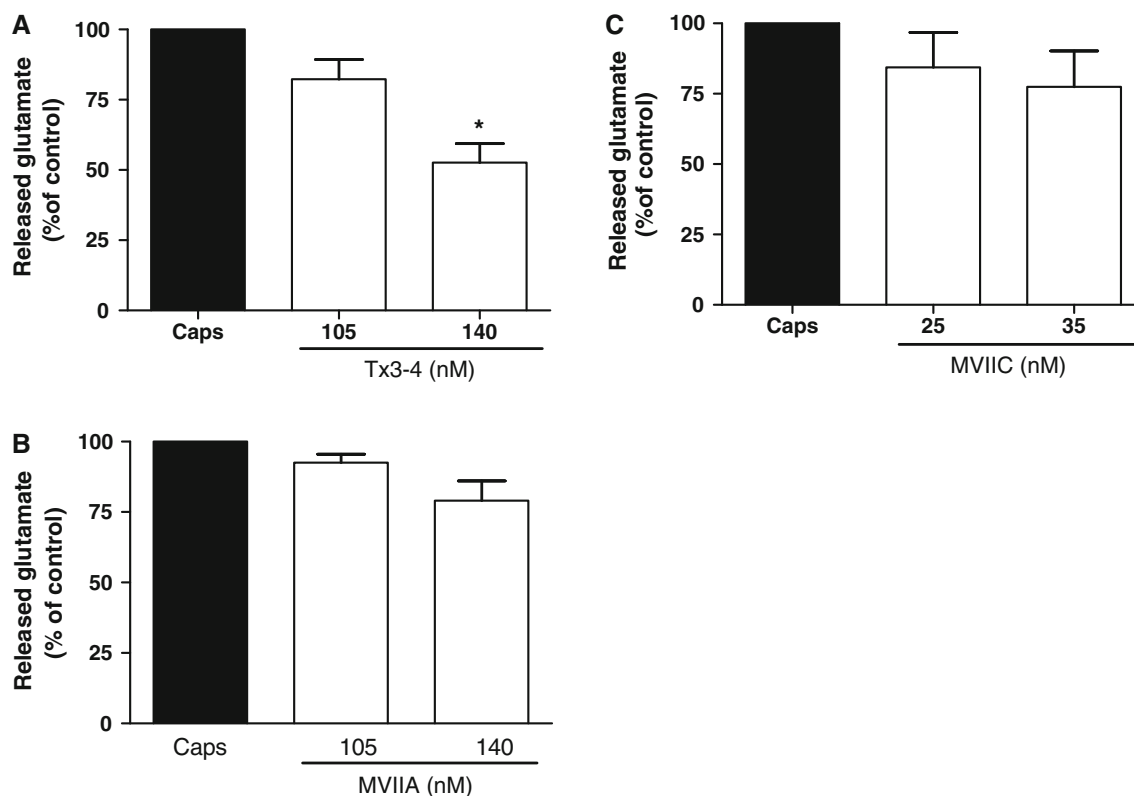


Fig. 2 The effect of PhTx3-4 (a), ω -conotoxin MVIIA (b) and ω -conotoxin MVIIC (c) on the calcium-independent, 100 μ M capsaicin-stimulated glutamate release in spinal cord synaptosomes. The results express the mean \pm SEM (3 experiments) for glutamate release (nmol/mg protein) as percentage of the control group release following stimulation with capsaicin in absence of the toxins (Caps group, black bar). The other groups were stimulated with capsaicin in

the presence of the toxins a PhTx3-4 (100 and 140 nM), b ω -conotoxin MVIIA (105 and 140 nM) or c ω -conotoxin MVIIC (25 and 35 nM), open bars. The toxins were added 100 s before capsaicin addition. ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test, was used to determine statistical significance. * $P < 0.05$ compared with the capsaicin group in absence of the toxins (Caps)

capsaicin-induced glutamate release from spinal cord synaptosomes (data not shown). The IC_{50} values for the inhibition of capsaicin-induced glutamate release in spinal cord synaptosomes by PhTx3-4, ω -conotoxin MVIIA or ω -conotoxin MVIIC were 65, 73 and 21 nM, respectively.

Glutamate release in the CNS has two components distinguished by their dependence on extracellular calcium. As multiple types of calcium channels jointly regulate calcium entry and neurotransmitter release, we investigated the calcium dependence of capsaicin-induced release of glutamate in spinal cord synaptosomes. The removal of calcium and the addition of EGTA (2.0 mM) in the KRH media reduced glutamate release in the control condition by 60%, from 12.0 ± 1.1 nmol/mg protein to 4.9 ± 0.7 nmol/mg protein (data not shown). PhTx3-4 (140 nM) inhibited calcium-independent capsaicin-stimulated glutamate release in spinal cord synaptosomes by $47 \pm 5.9\%$, even in the absence of calcium and presence of EGTA in the KRH medium ($P < 0.05$, Fig. 2a). In contrast, ω -conotoxin MVIIA (105 and 140 nM, Fig. 2b) and ω -conotoxin MVIIC (25 and 35 mM, Fig. 2c) failed to

affect calcium-independent capsaicin-induced glutamate release. There is considerable evidence suggesting that the Ca^{2+} -independent release of glutamate is due to the reversal of the glutamate transport in plasma membrane (Nicholls et al. 1987; Romano-Silva et al. 1993). Therefore, we tested whether PhTx3-4 could inhibit the activity of glutamate uptake in spinal cord synaptosomes. PhTx3-4 (100 nM) was able to inhibit [3H]glutamate uptake by $40 \pm 6\%$, $P < 0.01$ whilst ω -conotoxin MVIIC (50 nM) and ω -conotoxin MVIIA (100 nM) were unable to inhibit glutamate uptake of spinal cord synaptosomes, $P > 0.05$ (Fig. 3). Previously we have shown that PhTx3-4 caused inhibition of Ca^{2+} uptake (Miranda et al. 1998, 2001) and glutamate release (Reis et al. 1999) in rat brain synaptosomes, suggesting an effect of the toxin on VGCCs. Therefore, we evaluated the effects of PhTx3-4, ω -conotoxin MVIIA or ω -conotoxin MVIIC on capsaicin-stimulated calcium influx in spinal cord synaptosomes. Following the addition of capsaicin (100 μ M), a rapid increase of $[Ca^{2+}]_i$ was observed with an increase of the fluorescence ratio by 2.2 times, $P < 0.001$ (data not

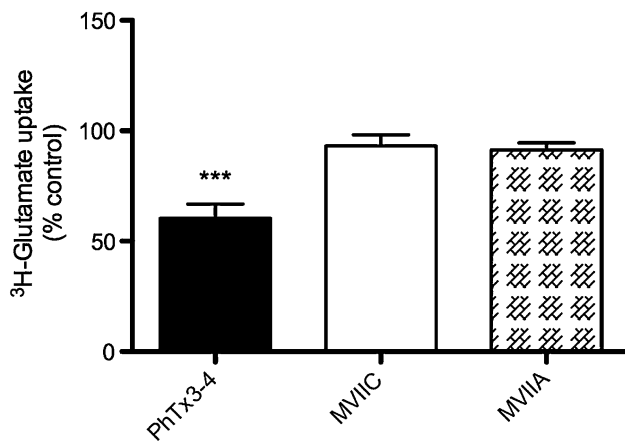


Fig. 3 Effect of PhTx3-4, ω -conotoxin MVIIA and ω -conotoxin MVIIC on glutamate uptake in synaptosomes. Synaptosomes were preincubated for 1 min with PhTx3-4 (100 nM), ω -conotoxin MVIIA (100 nM) and ω -conotoxin MVIIC (50 nM), and the ^3H -glutamate uptake was measured after 15 min. The results express the mean \pm SEM (3 experiments) for glutamate uptake *** Significant difference compared with control value without the toxins, $P < 0.001$. For other details see [Materials and Methods](#)

shown). PhTx3-4 at 300 and 500 nM significantly reduced the capsaicin-induced fluorescence ratio of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to 40 ± 12 and $30 \pm 8.0\%$, respectively, $P < 0.05$ (Fig. 4a). ω -conotoxin MVIIA (100 nM) and ω -conotoxin MVIIC (100 nM) reduced the capsaicin-induced fluorescence ratio of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to 15 ± 7.2 and $22 \pm 7.0\%$, respectively, $P < 0.01$ (Fig. 4b, c). Thus ω -conotoxin MVIIC or ω -conotoxin MVIIA caused higher inhibition than PhTx3-4 on capsaicin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in spinal cord synaptosomes.

Discussion

In this study, we describe for the first time that spider toxin, PhTx3-4, inhibits glutamate uptake and capsaicin-induced calcium-dependent and -independent glutamate release and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rises in spinal cord synaptosomes. Capsaicin acts through TRPV1 (Caterina et al. 2000) to induce glutamate release (Kim et al. 2009) and a rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Greffrat et al. 2001). Previously, we reported that PhTx3-4 decreased calcium-independent glutamate release induced by high K^+ and glutamate uptake in hippocampal synaptosomes (Reis et al. 1999). Calcium-independent glutamate release is thought to occur via the reversal of the plasma membrane glutamate transporter (Nicholls et al. 1987). Thus, we tested the effect of the toxins on glutamate uptake in spinal cord synaptosomes. PhTx3-4 significantly inhibited glutamate uptake whilst ω -conotoxin MVIIC or ω -conotoxin MVIIA failed to inhibit the uptake of this neurotransmitter. The data suggest that PhTx3-4 inhibition

of capsaicin-induced calcium-independent release of glutamate is due to its inhibition of glutamate transporter. Unlike PhTx3-4, ω -conotoxin MVIIA and ω -conotoxin MVIIC were unable to inhibit calcium-independent capsaicin-induced glutamate release and glutamate uptake in spinal cord synaptosomes. Previously, we also showed that ω -conotoxin MVIIC does not affect K^+ -induced, calcium-independent glutamate release in brain cortical synaptosomes (Reis et al. 1999). In this study, we extended this observation to the action of ω -conotoxin MVIIC on capsaicin-induced, calcium-independent glutamate release in spinal cord synaptosomes.

The importance of glutamate release in spinal nociceptive processing is well known; inhibition of the glutamate transporter GLT-1 by spinal treatment with GLT-1-targeted antisense oligonucleotides results in a significant reduction of nociceptive behaviour (Niederberger et al. 2003). The results are in agreement with the observation that glutamate transporter currents in spinal astrocytes, evoked by a single stimulation of the dorsal root entry zone, share some properties with those of hippocampal astrocytes (Zhang et al. 2009).

Activation of VGCCs is critical for neurotransmitter release, neuronal excitability and postsynaptic calcium signalling. Previously we have shown that a toxin from spider venom, Ph $\alpha_1\beta$ and ω -conotoxin MVIIA, by blocking VGCCs, almost abolished capsaicin-evoked glutamate release and caused reductions of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in spinal cord synaptosomes (Souza et al. 2008). ω -conotoxin MVIIA, a blocker of N-type calcium channel (Zamponi et al. 2009), PhTx3-4 (Cassola et al. 1998; dos Santos et al. 2002) and ω -conotoxin MVIIC (McDonough et al. 2002), blockers of N-P/Q-type calcium channels, caused a significant inhibition of the capsaicin-induced increase in glutamate release and rise of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in spinal cord synaptosomes. Immunocytochemical studies and electrophysiological data have identified the subtypes of VGCCs present in the dorsal horn of the spinal cord (Westenbroek et al. 1998). N-type calcium channels are predominant in the superficial laminae 1 and 2; in contrast, the P/Q-type channels are not found in lamina 1 of the dorsal horn, but their presence in lamina 2 suggests they participate in pain signal processing (McGivern 2007). N-type Ca^{2+} channels are predominant associated with nociceptive transmission. Inhibition of Ca^{2+} currents through N-type and N-P/Q calcium channels caused a reduction of glutamate release and calcium rise in the presynaptic nociceptive terminal. Capsaicin modulates VGCC (Hagenacker et al. 2005) and causes an increase in cytosolic Ca^{2+} (Eun et al. 2001) that clearly reduces the effects on voltage-activated currents. Despite this, we observed inhibition of the capsaicin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise and glutamate release in spinal cord synaptosomes, suggesting the involvement of N-type and N-P/Q-type calcium

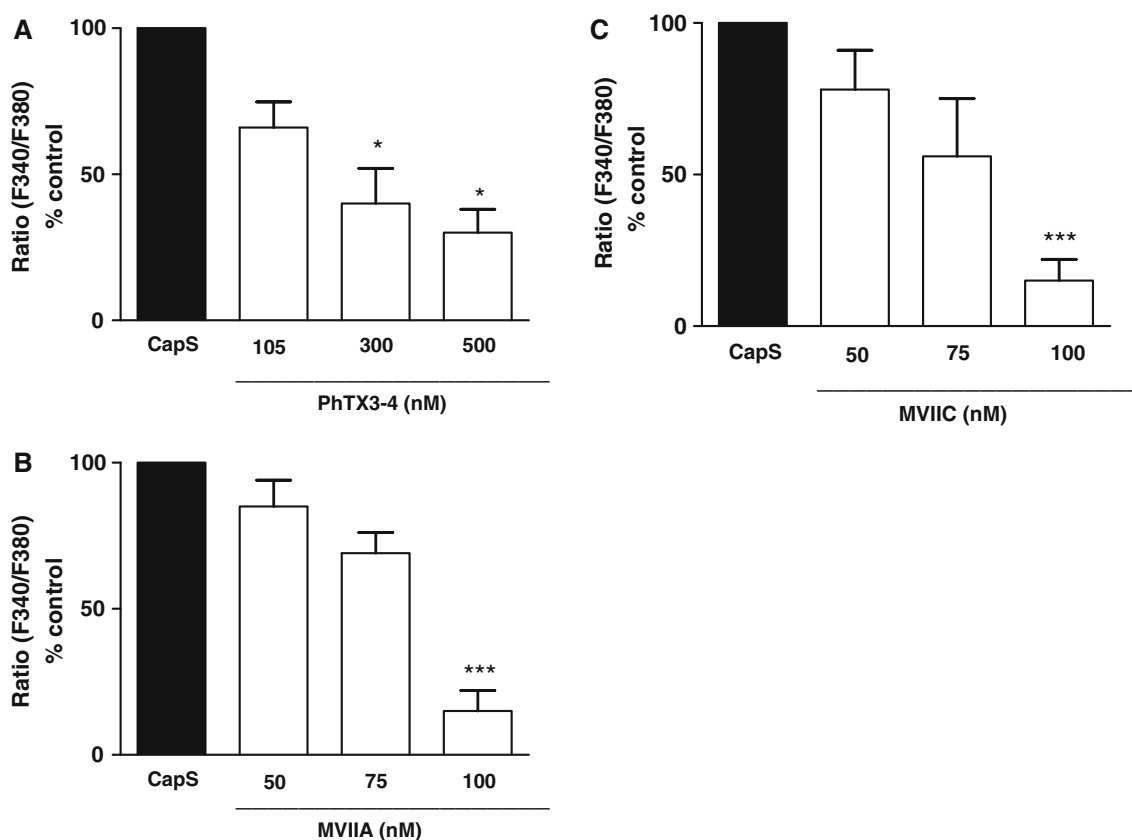


Fig. 4 The effects of PhTx3-4 (a), ω -conotoxin MVIIA (b) and ω -conotoxin MVIIC (c) on $[Ca^{2+}]_i$ fluorescence ratio variations responses F340/F380 in spinal cord synaptosomes stimulated by capsaicin (100 μ M). The results show the mean \pm SEM of the fluorescence ratio in relation to 100 μ M capsaicin control in the absence (black bar) or presence of the toxins PhTx3-4 (105, 300 and

500 nM), ω -conotoxin MVIIA (50, 75 and 100 nM) or ω -conotoxin MVIIC (50, 75 and 100 nM) (open bars) of five experiments. The toxins were added 100 s before capsaicin addition. Statistical analyses by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared with the Caps group or capsaicin-stimulated only

channels. The ability of PhTx3-4 to substantially block glutamate release in the spinal cord, by blocking Ca^{2+} -dependent release of glutamate, may provide a tool to regulate nociception at the spinal cord level.

Acknowledgments This study is part of the master's thesis of Jomara Mendes Gonçalves and was supported by grants from CNPq/MCT (Instituto do Milenio), INCT Medicina Molecular, Fapemig and Capes.

References

- Adams ME, Myers RA, Imperial JS, Olivera BM (1993) Toxotyping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms. *Biochemistry* 32:12566–12570
- Araujo DA, Cordeiro MN, Diniz CR, Beirão PS (1993) Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347:205–208
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Cassola AC, Jaffe H, Fales HM, Castro Afeche S, Magnoli F, Cipollaneto J (1998) Omega-phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Pflugers Arch* 436:545–552
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Petersen-Zeit KR, Koltzemburg M, Basbaum AL, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306–313
- Cordeiro MN, de Figueiredo SG, Valentim AdoC, 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*. *Toxicon* 31:35–42
- de Castro Junior CJ, Pinheiro AC, Guatimosim C, Cordeiro MN, Souza AH, Richardson M, Romano-Silva MA, Prado MA, Gomez MV (2008) PhTx3-4 a toxin from the venom of spider *Phoneutria nigriventer* blocks calcium channels associated with exocytosis. *Neurosci Lett* 439:170–172
- 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 II A blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with ω -conotoxin binding sites. *J Biol Chem* 277:13856–13862
- Estrada G, Villegas E, Corzo G (2007) Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Nat Prod Rep* 24:145–161

- Eun SY, Yung SJ, Park IK, Kwak J, Kim SJ (2001) Effects of capsaicin on Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores in the dorsal root ganglion cells of adult rats. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1114–1120
- Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MAM (2002) *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol* 22:579–587
- Greffrat W, Kirschstein T, Nawrath H, Treed R (2001) Changes in cytosolic calcium in response to noxious heat and their relationship vanilloid receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 104:539–550
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
- Hagenacker T, Splettstoesser F, Geffrath W, Treede RD, Busselberg D (2005) Capsaicin differentially modulates voltage-activated calcium channel currents in dorsal root ganglion neurons of rats. *Brain Res* 1062:74–83
- Kim H, Cui L, Kim J, Kim SJ (2009) Transient receptor potential vanilloid type 1 receptor regulates glutamatergic synaptic inputs to the spinothalamic tract neurons of the spinal cord deep dorsal horn. *Neuroscience* 160:508–516
- Kushmerick C, Kalapothakis E, Beirao PS, Penaforte CL, Prado VF, Cruz JS, Diniz CR, Cordeiro MN, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado MAM (1999) *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K^+ currents controlling Ca^{2+} oscillation frequency in GH3 cells. *J Neurochem* 72:1472–1481
- Li X, Eisenach JC (2001) Alpha2A-adrenoceptor stimulation reduces capsaicin-induced glutamate release from spinal cord synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 299:939–944
- Mc Givern JM (2007) Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatr Dis Treat* 3:69–85
- McDonough SI, Boland LM, Mintz IM, Bean BP (2002) Interactions among toxins that inhibit N-type and P-type calcium channels. *J Gen Physiol* 119:313–328
- Minta E, Kafarski P, Martinez J, Rolland V (2008) Synthesis of cyclooctapeptides: constraints analogues of the peptide neurotoxin, ω -agatoxine IVB—an experimental point of view. *J Pept Sci* 14:267–277
- Miranda DM, Romano-Silva MA, Kalapothakis E, Diniz CR, Cordeiro MN, Santos TM, Prado MAM, Gomez MV (1998) *Phoneutria nigriventer* toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes. *Neuroreport* 9:1371–1373
- Miranda DM, Romano-Silva MA, Kalapothakis E, Diniz CR, Cordeiro MN, Moraes-Santos T, De Marco L, Prado MAM, Gomez MV (2001) Spider neurotoxins block the beta scorpion toxin-induced calcium uptake in rat brain cortical synaptosomes. *Brain Res Bull* 54:533–536
- Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J (1987) Calcium dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem* 49:50–57
- Niederberger E, Schmidtko A, Rothstein JD, Geisslinger G, Tegeder I (2003) Modulation of spinal nociceptive processing through the glutamate transporter GLT-1. *Neuroscience* 116:81–87
- Prado MAM, 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* 314:145–150
- Reis H, Prado MAM, Kalapothakis E, Cordeiro MN, Diniz CR, De Marco L, Gomez MV, Romano-Silva MA (1999) Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3-4) from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem J* 343:413–418
- Reuter H (1996) Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 6:331–337
- 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^{2+} entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarisation. *Biochem J* 296:313–319
- Souza HA, Ferreira J, Cordeiro MN, Vieira LB, De Castro C, Trevisan G, Reis H, Souza IA, Richardson M, Prado MAM, Prado VF, Gomez MV (2008) Analgesic effect in rodents of native and recombinant Phz1 β toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain* 140:115–126
- Vieira LB, Kushmerick C, Hildebrand ME, Garcia E, Stea A, Cordeiro MN, Richardson M, Gomez MV, Snutch TP (2005) Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *J Pharmacol Exp Ther* 314:1370–1377
- Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA (1998) Localization of Ca^{2+} channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* 18:6319–6330
- Zamponi GW, Lewis RJ, Todorovic SM, Arneric SP, Snutch TP (2009) Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. *Brain Res Rev* 60:84–89
- Zhang H, Xin W, Dougherty PM (2009) Synaptically evoked glutamate transporter currents in spinal dorsal horn astrocytes. *Mol Pain* 1:5–36