

Daniel de Souza Carneiro

EFEITO DAS TOXINAS PURIFICADAS PkTx23C3, PkTx28C4,
PkTx20C4, PnTx19C1, PnTx25A1, PnTx37C2, PnTx19C2,
PnTx3-2 NA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO EM
SINAPTOSOMAS CÉREBRO CORTICAIS DE RATO.

Belo Horizonte - MG

2010

Daniel de Souza Carneiro

EFEITO DAS TOXINAS PURIFICADAS PkTx23C3, PkTx28C4,
PkTx20C4, PnTx19C1, PnTx25A1, PnTx37C2, PnTx19C2,
PnTx3-2 NA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO EM
SINAPTOSOMAS CÉREBRO CORTICAIS DE RATO.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Helton José dos Reis

Co-orientador: Luciene Bruno Vieira

Belo Horizonte - MG

2010

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

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT)
- Programa de Apoio a Núcleo de Excelência (PRONEX)
- Instituto do Milênio para o Desenvolvimento de Fármacos baseados em toxinas peptídicas MCT/CNPq

AGRADECIMENTOS

Ao professor Helton José dos Reis, pelos momentos de discussão, aprendizado e sobretudo pela amizade construída ao longo desta longa trajetória.

Aos professores Marcus Vinícius Gomes e Marco Aurélio Romano-Silva por abrirem as portas para o início desta caminhada.

À Luciene, pela importante presença durante a elaboração, realização e conclusão deste trabalho.

À minha amiga Melissa pelos ensinamentos e momentos de discussão.

Aos colegas de laboratório em especial ao colega Célio de Castro pela colaboração e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao meu amor, pela torcida, incentivo e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos pelo apoio incondicional e aos meus pais, por permitirem e me incentivarem a seguir sempre em frente.

RESUMO

Diversos estudos vêm demonstrando que toxinas purificadas do veneno das aranhas do gênero *Phoneutria* contém grande variedade de proteínas e peptídeos, incluindo neurotoxinas que atuam em canais iônicos de insetos e mamíferos. Tais neurotoxinas podem causar sintomas excitatórios como salivação, convulsão, paralisia espástica e priapismo. Nos últimos anos diversos estudos tem demonstrado o potencial terapêutico das neurotoxinas através da inibição da liberação de glutamato, sobretudo através do bloqueio de canais iônicos. Os diversos trabalhos têm verificado que o mecanismo de atuação de tais toxinas envolvem principalmente a ativação de canais de sódio e o bloqueio de canais de cálcio e potássio. Toxinas purificadas do veneno das aranhas *Phoneutria keyserlingi* apresentam grandes semelhanças quando comparada às toxinas purificadas do veneno das aranhas *Phoneutria nigriventer*, apresentando cadeias de aminoácidos e efeitos biológicos similares. No entanto, permanece pouco conhecido o mecanismo de ação de tais toxinas. Em nosso trabalho avaliamos como as toxinas estudadas atuam na liberação de glutamato em sinaptossomas cérebro corticais de rato. Da mesma forma procuramos determinar se as alterações da dinâmica do glutamato envolvem o bloqueio de canais iônicos, mais especificamente o bloqueio de canais de cálcio. Procuramos também avaliar a sequência de aminoácidos das toxinas estudadas comparativamente aos efeitos de toxinas conhecidas na literatura, analisando dados de sequenciamento dentre as que são similares. Comparações da sequência de aminoácidos apresentaram grande similaridade quanto à quantidade e posicionamento dos resíduos de cisteína. Porém poucos estudos discutem como tais modificações poderiam provocar mudanças na atividade de tais toxinas. Nossos resultados demonstraram que pequenas modificações na sequência de aminoácidos, mesmo que não envolvam modificações nos resíduos de cisteína, interferem na atividade das toxinas estudadas na dinâmica de liberação de glutamato em sinaptossomas cérebro corticais de rato.

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 [Ca²⁺]_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.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Classificação taxonômica das aranhas de interesse médico	12
FIGURA 2 -	O ciclo de vesículas sinápticas	15
FIGURA 3 -	Interação das proteínas SNARE e a liberação do neurotransmissor.....	18
FIGURA 4 -	Aspectos estruturais dos canais de Ca^{2+} regulados por voltagem	22
FIGURA 5 -	Efeito das Toxinas PkTx23C3, PkTx20C4 e PnTx3-2 na liberação de glutamato	33
FIGURA 6 -	Efeito das toxinas PkTx23C3, PkTx20C4 e PnTx3-2 na liberação de glutamato independente de cálcio	34
FIGURA 7 -	Efeito das toxinas PkTx23C3, PkTx20C4 e PnTx3-2 na $[Ca^{2+}]_i$ induzida por KCl 33mM	36
FIGURA 8 -	Efeito da toxina PkTx23C3 e das toxinas bloqueadoras de canais de cálcio no aumento da $[Ca^{2+}]_i$	39
FIGURA 9 -	Efeito da toxina PkTx20C4 e das toxinas bloqueadoras de canais de cálcio no aumento da $[Ca^{2+}]_i$	41
FIGURA 10 -	Comparação do sequenciamento das toxinas PkTx23C3 e PnTx3-6	43
FIGURA 11 -	Comparação do sequenciamento das toxinas PnTx19C1 e PnTx3-6	45
FIGURA 12 -	Comparação do sequenciamento das toxinas PnTx2-1, PkTx28C4 e PnTx25A1	46
FIGURA 13 -	Comparação do sequenciamento das toxinas PnTx3-3 e PkTx20C4	47
FIGURA 14 -	Comparação do sequenciamento das toxinas PnTx3-6, PnTx37C2 e PrTx34C2	49
FIGURA 15 -	Comparação do sequenciamento das toxinas PnTx3-4 e PnTx19C2	50
EQUAÇÃO 1-	Reação para conversão de α -cetoglutarato à partir de L-Glutamato	28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Efeito das toxinas purificadas dos venenos das aranhas <i>Phoneutria keiserling</i> e <i>Phoneutria nigriventer</i> na liberação de glutamato em sinaptosomas cérebrocorticais de rato após despolarização com KCl 33 mM	32
------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	As aranhas do Gênero Phoneutria	12
1.2	Neurotransmissão	14
1.2.1	Aspectos gerais	14
1.2.2	O ciclo de vesículas sinápticas	14
1.2.3	Hipótese SNARE	16
1.2.4	Canais de cálcio e a neurotransmissão	18
1.2.5	Glutamato	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Equipamentos	26
3.2	Soluções	26
3.3	Reagentes e toxinas	27
3.4	Animais	27
3.5	Preparação de sinaptosomas	27
3.6	Ensaio para liberação de glutamato	28
3.7	Medida do cálcio livre intrasinaptosomal	29
3.8	Análise estatística dos resultados	29
4	RESULTADOS	31
4.1	Efeitos das toxinas PkTx23C3, PnTx19C1, PkTx28C4, PnTx25A1, PkTx20C4, PnTx37C2, PnTx19C2 e PnTx3-2 na liberação de glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato	31
4.2	Avaliação da liberação de glutamato independente de cálcio na presença das toxinas PkTx23C3, Pk20C4, PnTx3-2 em sinaptosomas cérebro corticais de rato	34
4.3	Efeito das toxinas PkTx23C3, PkTx20C4, PnTx3-2 na liberação de	

glutamato dependente de cálcio em sinaptossomas cérebro corticais de rato	35
4.4 Efeito das toxinas PkTx23C3 e PkTx20C4 e das toxinas bloqueadoras de canais de cálcio	37
4.4.1 Efeito da toxina PkTx23C3 e das toxinas bloqueadoras de canais de cálcio no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ evocada por KCl em sinaptossomas cérebro corticais de rato	37
4.4.2 Efeito da PkTx20C4 e das toxinas bloqueadoras de canais de cálcio no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ evocada por KCl em sinaptossomas cérebro corticais de rato	40
5 DISCUSSÃO	42
5.1 Análise comparativa do sequenciamento da toxina PkTx23C3 e seu efeito na liberação de glutamato dependente de cálcio	42
5.2 Análise do sequenciamento das toxinas PnTx19C1 e seu efeito na liberação de glutamato	44
5.3 Análise do sequenciamento das toxinas PkTx28C4, PnTx25A1 e seu efeito na liberação de glutamato	45
5.4 Análise comparativa do sequenciamento da toxina PkTx20C4 e seu efeito na liberação de glutamato dependente de cálcio	46
5.5 Análise comparativa do sequenciamento da toxina PnTx37C2 e seu efeito na liberação de glutamato dependente de cálcio	47
5.6 Análise comparativa do sequenciamento da toxina PnTx19C2 e seu efeito na liberação de glutamato dependente de cálcio	49
5.7 Análise do efeito da toxina PnTx3-2	50
6 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aga IVA -	ω -agatoxina IVA
AMPA -	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico
CCSV -	Canais para cálcio sensíveis à voltagem
DAG -	Diacilglicerol
EDTA -	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA -	Ácido tetracético etilenoglicol
FURA 2-AM -	Fura 2-acetoximetil éster
GDH -	Glutamato desidrogenase
GTPase -	Guanosina trifosfatase
GVIA -	ω -conotoxina-GVIA
HEPES -	N-[2-hidroxietil] piperazina-N-[2-ácido etano sulfônico]
IC ₅₀ -	Concentração capaz de inibir 50% da ação máxima efetiva de uma determinada droga
IP3 -	Inositol 1, 4, 5 trifosfato
KRH -	Krebs-Ringer-Hepes
mGlurs -	Receptores metabotrópicos de glutamato
Mr -	Massa molecular
MVIIC -	ω -conotoxina MVIIC
NADP ⁺ -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAOH -	Hidróxido de sódio
NMDA -	N-metil-D-aspartato
NT -	Neurotransmissor
PKC -	Proteína kinase C
s -	Segundos

SNARE -	SNAP receptors, receptores para SNAP
SNAP-25 -	Synaptosome associated protein of 25 kDa
TTX	Tetrodotoxina

1 INTRODUÇÃO

1.1 As aranhas do Gênero *Phoneutria*

As aranhas são aracnídeos pertencentes ao filo dos artrópodes. Este filo divide-se em três subfilos, *Trilobita*, *Mandibulata* e *Chelicerata*, sendo que este último divide-se em várias classes, sendo mais importante as dos aracnídeos e dos insetos. A classe dos aracnídeos apresenta duas ordens de interesse médico, que são a das aranhas (*Aranae*) e a dos escorpiões (*Scorpionidae*) (CAMPOLINA *et al.*, 2001).

Existem mais de 30 mil espécies de aranhas descritas, sendo a maioria venenosa. No entanto, poucas tem capacidade de causar danos ao ser humano, pois possuem um frágil aparelho bucal e suas presas não conseguem penetrar a pele humana. As aranhas de interesse médico são, principalmente, as aranhas pertencentes à subordem *Araneomorphae* representada pelos gêneros *Phoneutria*, *Loxosceles*, *Lycosa* e *Latrodectus* (FIG. 1) e à subordem *Migalomorphae* (caranguejeiras), representada pelos gêneros *Grammostola* e *Vitalius*. Na região sudeste do Brasil são frequentes os acidentes com aranhas pertencentes a estas subordens (CAMPOLINA *et al.*, 2001).



FIGURA 1 – Classificação taxonômica das aranhas de interesse médico.

Fonte: Adaptado de Lucas, 1988.

As aranhas do gênero *Phoneutria*, popularmente conhecidas como aranhas armadeiras, são agressivas e quando ameaçadas se posicionam levantando as patas dianteiras se preparando para um possível ataque. São capazes de saltar até 30 cm quando atacam. Medem cerca de 5 cm de corpo e 10 a 15 cm de envergadura, vivem em ambiente peridomiciliar e domiciliar, abrigando-se

em tocas, buracos, cascas de árvores e entulhos. Possuem hábito noturno e seu veneno tem ação neurotóxica e a picada geralmente causa dor intensa, tremores, convulsões, lacrimejamento, paralisia espástica, priapismo, salivação, arritmias cardíacas, distúrbios visuais e sudorese. Raramente a picada leva a um quadro mais grave com hipotensão arterial e choque, arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca, edema pulmonar, convulsões e coma, sendo poucas as espécies que representam realmente um problema médico (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000).

O veneno purificado das aranhas do gênero *Phoneutria* contém uma grande variedade de proteínas e peptídeos, incluindo neurotoxinas (RICHARDSON *et al.*, 2006) que atuam em canais iônicos e receptores neuromusculares de insetos e mamíferos (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000; GOMEZ *et al.*, 2002; RASH; HODGSON, 2002; CORZO *et al.*, 2005). Inicialmente três frações de neurotoxinas (PhTx1, PhTx2 e PhTx3) foram purificadas utilizando técnicas cromatográficas em sistemas HPLC e FPLC (REZENDE JUNIOR *et al.*, 1991). Posteriormente uma quarta fração (PhTx4) foi purificada e mostrou-se extremamente tóxica para insetos da ordem *Diptera*, sem apresentar toxicidade em mamíferos (FIGUEIREDO *et al.*, 1995).

Em experimentos utilizando ratos, os sintomas neurotóxicos após injeção intracerebroventricular de PhTx1 foram elevação da cauda, excitação e paralisia espástica das extremidades posteriores. Já a injeção intracerebroventricular da fração PnTx2 em ratos produz salivação, lacrimejamento, priapismo, convulsões e paralisia espástica dos membros inferiores e posteriores, além de contração do íleo em cobaias (REZENDE JUNIOR *et al.*, 1991). Por sua vez a fração PnTx3 após injeção intracerebroventricular em ratos provocou 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).

Em outros trabalhos a sequência completa de aminoácidos foi determinada para as toxinas PhTx1 (DINIZ *et al.*, 1990), PhTx2 (CORDEIRO *et al.*, 1992) e PhTx3 (CORDEIRO *et al.*, 1993). Estudos farmacológicos e eletrofisiológicos revelaram que os peptídeos extraídos dos venenos das toxinas da família PhTx1 atuam principalmente em canais de cálcio (SANTOS *et al.*, 1999) e canais de sódio (MARTIN-MOUTOT *et al.*, 2006) e as toxinas da família PhTx2 aumentam a ativação de canais de Na⁺ (MATAVEL *et al.*, 2002). A fração PhTx2 também aumenta o influxo de sódio através da ativação e retardo da inativação de canais de sódio

induzindo despolarização da membrana, influxo de cálcio e liberação de glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato (ROMANO-SILVA *et al.*, 1993). Já as toxinas da família PhTx3 atuam em canais de cálcio ou potássio (PRADO *et al.*, 1996; GUATIMOSIM *et al.*, 1997; MIRANDA *et al.*, 1998; KUSHMERICK *et al.*, 1999; LEAO *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2001; GOMEZ *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2003).

1.2 Neurotransmissão

1.2.1 Aspectos Gerais

A neurotransmissão é mediada por um processo de exocitose de vesículas sinápticas. Tal processo tem início com a chegada do potencial de ação (KATZ, 1969) que induz a abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem presentes na membrana celular e conseqüentemente um aumento intracelular localizado de íons cálcio. A presença do cálcio intracelular faz com que as vesículas sinápticas sejam liberadas no terminal nervoso. Para que rápidos e repetidos ciclos de liberação sejam possíveis os terminais nervosos possuem um complexo mecanismo que envolve a reciclagem de vesículas sinápticas (SÜDHOF, 2004).

1.2.2 O ciclo de vesículas sinápticas

A neurotransmissão tem início com a propagação do potencial de ação e transdução do sinal elétrico que resultará na liberação do neurotransmissor. O terminal nervoso funciona como uma máquina que responde a sinais de entrada (potencial de ação) e sinais de saída (liberação de neurotransmissores) continuamente modificados em resposta a sinais intra e extracelulares. O ciclo de vesículas sinápticas tem início quando o neurotransmissor, presente no meio intracelular, é transportado ativamente para a vesícula sináptica (SÜDHOF, 2004; RYAN, 2006). Posteriormente tais vesículas migram para a chamada “zona ativa” do terminal nervoso. Após se ancorarem à “zona ativa” tais vesículas se convertem a um estágio no qual se encontram competentes para formar poros de fusão em resposta ao influxo de cálcio (SÜDHOF, 2004; RYAN, 2006) (FIG. 2).

Após a fusão e liberação do neurotransmissor (SLEPNEV; DE CAMILLI, 2000) tais vesículas serão recicladas através de 3 mecanismos principais: (a) as

vesículas são reacidificadas e preenchidas com neurotransmissor sem desancorarem, permanecendo no “pool” de liberação rápida, passo chamado *Kiss-and-stay* (BARKER; DOWDALL; WHITTAKER, 1972); (b) as vesículas desancoram e reciclam localmente, passo chamado *Kiss-and-run*, onde são reacidificadas e preenchidas com neurotransmissor (CECCARELLI; HURLBUT; MAURO, 1973), voltando aos passos iniciais do ciclo; ou (c) as vesículas sofrem endocitose via clatrina, reacidificam e preenchem novamente com neurotransmissores tanto diretamente ou passando por um intermediário endossomal (HEUSER; REESE, 1973) (FIG. 2).

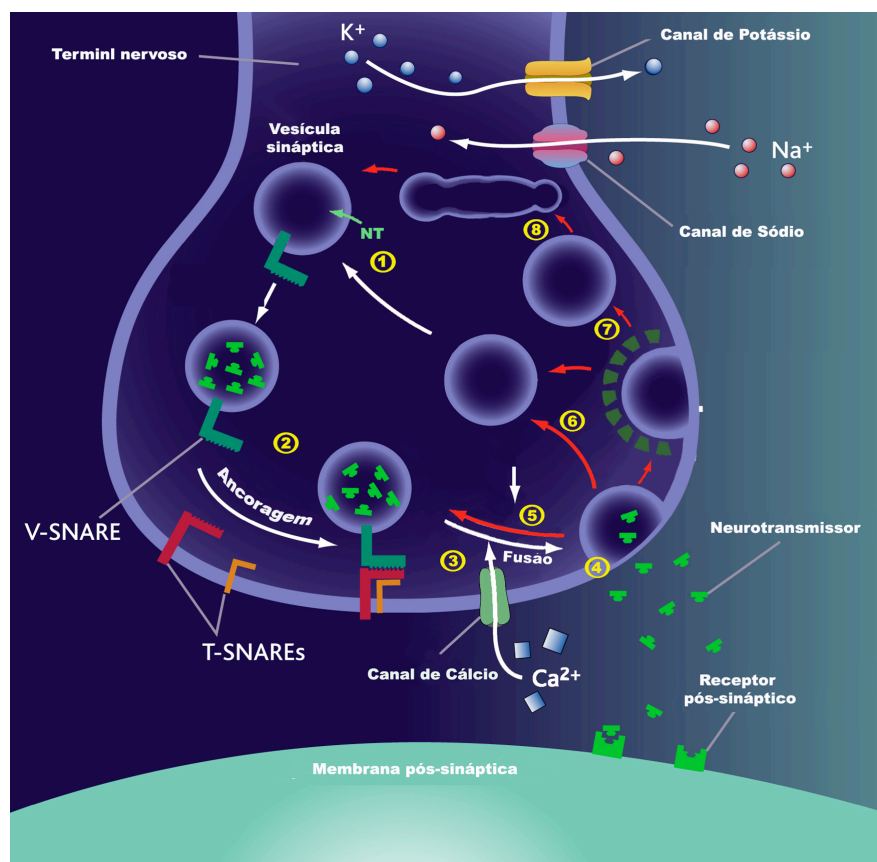


FIGURA 2 – O ciclo de vesículas sinápticas: (1) O neurotransmissor (NT) é transferido para dentro das vesículas sinápticas através de transporte ativo, dependente de íons H^+ . (2) As vesículas migram para a zona ativa e se ancoram na membrana celular. (3) As vesículas se tornam competentes para fusão. (4) Após o influxo de cálcio ocorre fusão das vesículas e liberação do neurotransmissor. (5) As vesículas são recicladas sem desancorarem. (6) As vesículas desancoram e são recicladas localmente. (7) as vesículas sofrem endocitose via clatrina e são preenchidas novamente com neurotransmissores FONTE: Adaptado de SÜDHOF, 2004.

1.2.3 Hipótese SNARE

Um mecanismo molecular de grande precisão permite a fusão das membranas das vesículas sinápticas e da membrana plasmática resultando na liberação do neurotransmissor. A fusão ocorre devido à interação específica entre algumas proteínas. Essas proteínas são as proteínas Rab, composta por guanosinas trifosfatases (GTPases) que são responsáveis pelo tráfego vesicular (NOVICK; ZERIAL, 1997) e as proteínas SNARE, que são responsáveis pelo ancoramento e fusão das membranas vesicular e plasmática (BAJJALIEH; SCHELLER, 1995; SOLLNER *et al.*, 1993; SÜDHOF, 2004)

As proteínas SNARE (*SNAP receptors*, receptores para SNAP) foram descobertas em neurônios (SOLLNER, 2003). Sinaptobrevina, sintaxina-1, e SNAP-25 (*synaptosome associated protein of 25 kDa*, proteína associada à sinaptosoma de 25 kDa) foram as primeiras proteínas descobertas da família SNARE. As proteínas SNARE da membrana plasmática (sintaxina-1 e SNAP-25) e da membrana vesicular (sinaptobrevina) realizam a aproximação e a fusão entre as membranas do terminal sináptico através da formação do complexo central entre sinaptobrevina, sintaxina-1, e SNAP-25 (FIG. 3). A formação desse complexo estável ocorre através da interação dos resíduos hidrofóbicos das α -hélices das proteínas SNARE (KATZ *et al.*, 1998) e da interação eletrostática entre resíduos centrais de arginina e glutamina, formando um feixe em *coiled-coil*. A interação eletrostática está protegida da água citoplasmática pelas camadas de aminoácidos hidrofóbicos, conferindo grande estabilidade ao complexo. As proteínas SNARE são classificadas pela presença de um resíduo central de arginina (R-SNARE) ou de glutamina (Q-SNARE) (FASSHAUER *et al.*, 1998). Sintaxina e SNAP-25 são Q-SNAREs; sinaptobrevina é R-SNARE. O complexo central é composto por quatro proteínas SNARE, uma sinaptobrevina, uma sintaxina e duas SNAP-25 (SUTTON *et al.*, 1998). A proteína SNAP-25 possui dois motivos Q-SNARE interligados por uma alça rica em cisteínas palmitoiladas, responsáveis por ancoragem à membrana plasmática (HESS *et al.*, 1992). Sinaptobrevina e sintaxina-1 estão embebidas nas membranas através de domínios transmembranares (DTMs) C-terminais (CATTERALL *et al.*, 2008).

A liberação do neurotransmissor é disparada pelo influxo de cálcio através de canais iônicos transmembrana. Esses canais são dependentes de voltagem e

são ativados através da chegada do potencial de ação (PUMPLIN; REESE; LLINAS 1981; SMITH; AUGUSTINE, 1988). A conexão entre a exocitose do neurotransmissor e a abertura dos canais de cálcio é realizada pela proteína sinaptotagmina. As sinaptotagminas caracterizam-se por possuírem um domínio que se divide em porções citoplasmáticas e transmembranas. A porção citoplasmática possui duas regiões homólogas ao domínio C2 da proteína kinase C (PKC) (PONTING; BENJAMIN, 1996) (FIG. 3). Sabe-se que tal domínio regula a penetração dependente de cálcio da PKC em membranas e está presente em mais de sessenta proteínas com diferentes funções (SCHIAVO *et al.*, 1998). Nas sinaptotagminas, os dois domínios C2 desempenham funções diferentes. O domínio C2 proximal em relação à membrana vesicular da sinaptotagmina é denominado C2A (SUTTON, 1995). Quando ligado ao cálcio, esse domínio liga-se eletrostaticamente (DAVLETOV; PERISIC; WILLIAMS, 1998) a fosfolípidos aniônicos (fosfatidilserina, em particular) em um complexo terciário (CHAPMAN *et al.*, 1998). Tal interação deve contribuir para a desestabilização das membranas, em analogia aos peptídeos de fusão virais, causando a fusão (BROSE *et al.*, 1992; MIKOSHIBA *et al.*, 1995). Simultaneamente à penetração na membrana, a sinaptotagmina interage com a base do complexo SNARE, próximo ao domínio transmembrana da syntaxina. A cinética da resposta da sinaptotagmina ao aumento da concentração de cálcio coincide com a da exocitose (DAVIS *et al.*, 1999). Agindo como sensora de cálcio, peptídeo de fusão e reguladora da formação do complexo SNARE, a sinaptotagmina é a proteína chave para a liberação do neurotransmissor.

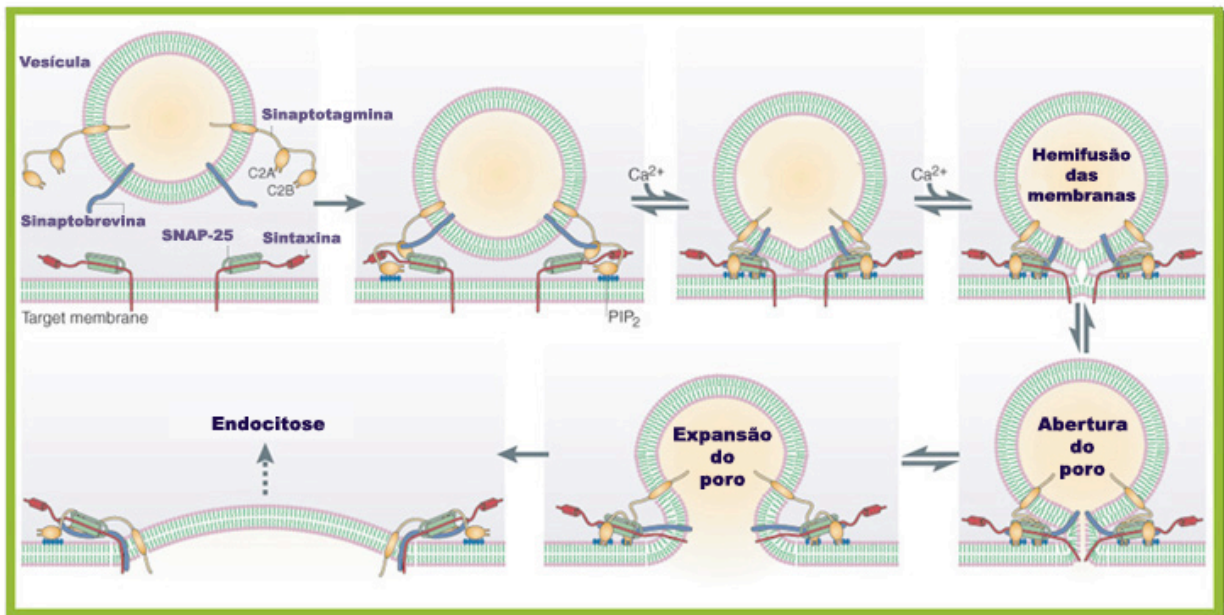


FIGURA 3 – *Interação das proteínas SNARE e a liberação do neurotransmissor.* Interação entre os dois domínios da sinaptotagmina e as proteínas da membrana celular. Após o influxo de cálcio a interação entre tais proteínas promove a hemifusão das membranas resultando na liberação do neurotransmissor.

FONTE: Adaptado de SÜDHOF, 2004.

1.2.4 Canais de cálcio e a neurotransmissão

Os íons cálcio atuam como segundos mensageiros na transdução do sinal elétrico dando início a eventos intracelulares como contração, secreção, expressão gênica e transmissão sináptica (CURTIS; CATTERALL, 1984; FLOCKERZI *et al.*, 1986; TAKAHASHI *et al.*, 1987). Desde os primeiros estudos sobre correntes de cálcio (REUTER, 1967; REUTER; BEELER, 1969) ficou evidente a existência de vários tipos de canais de cálcio definidos por critérios fisiológicos e farmacológicos (BEAN, 1989; LLINAS *et al.*, 1992). Quanto à sua função, esses canais podem ser operados por voltagem, operados por ligantes ou operados por estoques (PAREKH, 2003).

Os canais para cálcio operados por voltagem atuam principalmente em tecidos excitáveis, tais como células musculares e neurônios, e são ativados por alteração do potencial de membrana (NOWYCKY; THOMAS, 2002). Os canais de cálcio sensíveis à voltagem podem ser classificados em canais ativados por baixa voltagem e canais ativados por alta voltagem. Os canais ativados por baixa voltagem são aqueles em que a ativação se dá em potenciais ligeiramente acima do potencial de repouso e os de alta voltagem são aqueles nos quais o limiar de ativação atinge valores mais positivos, bem acima dos valores negativos do potencial de repouso

(MEIR *et al.*, 1999). Dentro do grupo dos canais ativados por alta voltagem existem os seguintes subtipos: L, N, P/Q. No grupo dos canais ativados por baixa voltagem apenas o subtipo T. Já o subtipo R encontra-se em uma faixa intermediária entre os canais ativados por alta voltagem e os canais ativados por baixa voltagem (ZHANG *et al.*, 1993).

Os canais para cálcio operados por ligantes compreendem uma diversidade de canais que são particularmente prevalentes em células secretórias e terminais nervosos. Esses canais são complexos formados por um receptor e um canal iônico que constitui parte integrante da proteína com vários domínios transmembrana. Estes receptores associados a um canal iônico participam da sinalização sináptica rápida entre células eletricamente excitáveis, mediada por determinados neurotransmissores, como o glutamato. Esses neurotransmissores abrem ou fecham transitoriamente o canal iônico, alterando a permeabilidade iônica da membrana plasmática, interferindo deste modo, na excitabilidade da célula pós-sináptica (CARAFOLI; BRINI, 2000).

Os canais para cálcio operados por estoques são ativados em resposta à depleção dos estoques de cálcio intracelular, tanto por mensageiros de mobilização de cálcio fisiológicos, como por agentes farmacológicos (CARAFOLI; BRINI, 2000).

Outra via envolvida no aumento da concentração do cálcio citoplasmático é a liberação desse íon a partir de estoques intracelulares. As organelas intracelulares que estocam cálcio são o retículo endoplasmático, mitocôndria, compartimentos acídicos, o complexo de Golgi (BERRIDGE, 1998; PAREKH, 2003; NOWYCKY; THOMAS, 2002) e retículo nucleoplástico (ECHEVARRIA *et al.*, 2003).

No miocárdio, no músculo liso e no músculo esquelético, a maioria das correntes de Ca^{2+} são produzidas por ativação de alta voltagem, alta condutância, inativação dependente de correntes de voltagem lentas e inibição específica por drogas bloqueadoras de Ca^{2+} incluindo dihidropiridinas, fenilalquilaminas e benzotiazepinas (REUTER, 1983). Essas correntes de cálcio são designadas Tipo-L já que são de longa duração (*long lasting*) (NOWYCKY; FOX; TISIEN, 1985).

Em comparação com correntes de cálcio do tipo L, estudos demonstraram existir canais ativados por potenciais de membrana mais negativos, inativados rapidamente e insensíveis a drogas bloqueadoras de canais de cálcio. Estes foram designados canais ativados por baixa voltagem devido à sua dependência de potenciais de membrana mais negativos (CARBONE; LUX, 1984) ou canais de

cálcio do tipo T (NOWYCKY; FOX; TISIEN, 1985). Canais para Ca^{2+} com inativação dependente de potenciais mais negativos e mais rápidos que do tipo L, porém mais positivos e mais lentos que canais do tipo T, foram chamados de canais do tipo N (NOWYCKY; FOX; TISIEN, 1985). Canais para Ca^{2+} do tipo P foram descritos primeiramente em neurônios de Purkinje (LLINAS *et al.*, 1989) e são bloqueados pela toxina de aranha ω -agatoxina IVA (MINTZ *et al.*, 1992). Canais para Ca^{2+} tipo-Q foram evidenciados pela primeira vez em neurônios cerebelares granulares, também são bloqueadas pela ω -agatoxina IVA, porém com menor afinidade. Canais para Ca^{2+} tipo-R em neurônios cerebelares granulares são resistentes a bloqueadores peptídicos (RANDALL; TSIEN, 1995), contribuem com a liberação sináptica em alguns neurônios, embora em menor extensão, e suas funções ainda são pouco compreendidas (KAMP *et al.*, 2005).

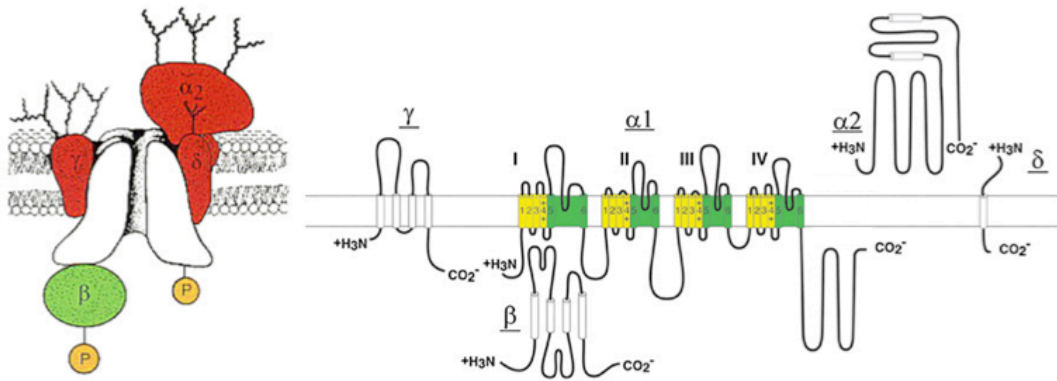
O estudo da estrutura dos canais para cálcio foi feito primeiramente em células de músculo esquelético (CURTIS; CATTERALL, 1984). A purificação inicial revelou três subunidades α_1 , β e γ (ERTEL *et al.*, 2000) e uma subunidade adicional $\alpha_2\delta$ ligada através de pontes dissulfeto (HOSEY; LAZDUNSKI, 1988). A subunidade α_1 (190-250KDa) é a maior subunidade e faz parte do poro de condução como um sensor de voltagem e instrumento de bloqueio do poro. Tais unidades também possuem vários sítios de regulação por segundos mensageiros, drogas e toxinas. Ela é composta por aproximadamente 2000 aminoácidos e organizada em quatro domínios (I-IV) e cada domínio é composto por seis domínios α -hélice transmembrana (S1-S6) (FIG. 4). A subunidade intracelular β é composta por uma proteína hidrofílica de 50-65 KDa. A subunidade γ apresenta quatro segmentos transmembrana e é encontrada em canais para cálcio de músculo esquelético e já foi relatada no coração e no cérebro (CATTERALL, 2008).

Análises de propriedades bioquímicas, glicosilação e hidrofobicidade dessas cinco subunidades revelaram que α_1 é a principal subunidade transmembrana em associação com a subunidade $\alpha_2\delta$; β é uma subunidade intracelular e γ uma subunidade também transmembrana formadora do poro (TAKAHASHI *et al.*, 1987) (FIG. 4).

São 10 os genes humanos que codificam as subunidades Ca_v α_1 formadora do poro e estes genes se dividem em três subfamílias distintas (Cav1 a Cav3) sendo que cada uma delas representa uma subfamília de canais para cálcio (ERTEL *et al.*, 2000). Estudos realizados em células do miocárdio revelaram canais

para cálcio $Ca_v1.2$ compostos por subunidades α_1 , $\alpha_2\delta$, β e γ similares às encontradas em músculo esquelético $Ca_v1.1$ (HOSEY; LAZDUNSKI, 1988; KUNIYASU *et al.*, 1992). Estudos posteriores revelaram que canais de cálcio do tipo L possuíam as subunidades α_1 , $\alpha_2\delta$ e β , mas não a subunidade γ (AHLIJANIAN; WESTENBROEK; CATTERALL, 1990). Estudos de canais para cálcio do tipo N $Ca_v2.2$ revelaram que tais canais são compostos por subunidades α_1 , $\alpha_2\delta$ e β mas não pela subunidade γ (AHLIJANIAN; WESTENBROEK; CATTERALL, 1990; MCENERY *et al.*, 1991; WITCHER *et al.*, 1994). Os canais para cálcio do tipo P/Q $Ca_v2.1$ também apresentam as subunidades α_1 , $\alpha_2\delta$ e β mas não a subunidade γ (AHLIJANIAN; WESTENBROEK; CATTERALL, 1990; MCENERY *et al.*, 1991; WITCHER *et al.*, 1994; MARTIN-MOUTOT *et al.*, 1995; MARTIN-MOUTOT *et al.*, 1996) (FIG. 4).

A)



B)

$Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v1.4$	Canais do tipo L
$Ca_v2.1$	Canais do tipo P/Q
$Ca_v2.2$	Canais do tipo N
$Ca_v2.3$	Canais do tipo R
$Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$	Canais do tipo T

C)

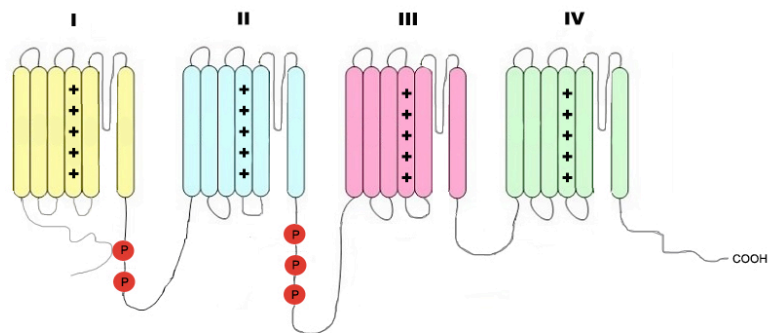


FIGURA 4 – Aspectos estruturais dos canais de cálcio regulados por voltagem. (A) Representação das subunidades α_1 , $\alpha_2\delta$, β e γ . α_1 é a principal subunidade transmembrana em associação com a subunidade $\alpha_2\delta$, β é uma subunidade intracelular e γ uma subunidade também transmembrana. (B) classificação dos diferentes tipos de canais de cálcio. (C) Estrutura transmembrana da subunidade α_1 . Observar sítios importantes de fosforilação representados pelos círculos em vermelho. Sensores de voltagem dos domínios transmembrana estão indicados pelos símbolos de adição.
 FONTE: Adaptado de Catterall et al., 2008.

1.2.5 Glutamato

O cérebro humano possui aproximadamente 80 bilhões de neurônios (HERCULANO-HOUZEL *et al.*, 2010) e cada um desses fazendo aproximadamente 1000 sinapses com outros neurônios. Sabe-se que grande parte dessas 10^{13} sinapses utilizam aminoácidos como neurotransmissores e o glutamato é o neurotransmissor excitatório mais prevalente no sistema nervoso central de mamíferos. Experimentos realizados ao longo dos últimos anos tem comprovado o seu envolvimento com desenvolvimento neural, plasticidade sináptica, aprendizado, memória, dano neuronal pós-isquemia ou hipoglicemia, epilepsia e outras doenças neurodegenerativas, dependência e tolerância a drogas, dor neuropática, ansiedade e depressão (OTTERSEN *et al.*, 1997; MELDRUM, 2000; LAU *et al.*, 2010). A excitotoxicidade vem sendo considerada como importante fator relacionado a diversos distúrbios neurológicos como as lesões provocadas por isquemia ou traumatismo encefálico. Também vem sendo associada à fisiopatologia de doenças crônico-degenerativas como a esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla e doença de Parkinson (LAU *et al.*, 2010; HERCULANO-HOUZEL *et al.*, 2010).

O processo de transmissão glutamatérgica se dá pelos elementos pré-sinápticos (responsáveis pela síntese, armazenamento e liberação do neurotransmissor) e pós-sinápticos representados pelos receptores de glutamato. Os receptores de glutamato podem ser classificados em dois diferentes grupos: receptores ionotrópicos, que são acoplados a canais catiônicos, NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico) e cainato; e receptores metabotrópicos, que são acoplados à proteína G e atuam via segundo mensageiro (FAGNI *et al.*, 2000).

Os receptores NMDA são compostos pela combinação de três diferentes subunidades (NR1-3) que, quando ativadas, promovem o influxo de cátions, mais notadamente o cálcio e o sódio. A presença da subunidade NR1 é essencial para tornar o canal funcional, enquanto NR2 e NR3 tem uma ação modulatória nos canais formados pelos receptores de NMDA (SANCHEZ-PEREZ *et al.*, 2005; ZARAIN-HERZBERG *et al.*, 2005). O aumento da concentração de cálcio intracelular é responsável tanto pela plasticidade neuronal como pela neurotoxicidade, a qual este receptor parece estar envolvido (LAU *et al.*, 2010).

Os receptores AMPA e cainato pertencem à superfamília dos receptores NMDA apresentando até 25% de homologia com estes receptores. Os receptores AMPA são formados por quatro subunidades (GluR1-4) e são ativados na presença de glutamato. O glutamato interage preferencialmente com o receptor AMPA produzindo rápidos potenciais Na^+ -dependentes levando à despolarização da membrana, resultando em desbloqueio do canal do receptor do tipo NMDA, por repulsão eletrostática do magnésio, permitindo um alto influxo de íons cálcio (LAU *et al.*, 2010).

Os receptores metabotrópicos estão amplamente envolvidos na neurotransmissão e são divididos em três grupos: Os receptores do grupo I (mGlu1 e mGlu5) estimulam a hidrólise da fosfoinositol, os receptores do grupo II (mGlu2 e mGlu3) e os do grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8) que são negativamente acoplados à adenilato ciclase (LAFON-CAZAL *et al.*, 1999). Os receptores do grupo I podem aumentar a concentração intracelular de cálcio via IP3 (inositol 1, 4, 5 trifosfato) e DAG (diacilglicerol) (MADDEN, 2002).

O glutamato é liberado de variadas fontes por diversos mecanismos. Tais mecanismos de neurotransmissão incluem a via dependente de cálcio e a via independente de cálcio. A via dependente de cálcio envolve a liberação do neurotransmissor via exocitose de vesículas sinápticas através da interação de proteínas de membrana ativadas pelo aumento da concentração de cálcio intracelular. Apesar do grande enfoque dado à liberação de glutamato via exocitose de vesículas sinápticas, esta não é a única forma de liberação do neurotransmissor. Este neurotransmissor pode ser liberado de maneira independente de cálcio, ou seja, sua liberação de origem não vesicular através da reversão da captação de glutamato (DANBOLT, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação das toxinas purificadas do veneno de aranhas *Phoneutria keyserlingi* (PkTx23C3, PkTx28C4, PkTx20C4) e *Phoneutria nigriventer* (PnTx19C1, PnTx25A1, PnTx37C2, PnTx19C2, PnTx3-2) na liberação de glutamato.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se as toxinas PkTx23C3 e PkTx20C4 bloqueiam a liberação de glutamato pela via dependente ou independente de cálcio;
- Verificar se as toxinas PkTx23C3 e PkTx20C4 atuam bloqueando canais para cálcio específicos;
- Avaliar o efeito das toxinas PkTx23C3, PnTx19C1, PkTx28C4, PnTx25A1, PkTx20C4, PnTx37C2, PnTx19C2 e PnTx3-2 comparativamente aos efeitos de toxinas conhecidas na literatura, analisando dados de sequenciamento dentre as que são similares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

- Banho de incubação regulado na temperatura de 35°C
Modelo: 1050/270 da Biomatic
- Homogeneizador de tecido
Modelo: Glass Col 099C
- Bomba peristáltica
Modelo 7533-80 – Cole Parmer
- Centrífuga refrigerada
Modelo: HIMAC CR 21E
- Microcentrífuga refrigerada
Modelo 5415R, Eppendorf.
- Espectrofluorofotômetro
Modelo RF-5301 PC, Shimadzu.

3.2 Soluções

Solução Gradiente

Sacarose	0,32 M
EDTA (Ácido etileno diamino tetracético)	1,0 mM
DTT (Dithioeritrol)	0,25 mM
(pH ajustado para 7,4 com NaOH 0,1 M)	

Soluções Percoll[®] para gradiente descontínuo

Percoll [®]	3% (v/v) em Solução Gradiente
Percoll [®]	10% (v/v) em Solução Gradiente
Percoll [®]	15% (v/v) em Solução Gradiente
Percoll [®]	23% (v/v) em Solução Gradiente
(pH ajustado para 7,4 com HCl 10% (v/v) em solução gradiente)	

Solução Krebs-Ringer-Hepes (KRH) sem cálcio

NaCl	124 mM
KCl	4 mM
MgSO ₄	1,2 mM
HEPES	25 mM
Glicose	10 mM

(pH ajustado para 7,4 com NaOH 5,0 M)

3.3 Reagentes e toxinas

Fura-2 acetoximetil éster (AM), sacarose, Percoll[®], SDS, EGTA, ω -conotoxina MVIIC, ω -conotoxina AgalVA e ω -conotoxina GVIA foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Mo, USA). As toxinas PkTx23C3, PnTx19C1, PkTx28C4, PnTx25A1, PkTx20C4, PnTx37C2, PnTx19C2 e PnTx3-2 foram obtidas de acordo com Richardson (2006).

3.4 Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas, pesando entre 180-200 gramas, tratados sob ciclo 12/12h luz/escuro, alimentação e água livres, fornecidos pelo CEBIO – ICB/UFMG. Para cada experimento, foi sacrificado um animal.

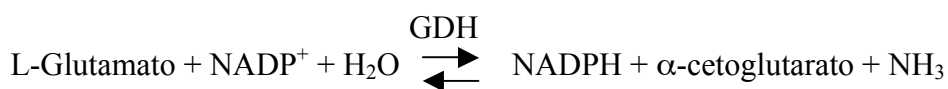
3.5 Preparação de sinaptosomas

Os animais foram decapitados e tiveram o córtex dissecado e transferido para tubos Potter-Elvehjen contendo 10 mL de solução Gradiente (ver Soluções). O tecido foi homogeneizado (11 vezes num homogeneizador Glas Col modelo 099C) e em seguida centrifugado a 1000 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante dessa centrifugação foi aplicado em um gradiente descontínuo de Percoll[®] (23%, 15%, 10 e 3% v/v em solução gradiente) como previamente descrito (DUNKLEY et al., 1986) e submetido à centrifugação a 37000 g, a 4°C por 15 minutos. As frações P3 e P4 foram recolhidas em conjunto e submetidas à outra centrifugação 37000 g, 4°C, 15 minutos em KRH sem cálcio para retirada do excesso de Percoll[®]. O precipitado resultante dessa centrifugação foi diluído em 1200 μ L de KRH sem cálcio. Alíquotas de 200 μ L foram transferidas para tubos cônicos de micro centrífuga e mantidas no

gelo até a realização dos experimentos. Uma amostra de 50 μL foi separada e congelada à -20°C para posterior quantificação de proteínas, segundo Lowry (1951).

3.6 *Ensaio para liberação de glutamato*

Esse ensaio é baseado na reação envolvendo GDH (glutamato desidrogenase), NADP^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), NADPH e glutamato (EQUAÇÃO 1). Quando o glutamato é liberado pelos sinaptosomas sofre oxidação pela enzima GDH sendo o NADP^+ o acceptor dos elétrons provenientes desta oxidação. O NADPH ao ser excitado por luz em comprimento de onda de 360 nm, emite luz no comprimento de onda de 450 nm, que é detectada por um fotomultiplicador no espectrofluorímetro. Dessa maneira pode-se quantificar o glutamato liberado pelos sinaptosomas (NICHOLLS *et al.*, 1987; ROMANO-SILVA *et al.*, 1993). Sendo que a reação pode ocorrer tanto para formação de α -cetogluturato ou L-glutamato, um excesso de NADP^+ favorece o sentido da reação para formação de α -cetogluturato.



EQUAÇÃO 1 – *Reação para formação de α -cetogluturato à partir de L-glutamato.* Oxidação do glutamato pela GDH em presença de NADP^+ e água, para a formação de NADPH e α -cetogluturato. A reação é reversível, podendo ocorrer à formação de α -cetogluturato e L-glutamato.

Tubos contendo 200 μL de suspensão de sinaptosomas (4mg de proteína/ml) foram incubados à 35°C por 30 minutos, seguido de diluição para 1200 μL com KRH sem cálcio e incubação por mais 30 minutos a 35°C . Depois dessa última incubação os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 15 segundos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado diluído para volume final de 2 mL em KRH sem cálcio e a suspensão resultante foi transferida para leitura da fluorescência no espectrofluorímetro e mantida à 37°C sob agitação constante por um tempo de leitura de 900 segundos. Cloreto de cálcio foi adicionado à cubeta (concentração final de 1 mM) aos 30 segundos, NADP^+ (concentração final

de 4 mM) aos 90 segundos, GDH (50 unidades para volume final de 2 mL) aos 150 segundos, KCl (concentração final de 33 mM) foi adicionado aos 300 segundos e padrão de glutamato (5 nmol) aos 800 segundos. A aquisição de dados foi feita utilizando-se programas desenvolvidos pela Shimadzu, fabricante do respectivo espectrofluorímetro. Os filtros para excitação (360 nm) e emissão (450 nm) de fluorescência foram adquiridos dos fabricantes dos espectrofluorímetros.

3.7 Medida do cálcio livre intrasinosomal

Fura2-AM (solução estoque a 1 mM em DMSO) foi adicionado à suspensão sinaptosomal para uma concentração final de 50 μ M, a mistura incubada a 37°C por 30 minutos e em seguida diluída para 1200 μ L, seguida por mais 30 minutos de incubação. O marcador Fura2-AM isolado dos terminais nervosos foi lavado através de centrifugação e o sinaptosoma foi ressuspensão com 2 mL de solução KRH sendo imediatamente transferido para cubeta fluorimétrica e usado para a quantificação fluorimétrica do cálcio intracelular em espectrofluorímetro. A emissão de fluorescência foi detectada a 510 nm usando como faixa de excitação média 340/380 nm sob temperatura controlada a 37°C e sob constante agitação. Cloreto de Cálcio (CaCl_2) foi adicionado à suspensão sinaptosomal (1 mM concentração final) aos 30s no início de cada análise fluorimétrica. Toxinas bloqueadoras específicas de canais para cálcio foram adicionadas (separadamente ou em associação) à suspensão 60 segundos antes da despolarização dos sinaptosomas com KCl 33 mM. O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzido pela despolarização da membrana é estritamente dependente da presença de Ca^{2+} extracelular nestas condições (ROMANO-SILVA *et al.*, 1993).

Para avaliar o efeito das toxinas PkTx23C3, PkTx20C4, PnTx3-2 e o seu possível efeito na diminuição do influxo de cálcio estas foram adicionadas 1 minuto antes da despolarização com KCl 33mM.

3.8 Análise estatística dos resultados

Os experimentos foram realizados em dias independentes e repetidos no mínimo cinco vezes. Os resultados foram analisados por análise de variância pelos

programa estatísticos Sigma Plot versão 10.0 e GraphPad Prism 5.0 considerando-se diferenças entre grupos estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Investigação do efeito das toxinas PkTx23C3, PnTx19C1, PkTx28C4, PnTx25A1, PkTx20C4, PnTx37C2, PnTx19C2 e PnTx3-2 na liberação de glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato

Inicialmente realizamos experimentos para avaliar os efeitos das toxinas acima citadas na liberação de glutamato. Para tais experimentos utilizamos o ensaio de liberação de glutamato (ver Material e Métodos). A TABELA 1 mostra o efeito dos peptídeos na liberação de glutamato após despolarização com KCl 33 mM. Observamos que dos oito peptídeos testados apenas 3 apresentaram inibição significativa na liberação de glutamato quando comparados ao controle. Na presença de PkTx23C3 (300 nM) observa-se uma inibição de 44,4% na liberação total de glutamato, na presença da toxina PkTx20C4 (3 μ M) uma inibição de 52,4% e na presença da toxina PnTx3-2 (3 μ M) uma inibição de 38,7%. Verificamos que a liberação de glutamato na presença de EGTA, evocada por KCl (33 mM), é de 51,6%, o que corresponde ao componente da liberação independente de cálcio.

TABELA 1

Efeito das toxinas purificadas dos venenos das aranhas *Phoneutria keiserling* e *Phoneutria nigriventer* na liberação de glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato após despolarização com KCl 33 mM.

	Concentração da toxina	Liberação de Glutamato (nmol/mg de proteína)	
PkTx23C3	(0,3 μ M)	6,9 \pm 2,7*	<i>Phoneutria keiserling</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 keiserling</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 keiserling</i>
PnTx37C2	(100 nM)	12,8 \pm 1,3	<i>Phoneutria nigriventer</i>
PnTx19C2	(2 μ M)	10,3 \pm 1,0	<i>Phoneutria nigriventer</i>
PnTx3-2	(3 μ M)	7,6 \pm 0,7*	<i>Phoneutria nigriventer</i>
EGTA	(2 mM)	6,4 \pm 1,9	---
KCl	(33mM)	12,4 \pm 0,5	---

*P<0,05

Concentrações progressivamente menores das toxinas PkTx23C3, PkTx20C4 e PkTx3-2 foram testadas e as curvas dose resposta bem como os IC₅₀ foram obtidos utilizando-se o programa Sigma Plot versão 10.0 (FIG. 5). O IC₅₀ para a PkTx23C3 calculado foi de 116,4 nM, o IC₅₀ para a PkTx20C4 calculado foi de 1,48 μ M e para a PnTx3-2 calculado foi de 2,32 μ M.

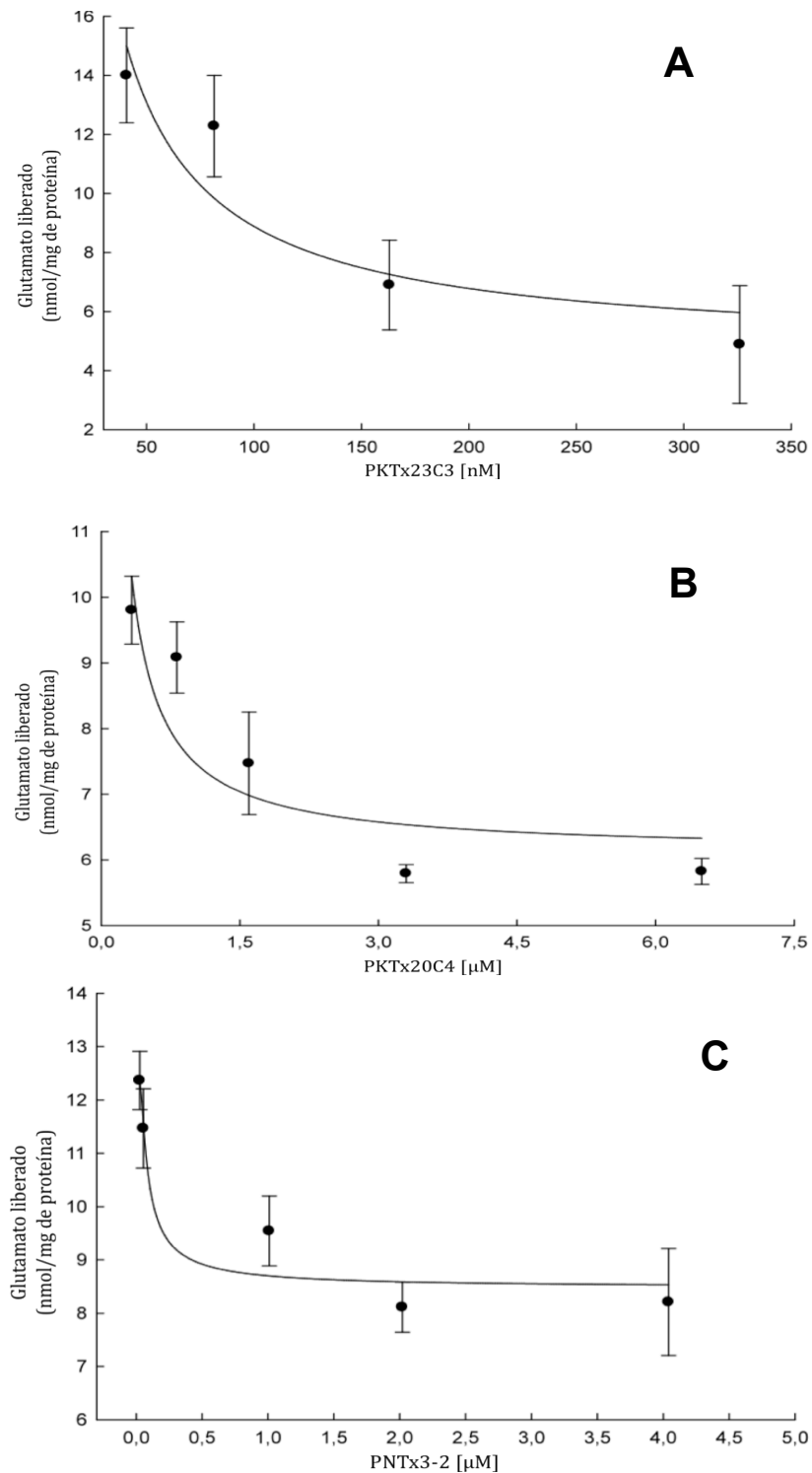


FIGURA 5 – Efeito das Toxinas *PkTx23C3*, *PkTx20C4* e *PnTx3-2* na liberação de glutamato: Os sinaptosomas foram obtidos conforme Material e Métodos e as toxinas incubadas 100 segundos antes da despolarização com KCl 33 mM. Curva dose-resposta do efeito inibitório das toxinas A) *PkTx23C3*, B) *PkTx20C4* e C) *PnTx3-2* sobre a liberação de glutamato induzida por KCl 33mM. Os resultados representam a média \pm erro padrão de, no mínimo, cinco experimentos.

4.2 Avaliação da liberação de glutamato independente de cálcio na presença das toxinas PkTx23C3, PkTx20C4, PnTx3-2 em sinaptosomas cérebro corticais de rato

Para avaliar a liberação de glutamato independente de cálcio extracelular utilizamos o ensaio para liberação de glutamato adicionando EGTA à concentração final de 2 mM, 270 segundos antes da despolarização com KCl 33 mM. Com a adição das toxinas PkTx23C3, PkTx20C4, PnTx3-2 nas concentrações 300 nM, 3 μ M e 3 μ M respectivamente, não observamos diminuição dos níveis de glutamato liberado quando comparados com o controle (neste experimento representado por KCl + EGTA). Com estes dados podemos sugerir que tais toxinas inibem a liberação de glutamato por uma via que não a via independente de cálcio (FIG. 6).

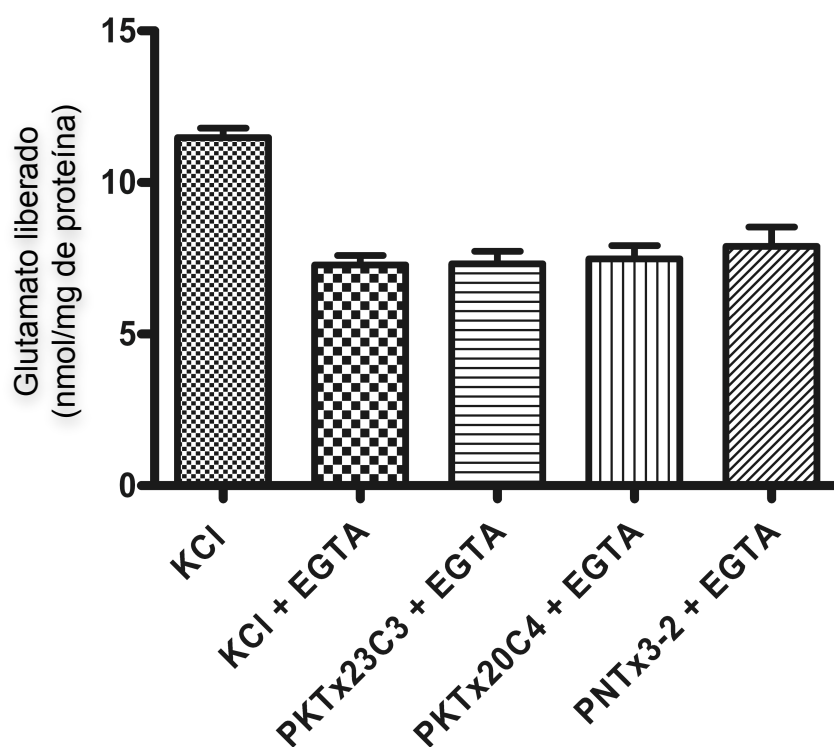


FIGURA 6 – Efeito das toxinas PkTx23C3, PkTx20C4 e PnTx3-2 na liberação de glutamato independente de cálcio: Os sinaptosomas foram obtidos conforme Material e Métodos e as toxinas incubadas 100 segundos antes da despolarização com KCl 33 mM nas concentrações 300 nM, 3 μ M e 3 μ M respectivamente. Em todos os experimentos utilizamos EGTA 2 mM, sendo o mesmo adicionado 270s antes da despolarização com KCl. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão de, no mínimo, cinco experimentos independentes. *P<0,05 representa os níveis de significância quando comparados com o controle, representado por KCl + EGTA.

4.3 Efeito das toxinas PkTx23C3, PkTx20C4, PnTx3-2 na $[Ca^{2+}]_i$ induzida por KCl 33mM

A avaliação da concentração de cálcio intracelular foi realizada utilizando-se Fura2-AM, um marcador fluorescente de cálcio. Esta substância, após ser adicionada em níveis saturantes à solução contendo sinaptosomas, tem a capacidade de atravessar a membrana celular. No meio intracelular tal substância sofre quebra da ligação éster do grupo acetoximetil (AM) por esterases celulares inespecíficas e fica livre no citoplasma emitindo fluorescência quando se liga ao cálcio após a despolarização celular (ROMANO-SILVA *et al.*, 1993). Os sinaptosomas foram pré-incubados por 1 hora com Fura2-AM 50 μ M e mantidos a temperatura de 35°C. Após a despolarização com KCl 33 mM o aumento da fluorescência emitida (resultado da ligação do cálcio e do Fura2-AM intracelular) foi quantificada em espectrofluorímetro e calculado como aumento da concentração intracelular de cálcio.

As toxinas PkTx23C3, PkTx20C4, PnTx3-2 inibiram o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ evocado por KCl (33nM) na concentração de 300nM, 3 μ M e 3 μ M respectivamente quando comparadas ao controle. Esses dados sugerem que o bloqueio na liberação de glutamato, proposto anteriormente em nossos resultados, se faz principalmente pela via dependente de cálcio (FIG. 7).

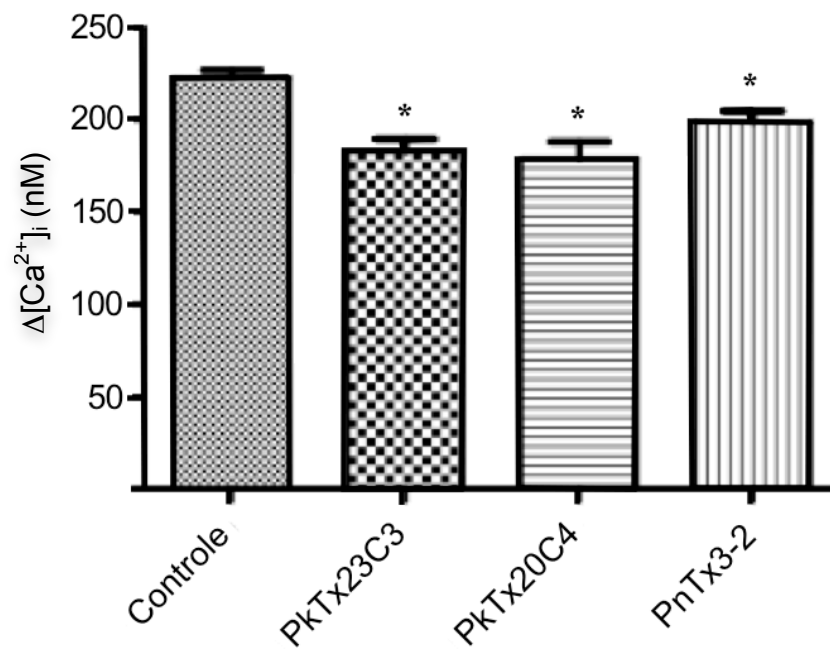


FIGURA 7 – Efeito das toxinas PkTx23C3, PkTx20C4 e PnTx3-2 na $[Ca^{2+}]_i$ induzida por KCl 33mM: Os sinaptossomas foram obtidos conforme Material e Métodos e as toxinas incubadas 60 segundos antes da despolarização com KCl 33 mM nas concentrações de 300nM, 3 μ M e 3 μ M respectivamente. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão de, no mínimo, cinco experimentos independentes.

*P<0,05 representa o nível de significância quando comparado com o controle.

4.4 Efeito das toxinas PkTx23C3, PkTx20C4 e das toxinas bloqueadoras de canais para cálcio

No próximo passo comparamos o efeito das toxinas PkTx23C3 e PkTx20C4 nas concentrações de 300nM e 3 µM respectivamente, com o de outras toxinas bloqueadoras de canais para cálcio (ω -toxina GVIA, ω -toxina MVIIC e ω -toxina AgalVA).

Medidas de cálcio intrasinaptosomal foram feitas seguindo o protocolo utilizado anteriormente, onde KCl 33 mM foi usado como estímulo despolarizante. Cada toxina foi adicionada 60 segundos antes da despolarização. Quando adicionadas junto às toxinas PkTx23C3 e PkTx20C4 as toxinas conhecidas poderiam provocar uma inibição aditiva, caso atuassem em canais de cálcio diferentes. Caso contrário poderíamos concluir que tais toxinas atuam sobre o mesmo canal para cálcio já que não apresentaram efeito aditivo.

4.4.1 Efeito da toxina PkTx23C3 e das toxinas bloqueadoras de canais para cálcio no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ evocada por KCl em sinaptosomas cérebro corticais de rato

A ω -toxina AgalVA atua especificamente no bloqueio de canais para cálcio tipo P quando na concentração de 30 nM (RANDALL; TSIEN, 1995) e, em nossos experimentos, provocou uma inibição de $12,97 \pm 2,55\%$ após despolarização com KCl 33 mM em relação ao controle. Quando adicionada juntamente com a toxina PkTx23C3 provocou uma inibição de $13,84 \pm 3,70\%$ não se observando efeito aditivo ($P > 0,05$) (FIG. 8-A).

A ω -conotoxina GVIA atua especificamente no bloqueio de canais de cálcio do tipo N quando utilizado na concentração de 1µM e apresentou inibição de $15,06 \pm 1,87\%$ em relação ao controle. Quando adicionada juntamente com a toxina PkTx23C3 provocou uma inibição de $18,76 \pm 2,83\%$ não se observando efeito aditivo ($P > 0,05$) (FIG. 8-B).

A ω -conotoxina MVIIC atua especificamente no bloqueio de canais de cálcio do tipo P/Q e N quando utilizado na concentração de 1 µM e apresentou inibição de $38,19 \pm 2,11\%$ em relação ao controle. Quando adicionada juntamente com a toxina PkTx23C3 provocou uma inibição de $35,83 \pm 4,27\%$ observando-se

efeito aditivo já que a toxina PKTx23C3 isoladamente provocou uma inibição de $18,03 \pm 3,93\%$ ($P > 0,05$) (FIG.8-C).

Observamos que a toxina PkTx23C3 quando adicionada junto à toxina AgaIVA não apresentou efeito aditivo comparando-se com a presença apenas da AgaIVA, o mesmo acontecendo quando adicionada junto à ω -conotoxina GVIA. Observamos também que a toxina PkTx23C3 apresentou efeito aditivo quando incubada juntamente com a e ω -conotoxina MVIIC. Apesar de manter seu efeito de redução da concentração de cálcio no meio intracelular, a toxina PkTx23C3 não apresentou resultados aditivos significativos quando em presença das toxinas AgaIVA, ω -conotoxina GVIA. Tais resultados nos impossibilitaram determinar com maior precisão através de quais canais se deu o bloqueio do influxo de cálcio proposto em nossos resultados.

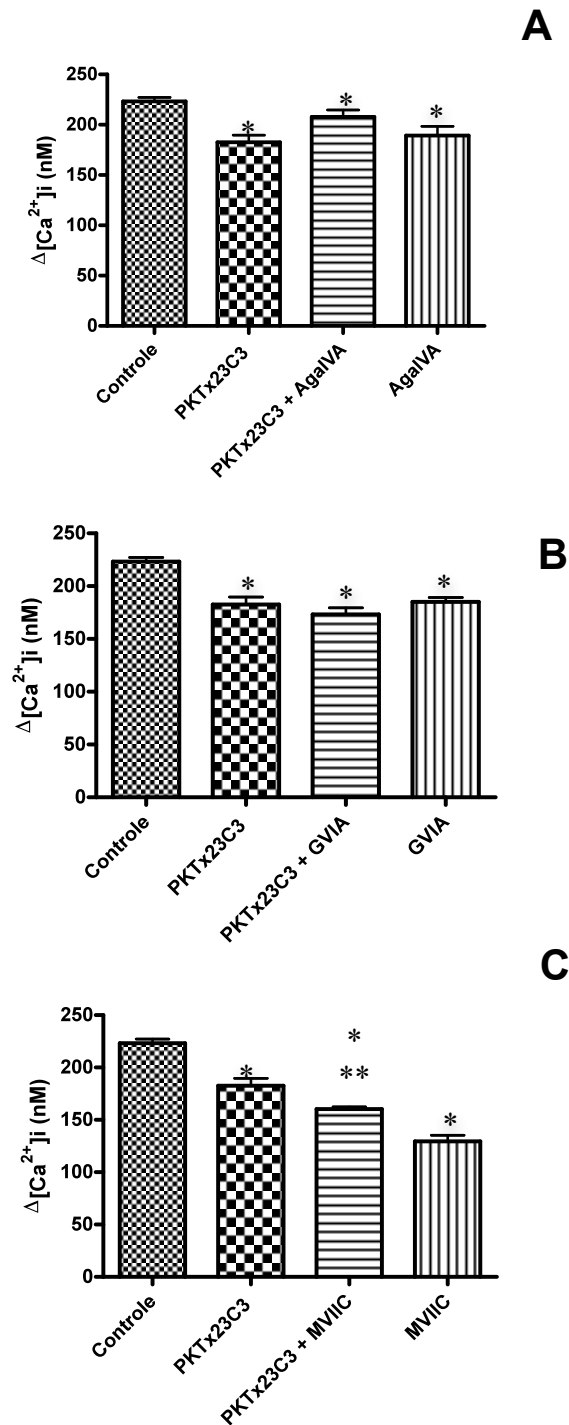


FIGURA 8 – Efeito da toxina PkTx23C3 e das toxinas bloqueadoras para canais de cálcio no aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Os sinaptossomas foram obtidos conforme Material e Métodos e as toxinas incubadas 60 segundos antes da despolarização com KCl 33 nM nas concentrações acima citadas: A) Avaliação do efeito aditivo da toxina PkTx23C3 quando comparada à ω -toxina AgalVA na concentração de 30 nM. B) Avaliação do efeito aditivo da toxina PkTx23C3 quando comparada à toxina ω -toxina GVIA na concentração de 1 μ M. C) Avaliação do efeito aditivo da toxina PkTx23C3 quando comparada à toxina ω -conotoxina MVIIC na concentração de 1 μ M. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes.

* $P < 0,05$ representa o nível de significância quando comparada ao controle.

** $P < 0,05$ representa o nível de significância quando comparado ao efeito da PkTx23C3 isoladamente.

4.4.2 Efeito da toxina PkTx20C4 e das toxinas bloqueadoras de canais para cálcio no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ evocada por KCl em sinaptosomas cérebro corticais de rato

A toxina AgaIVA atua especificamente no bloqueio de canais para cálcio tipo P quando na concentração de 30 nM (RANDALL; TSIEN, 1995) e, em nossos experimentos, provocou uma inibição de $13,01 \pm 2,55\%$ após despolarização com KCl 33 nM em relação ao controle. Quando adicionada juntamente com a toxina PkTx20C4 provocou inibição de $23,76 \pm 1,60\%$ observando-se um efeito aditivo ($P < 0,05$) (FIG. 9-A).

A ω -conotoxina GVIA atua especificamente no bloqueio de canais para cálcio do tipo N quando utilizado na concentração de $1\mu\text{M}$ e apresentou inibição de $14,33 \pm 1,87\%$ em relação ao controle. Quando adicionada juntamente com a toxina PkTx20C4 provocou inibição de $10,76 \pm 3,58\%$ não se observando efeito aditivo ($P > 0,05$) (FIG. 9-B).

A ω -conotoxina MVIIC atua especificamente no bloqueio de canais para cálcio do tipo P/Q quando utilizado na concentração de $1\mu\text{M}$ e apresentou inibição de $61,81 \pm 2,11\%$ em relação ao controle. Quando adicionada juntamente com a toxina PkTx20C4 provocou uma inibição de $35,83 \pm 4,27\%$ observando-se efeito aditivo já que a toxina PkTx20C4 isoladamente provocou uma inibição de $10,03 \pm 3,87\%$ ($P > 0,05$) (FIG.9-C).

Observamos que a toxina PkTx20C4 quando adicionada junto à toxina AgaIVA apresentou efeito aditivo comparando-se com a presença apenas da PkTx20C4, o mesmo acontecendo quando incubada juntamente com a ω -conotoxina MVIIC. Quando incubada juntamente com a ω -conotoxina GVIA não observamos efeito aditivo. Desta forma podemos inferir que, provavelmente a toxina PkTx20C4 atua inibindo o influxo de cálcio pela inibição de canais para cálcio do tipo N.

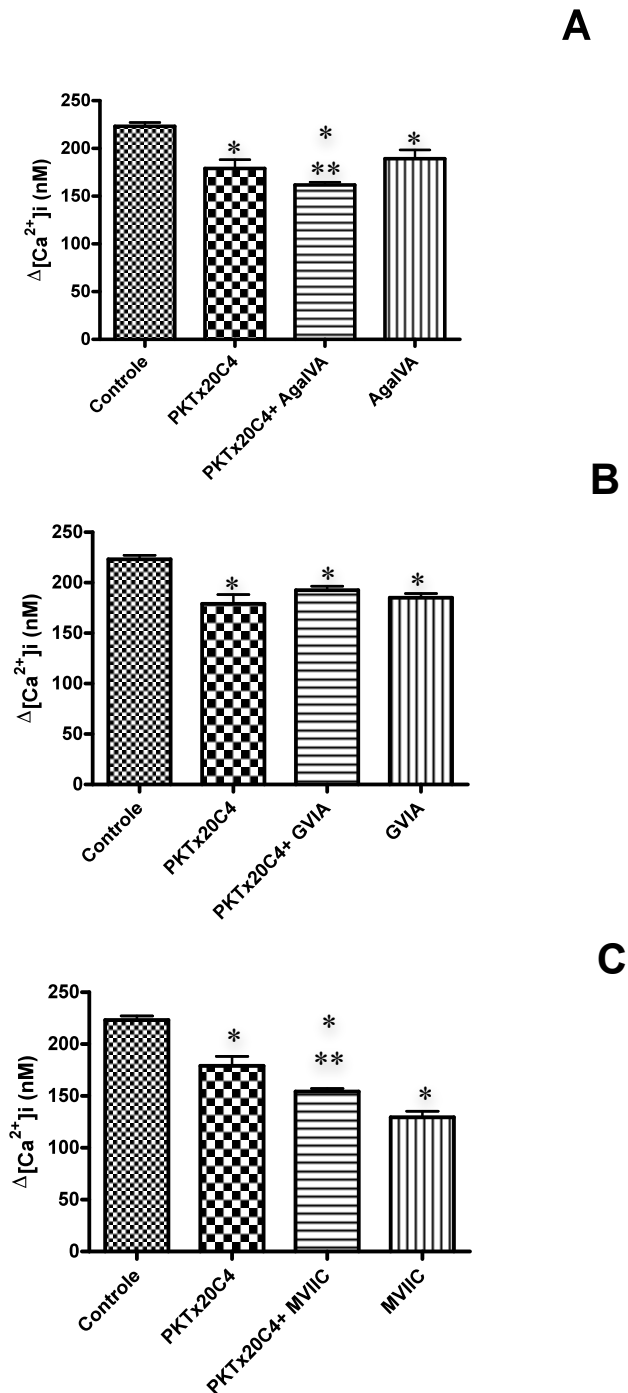


FIGURA 9 – Efeito aditivo da toxina PkTx20C4 e das toxinas bloqueadoras de canais para cálcio no aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Os sinaptossomas foram obtidos conforme Material e Métodos e as toxinas incubadas 60 segundos antes da despolarização com KCl 33 nM nas concentrações acima citadas: A) Avaliação do efeito aditivo da toxina PkTx20C4 quando comparada à ω -toxina AgalVA na concentração de 30 nM. B) Avaliação do efeito aditivo da toxina PkTx20C4 quando comparada à toxina ω -toxina GVIA na concentração de 1 μ M. C) Avaliação do efeito aditivo da toxina PkTx20C4 quando comparada à toxina ω -conotoxina MVIIIC na concentração de 1 μ M. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes.

* $P < 0,05$ representa o nível de significância quando comparado ao controle

** $P < 0,05$ representa o nível de significância quando comparado ao efeito da PkTx20C4 isoladamente.

5 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho verificamos que das toxinas estudadas apenas três apresentaram uma inibição significativa da liberação de glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato. À partir dos dados obtidos procuramos, utilizando a análise de dados de sequenciamento, comparar as toxinas estudadas às toxinas conhecidas na literatura. Através da comparação da sequência de aminoácidos, procuramos levantar hipóteses de como tais modificações poderiam ser responsáveis pelos resultados observados.

5.1 Análise comparativa do sequenciamento da toxina PkTx23C3 e seu efeito na liberação de glutamato dependente de cálcio.

Em trabalho recentemente publicado foram feitas análises comparativas de diversos peptídeos purificados do veneno das aranhas *P. keyserlingi*, *P. nigriventer* e *P. reidy* (RICHARDSON *et al.*, 2006). Foi demonstrado que as toxinas da família Tx3, purificadas do veneno da aranha *P. nigriventer*, apresentam grande similaridade em sua cadeia de aminoácidos (40-50%) quando comparadas às cadeias de aminoácidos das toxinas AgatoxinsIII e AgorTxB7a, toxina esta purificada do veneno da aranha *Agelena orientalis* (KOZLOV *et al.*, 2005). A família da Tx3 caracteriza-se peculiarmente por ser a única a possuir resíduos de cisteína dispostos na sequência CxCCxC (FIG. 10-A). Sabe-se que tais toxinas apresentam alta toxicidade quando injetadas em ratos (CORDEIRO *et al.*, 1993) e grande efeito na inativação de correntes de cálcio e liberação de glutamato dependente de cálcio atuando principalmente em canais do tipo P e Q (VIEIRA *et al.*, 2005).

Em nosso trabalho verificamos a inibição da liberação de glutamato dependente de cálcio em sinaptosomas cérebro corticais de rato na presença da toxina PkTx23C3. Concluimos que tal toxina provavelmente atue inibindo canais de cálcio. No entanto a PkTx23C3 parece interagir alostericamente com estes canais de cálcio o que justificaria a ausência de efeito aditivo quando adicionadas conjuntamente às demais toxinas bloqueadoras.

Ao se comparar o sequenciamento da toxina PkTx23C3 com as toxinas da família Tx3 verificamos grande similaridade entre os aminoácidos. Ambas possuem o mesmo número de resíduos de cisteína posicionados em locais

5.2 Análise do sequenciamento da toxina PnTx19C1 e seu efeito na liberação de glutamato.

Em nosso trabalho, verificamos que a toxina PnTx19C1 não apresentou efeito significativo na inibição da liberação de glutamato evocada por KCl 33mM quando utilizada até a concentração de 12 μ M. A toxina PnTx19C1 apresenta sequenciamento não completamente determinado (dados ainda não publicados), mas podemos verificar que a mesma apresenta grande similaridade quando comparada ao sequenciamento das toxinas da família Tx3 que, como citado anteriormente, possuem grande efeito na inibição de canais para cálcio. Verificamos, também, que dos aminoácidos que diferem entre as duas cadeias existe variação quanto à propriedade química. Ocorrem trocas entre aminoácidos de grupos diferentes, ou seja, aminoácidos com cadeia hidrofóbica, aminoácidos de cadeia carregada e aminoácidos polarizados (FIG. 11-B). Uma importante modificação na posição dos aminoácidos na cadeia ocorre no resíduo de alanina (posição 1 na PnTx3-6) que é substituído por uma glicina na PnTx19C1. Tais modificações podem ser as responsáveis pelas alterações das propriedades bioquímicas e farmacológicas de tal toxina, observados na figura 11.

Assim, podemos sugerir que a ausência de inibição da liberação de glutamato observada na presença da toxina PnTx19C1 pode ser explicada pela alteração da polarização da cadeia de aminoácidos, que provavelmente diminui a atividade da toxina pelo sítio de ligação do canal de cálcio estudado. Cabe ressaltar que outras alterações na cadeia de aminoácidos da toxina PnTx29C1 podem ser responsáveis pelas diferenças apresentadas. Tais modificações poderiam ser responsáveis pelos resultados obtidos e acreditamos que a determinação da estrutura completa da cadeia de aminoácidos de tal toxina é de fundamental importância para melhor análise dos resultados obtidos.

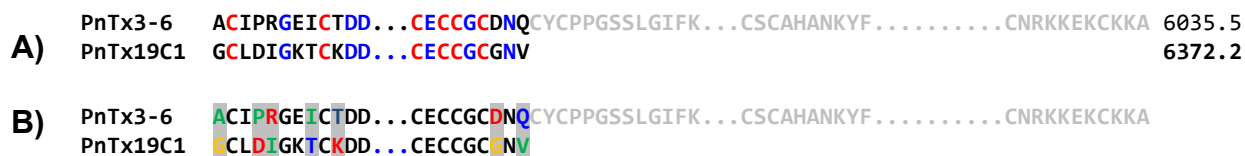


FIGURA 11 – Comparação do sequenciamento das toxinas PnTx19C1 e PnTx3-6. (A) As sequências foram alinhadas de acordo com os resíduos de cisteína representados em vermelho. Os aminoácidos em azul são os que apresentam semelhança no emparelhamento e os pretos os que diferem entre as duas cadeias. (B) Representação esquemática da troca dos aminoácidos de diferentes grupos. Os aminoácidos que foram destacados apresentam diferença quanto às suas propriedades químicas. Em verde os aminoácidos hidrofóbicos, em vermelho os com carga, em azul os polares e em amarelo o aminoácido glicina. O restante da cadeia foi colocado em cinza para facilitar a visualização.

FONTE: Adaptado de RICHARDSON *et al.*, 2006.

5.3 Análise do sequenciamento das toxinas PkTx28C4 e PnTx25A1 e seu efeito na liberação de glutamato.

Estudos recentes demonstraram que estes dois novos peptídeos purificados do veneno das aranhas *P. keyserlingi* e *P. nigriventer* possuem grande toxicidade quando injetados na cavidade torácica de camundongos e mosca doméstica (RICHARDSON *et al.*, 2006). No entanto, em nosso trabalho, tais peptídeos não alteraram a dinâmica de liberação de glutamato. Tais peptídeos apresentam 43-51% de homologia quando comparado às toxinas da família Tx2 principalmente com a toxina PnTx2-1 (RICHARDSON *et al.*, 2006) (FIG. 12). Sabe-se que as toxinas da família PnTx2 atuam aumentando a ativação de canais de sódio (ARAUJO *et al.*, 1993; MATAVEL *et al.*, 2002; YONAMINE; TRONCONE; CAMILLO, 2004; RICHARDSON *et al.*, 2006) e aumentam o influxo de sódio em sinaptosomas cérebro corticais induzindo despolarização da membrana, influxo de cálcio e liberação de glutamato de maneira sensível à TTX (ROMANO-SILVA *et al.*, 1993).

Verificamos que nos aminoácidos que diferem entre as três cadeias existe diferença quanto às propriedades químicas. A principal alteração na cadeia de aminoácidos ocorre pela presença do aminoácido lisina como o primeiro aminoácido na cadeia das toxinas PnTx25A1 e PkTx28C4 e ausência do mesmo como primeiro aminoácido da cadeia da toxina PnTx2-1. Sabe-se que pequenas modificações nas porções iniciais e terminais da cadeia de aminoácidos podem levar a grandes

modificações em sua estrutura conformacional ou afinidade por determinados receptores. Cabe ressaltar que a atividade de tais toxinas pode ser alterada por variantes naturais como diferença de gênero e idade dentre os animais dos quais os peptídeos foram obtidos. Acreditamos que tais variações podem ser responsáveis pelos resultados observados e que a determinação da sequência completa da cadeia aminoácidos de tais toxinas é de fundamental importância para análise comparativa e melhor compreensão dos resultados obtidos.

			MS
A)	PnTx2-1	ATCAGQDKPCKET...CDCCGERGECVCALSYEGKYR...CICRQGNFLIAWHKLAS..CK	5838.8
	PkTx28C4	KAKCADIDQPCKTS...CDCCETKGAICTCYKSG.....CVCRMGSFT?AT.....CKK-	5001.0
	PnTX25A1	KAKCADIDQPCKTS...CDCCETTGAICTCYKSG-----	4989.0
B)	PnTx2-1	ATCAGQDKPCKET...CDCCGERGECVCALSYEGKYR...CICRQGNFLIAWHKLAS..CK	
	PkTx28C4	KAKCADIDQPCKTS...CDCCETKGAICTCYKSG.....CVCRMGSFT?AT.....CKK-	
	PnTX25A1	KAKCADIDQPCKTS...CDCCETTGAICTCYKSG-----	

FIGURA 12 – Comparação do sequenciamento das toxinas PnTx2-1, PkTx28C4 e PnTx25A1. (A) As sequências foram alinhadas de acordo com os resíduos de cisteína representados em vermelho. Os aminoácidos em azul representam os aminoácidos semelhantes e os em pretos os que diferem entre as três cadeias. (B) Representação esquemática da troca dos aminoácidos de diferentes grupos. Os aminoácidos que foram destacados apresentam diferença quanto às suas propriedades químicas. Em verde os aminoácidos hidrofóbicos, em vermelho os com carga, em azul os polares e em amarelo o aminoácido glicina.

FONTE: Adaptado de RICHARDSON *et al.*, 2006.

5.4 Análise comparativa do sequenciamento da toxina PkTx20C4 e seu efeito na liberação de glutamato dependente de cálcio.

O estudo comparativo do sequenciamento da toxina PkTx20C4 demonstrou que esta apresenta grande similaridade com toxinas da família Tx3 particularmente com a toxina Tx3-3 (ARAUJO *et al.*, 1993; MATAVEL *et al.*, 2002; YONAMINE; TRONCONE; CAMILLO, 2004; RICHARDSON *et al.*, 2006). Sabe-se que PnTx3-3 quando injetada em cérebro de camundongos na concentração de 5 µg provoca paralisia flácida e morte rápida entre 10 e 30 minutos. Vários trabalhos demonstraram que a toxina PnTx3-3 é um potente bloqueador de canais para cálcio (PRADO *et al.*, 1996; GUATIMOSIM *et al.*, 1997; MIRANDA *et al.*, 1998) bloqueando canais de cálcio P/Q e R (LEAO *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2001).

Em nosso trabalho, a toxina PkTx20C4 apresentou inibição de 52,4% na liberação de glutamato após despolarização com KCl quando utilizada na concentração de 3 µM (TABELA 1). No estudo sobre o efeito da mesma na inibição

do influxo de cálcio observamos que a toxina PkTx20C4 atua diminuindo a concentração de cálcio intracelular, provavelmente, pela inibição de canais para cálcio do tipo N (FIG. 9). Apesar de apresentar grande similaridade com a PnTx3-3 verificamos que ambas apresentam significativa diferença quanto ao bloqueio de canais para cálcio. Tal diferença pode ser explicada pela alteração de alguns aminoácidos que possuem diferentes propriedades químicas (FIG. 13). Outro ponto importante seria a alteração do primeiro aminoácido da cadeia uma glicina na PnTx3-3 por uma lisina e uma glicina na PkTx20C4. Tais mudanças poderiam alterar a polarização da cadeia de tal toxina ou provocar mudanças em seus sítios de ligação próximos à cadeia terminal diminuindo sua afinidade pelos canais para cálcio do tipo P/Q e R e aumentando sua afinidade para canais do tipo N. No entanto, a determinação completa da cadeia de aminoácidos é de fundamental importância para a análise comparativa das toxinas estudadas, podendo nos fornecer informações adicionais para compreensão das diferenças observadas.

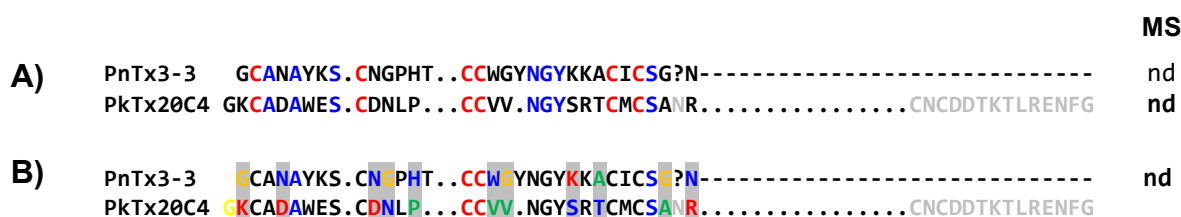


FIGURA 13 – Comparação do sequenciamento das toxinas PnTx3-3 e PkTx20C4. (A) As sequências foram alinhadas de acordo com os resíduos de cisteína representados em vermelho. Os aminoácidos em azul são os que apresentam semelhança no emparelhamento e os pretos os que diferem entre as duas cadeias. (B) Representação esquemática da troca dos aminoácidos de diferentes grupos. Os aminoácidos que foram destacados apresentam diferença quanto às suas propriedades químicas. Em verde os aminoácidos hidrofóbicos, em vermelho os com carga, em azul os polares e em amarelo o aminoácido glicina. O restante da cadeia foi colocado em cinza para facilitar a visualização.

FONTE: Adaptado de RICHARDSON *et al.*, 2006.

5.5 Análise comparativa do sequenciamento da toxina PnTx37C2 e seu efeito na liberação de glutamato dependente de cálcio.

Analisando o sequenciamento da toxina PnTx37C2 (dados ainda não publicados) verificamos grande similaridade com as toxinas da família Tx3 em especial a PnTx3-6 (FIG. 14-A). Conforme citado anteriormente, a toxina PnTx3-6 atua principalmente em canais para cálcio do tipo N (VIEIRA *et al.*, 2005).

Em nosso trabalho, não verificamos inibição da liberação de glutamato em sinaptossomas cérebro corticais de rato na presença da toxina PnTx37C2. Ao se comparar o sequenciamento da toxina PnTx37C2 com a toxina PnTx3-6 verificamos grande similaridade entre os aminoácidos. Ambas possuem o mesmo número de resíduos de cisteína posicionados em locais semelhantes na cadeia de aminoácidos e homologia de, aproximadamente, 45% quando comparado o restante da cadeia de aminoácidos (FIG. 14-A). Verificamos que nos aminoácidos que diferem entre as duas cadeias existe uma diferença quanto à propriedade química dos mesmos (FIG. 14-B). Observamos, também, que a toxina PrTx34C2 purificada do veneno da aranha *Phoneutria reidy* (RICHARDSON *et al.*, 2006) apresenta grande similaridade com a PnTx37C2 diferindo apenas por um aminoácido em toda sua cadeia (FIG.14-A).

Outro ponto importante seria a alteração do primeiro aminoácido (uma alanina na PnTx3-6 por uma glicina na PnTx37C2) e nos últimos aminoácidos da cadeia. Tais mudanças poderiam alterar a polarização ou provocar mudanças em sítios de ligação próximos à cadeia terminal diminuindo sua afinidade pelos canais para cálcio o que justificaria os efeitos observados em nossos experimentos. Cabe ressaltar que, como já citado anteriormente, a atividade de tais toxinas pode ser alterada por variantes naturais como diferença de gênero e idade dentre os animais dos quais os peptídeos foram obtidos. Sendo assim tais variáveis, assim como modificações na estrutura conformacional de tal toxina, poderiam explicar os resultados obtidos em nossos experimentos.

			MS
A)	PnTx3-6	ACIPRGEICTDD...CECCGCDNQCYCPPGSSSLGIFK...CSCAHANKYF.....CNRKKEKCKKA	6035.5
	PnTx37C2	GCLDIGKTCRDD...CECCGCGNVCYCPFDWFGGKQWQPFGCSCAYGLKYV.....CAHKQKCCPNV	6370.0
	PrTx34C2	GCLDIGKTCRDD...CECCGCGNVCYCPFDWFGGKQWQPFGCSCAYGLKYV.....CAHKQKCCPNV	6330.9
B)	PnTx3-6	ACIPRGEICTDD...CECCGCDNQCYCPPSSSLGIFK...CSCAHANKYF.....CNRKKEKCKKA	
	PnTx37C2	GCLDIGKTCRDD...CECCGCGNVCYCPFDWFGKQWQPFGCSCAYGLKYV.....CAHKQKCCPNV	

FIGURA 14 – Comparação do sequenciamento das toxinas PnTx3-6, PkTx37C2 e PrTx34C2. (A) As sequências foram alinhadas de acordo com os resíduos de cisteína representados em vermelho. Os aminoácidos em azul representam os aminoácidos semelhantes e os em pretos os que diferem entre as duas cadeias. Observar que as toxinas PkTx37C2 e PrTx34C2 apresentam apenas 1(um) aminoácido diferente entre as cadeias (B) Representação esquemática da troca dos aminoácidos de diferentes grupos. Os aminoácidos que foram destacados apresentam diferença quanto às suas propriedades químicas. Em verde os aminoácidos hidrofóbicos, em vermelho os com carga, em azul os polares e em amarelo o aminoácido glicina.

FONTE: Adaptado de RICHARDSON *et al.*, 2006.

5.6 **Análise comparativa do sequenciamento da toxina PnTx19C2 e seu efeito na liberação de glutamato dependente de cálcio.**

Analisando o sequenciamento da toxina PnTx19C2 (dados ainda não publicados) verificamos grande similaridade com as toxinas da família Tx3 em especial a PnTx3-4 (FIG.15-A). Sabe-se que PnTx3-4 é um potente bloqueador de canais para cálcio bloqueando correntes de cálcio P/Q (CASTRO JÚNIOR, *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 1999).

Em nosso trabalho, não verificamos inibição da liberação de glutamato em sinaptossomas cérebro corticais de rato na presença da toxina PnTx19C2. Ao se comparar o sequenciamento da toxina PnTx37C2 verificamos que, dos aminoácidos conhecidos para a cadeia da toxina testada, não observamos nenhuma alteração quando comparada à PnTx3-4. No entanto, o restante da cadeia permanece desconhecida o que impossibilita o levantamento de hipóteses que justifiquem as alterações observadas. Acreditamos que, assim como citado anteriormente para as demais toxinas, a determinação completa da cadeia de aminoácidos é de fundamental importância para a análise comparativa das toxinas estudadas, podendo nos fornecer informações adicionais para compreensão das diferenças observadas.

A) PNTx3-4 SCINVGDFCDGKKDDCECCRDNAFCSCSVIFGYKTNCRCEVGTATSYGICMAKHKCGRQTCTKPCLSKRCKKNHG
 PNTx19C2 SCINVGDFCDGKKDDCECCRDN

FIGURA 15 – *Comparação do sequenciamento das toxinas PnTx3-4 e PnTx19C2.* (A) As seqüências foram alinhadas de acordo com os resíduos de cisteína representados em vermelho. Os aminoácidos em azul são os que apresentam semelhança no emparelhamento.

FONTE: Adaptado de RICHARDSON *et al.*, 2006.

5.7 Análise do efeito da toxina PnTx3-2.

Toxinas similares à PnTx3-2 foram purificadas dos venenos das três espécies de aranhas do gênero *Phoneutria*. Depois de injetadas em camundongos tais toxinas produzem paralisia flácida após 5-6 horas (REZENDE JUNIOR *et al.*, 1991). Estudos eletrofisiológicos (KALAPOTHAKIS *et al.*, 1998) demonstraram que a toxina PnTx3-2 provoca progressiva diminuição em correntes de cálcio do tipo L em células GH₃.

Em nosso trabalho, verificamos que a toxina PnTx3-2 inibe a liberação de glutamato quando utilizada na concentração de 3μM. Tal inibição se dá principalmente pela via dependente de cálcio. Infelizmente, não conseguimos caracterizar através de qual mecanismo se dá tal inibição. As altas concentrações necessárias da toxina nos impediram de utilizar alíquotas semelhantes para os vários experimentos o que aumentou muito a variabilidade do mesmo, impossibilitando resultados conclusivos. Desta forma, podemos concluir que a toxina PnTx3-2 atua inibindo a liberação de glutamato pela via dependente de canais para cálcio. Mas não podemos afirmar, devido aos resultados inconclusivos, através de quais canais o bloqueio ocorreu.

6 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- A toxina PkTx23C3 atua inibindo a liberação de glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato através da via dependente de cálcio, provavelmente, através da inibição de canais de cálcio do tipo N ou P;
- A toxina PkTx20C4 atua inibindo a liberação de glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato através da via dependente de cálcio, possivelmente, através da inibição de canais de cálcio do tipo N;
- A toxina PnTx3-2 atua inibindo a liberação de glutamato em sinaptosomas cérebro corticais de rato através da via dependente de cálcio.

REFERÊNCIAS

AHLIJANIAN, M.K.; WESTENBROEK, R.E.; CATTERALL, W.A. Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord, and retina. *Neuron.*, v. 4, n. 6, p. 819-832, Jun. 1990.

ARAÚJO, D.A. *et al.* Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* v. 347, n. 2, p. 205-208, Feb. 1993.

BAJJALIEH, S.M.; SCHELLER, R.H. The biochemistry of neurotransmitter secretion. *J Biol Chem.* v. 270, n. 5, p. 1971-1974, Feb. 1995.

BARKER, L.A.; DOWDALL, M.J.; WHITTAKER, V.P. Choline metabolism in the cerebral cortex of guinea pigs. Stable-bound acetylcholine. *Biochem J.* v. 130, n. 4, p. 1063-1075, Dec. 1972.

BEAN, B.P. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol.* v. 51, p. 367-384, Mar. 1989.

BERRIDGE, M.J. Neuronal calcium signaling. *Neuron*, v. 21, n. 1, p. 13-26, Jul. 1998.

LAFON-CAZAL, M. *et al.* mGluR7-like receptor and GABA(B) receptor activation enhance neurotoxic effects of N-methyl-D-aspartate in cultured mouse striatal GABAergic neurones. *Neuropharmacology.* v. 38, n. 10, p. 1631-40, Oct. 1999.

BROSE, N.; PETRENKO, A.G.; SÜDHOF, T.C.; JAHN, R. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, v. 256, n. 5059, p. 1021-1025, May. 1992.

CAMPOLINA, D.; FILHO, A.A.; DIAS, M.B. *Toxicologia na prática Clínica.* Belo Horizonte: Folium, 2001. 368 p.

CARAFOLI, E.; BRINI, M. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol.*, v. 4, n. 2, p. 152-161, Apr. 2000.

CARBONE, E.; LUX, H.D. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature*, v. 310, n. 5977, p. 501-502, Aug. 1984.

CASTRO JÚNIOR, C.J. *et al.* Tx3-4 a toxin from the venom of spider *Phoneutria nigriventer* blocks calcium channels associated with exocytosis. *Neurosci Lett.* v. 439, n. 2, p. 170-2, Jul. 2008.

CATTERALL, W.A. Calcium channel Regulation and presynaptic plasticity. *Neuron.*, v. 59, n. 6, p. 882-901, Sep. 2008.

CECCARELLI, B.; HURLBUT, W.P.; MAURO, A. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol.*, v. 57, n. 2, p. 499-524, May. 1973.

CHAPMAN, E.R. *et al.* Delineation of the oligomerization, AP-2 binding, and synprint binding region of the C2B domain of synaptotagmin. *J Biol Chem.*, v. 273, n. 49, p. 32966-32972, Dec. 1998.

CORDEIRO, Mdo. N. *et al.* The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *FEBS Lett.*, v. 310, n. 2, p. 153-156, Sep. 1992.

CORDEIRO, Mdo. N. *et al.* Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon.* v. 31, n. 1, p. 35-42, Jan. 1993.

CORZO, G. *et al.* A spider toxin that induces a typical effect of scorpion alpha-toxins but competes with beta-toxins on binding to insect sodium channels. *Biochemistry*, v. 44, n. 5, p. 1542-1549, Feb. 2005.

CURTIS, B.M.; CATTERALL, W.A. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry*, v. 23, n. 10, p. 2113-2118, May. 1984.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* v. 65, n. 1, p. 1-105, Sep. 2001.

DAVIS, A.F. *et al.* Kinetics of synaptotagmin responses to Ca²⁺ and assembly with the core SNARE complex onto membranes. *Neuron.*, v. 24, n. 2, p. 363-376, Oct. 1999.

DAVLETOV, B.; PERISIC, O.; WILLIAMS, R.L. Calcium-dependent membrane penetration is a hallmark of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2 whereas the C2A domain of synaptotagmin binds membranes electrostatically. *J Biol Chem.*, v. 273, n. 30, p. 19093-19096, Jul. 1998.

DINIZ, C.R. *et al.* The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Lett.*, v. 263, n. 2, p. 251-253, Apr. 1990.

DUNKLEY, P.R. *et al.* A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res.*, v. 372, n. 1, p. 115-129, Apr. 1986.

ECHEVARRIA, W. *et al.* Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol.*, v. 5, n. 5, p. 440-446, May. 2003.

ERTEL, E.A. *et al.* Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* v. 25, n. 3, p. 533-5, Mar. 2000.

ESCOUBAS P.; DIOCHOT S.; CORZO G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie.*, v.82, n. 9-10, p. 893-907, Sep-Oct. 2000.

FAGNI, L. *et al.* Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J Neurosci.* v. 20, n. 21, p. 7896-904, Nov. 2000.

FASSHAUER, D. *et al.* Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry*, v. 37, n. 29, p.10354-10362, Jul. 1998.

FIGUEIREDO, S.G. *et al.* Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon.*, v. 33, n. 1, p. 83-93, Jan. 1995.

FLOCKERZI, V.; OEKEN, H.J.; HOFMANN, F. Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur J Biochem.*, v. 161, n. 1, p. 217-224, Nov. 1986.

GOMEZ, M.V. *et al.* *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol.*, v. 22, n. 5, p. 579-588, Dec. 2002.

GOMEZ, R.S. *et al.* The effect of PhTx3 on the release of 3H-acetylcholine induced by tityustoxin and potassium in brain cortical slices and myenteric plexus. *Neuroscience letters.*, v. 196, n. 1-2, p. 131-133, Aug. 1995.

GUATIMOSIM, C. *et al.* A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Br J Pharmacol.*, v. 122, n. 3, p. 591-597, Oct. 1997.

HERCULANO-HOUSEL, S. Coordinated scaling of cortical and cerebellar numbers of neurons. *Front Neuroanat.* v. 10, p. 4-12, Mar. 2010.

HESS, D.T. *et al.* The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS. *J Neurosci.*, v. 12, n. 12, p. 4634-4641, Dec. 1992

HEUSER, J.E.; REESE, T.S. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol.*, v. 57, n. 2, p. 315-344, May. 1973.

HOSEY, M.M.; LAZDUNSKI, M. Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J Membr Biol.*, v. 104, n. 2 p. 81-105, Sep. 1988.

KALAPOTHAKIS, E. *et al.* Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (*Phoneutria nigriventer*). *Toxicon.*, v. 36, n. 12, p. 1971-1980, Dec. 1998.

KAMP, M.A. *et al.* Presynaptic 'Ca_v2.3-containing' E-type Ca channels share dual roles during neurotransmitter release. *Eur J Neurosci.*, v. 21, n. 6, p. 1617-1625, Mar. 2005.

KATZ, A.M.; REPKE, D.I. Control of myocardial contraction: the sensitivity of cardiac actomyosin to calcium ion. *Science.*, v. 152, n. 726, p. 1242-1243, May 1966.

KATZ, B. *The Release of neural Transmitter Substances.* Liverpool University Press, Liverpool, 1969.

KATZ, L. *et al.* Genetic and morphological analyses reveal a critical interaction between the C-termini of two SNARE proteins and a parallel four helical arrangement for the exocytic SNARE complex. *EMBO J.*, v. 17, n. 21, p. 6200-6209, Nov. 1998.

KOZLOV, S. *et al.* A novel strategy for the identification of toxinlike structures in spider venom. *Proteins.*, v. 59, n. 1, p. 131-140, Apr. 2005.

KUNIYASU, A. *et al.* Structural characterization of the dihydropyridine receptor-linked calcium channel from porcine heart. *J Biochem.*, v. 112, n. 2, p. 235-242, Aug. 1992.

KUSHMERICK, C. *et al.* Phoneutria nigriventer toxin Tx3-1 blocks A-type K⁺ currents controlling Ca²⁺ oscillation frequency in GH3 cells. *J Neurochem.*, v. 72, n. 4, p. 1472-1481, Apr. 1999.

LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.*, [Epub ahead of print]. Mar. 2010.

LEAO, R.M. *et al.* Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology*, v. 39, n.10, p. 1756-1767, Jul. 2000.

LLINAS, R. *et al.* Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci.*, v. 15, n. 9, p. 351-355, Sep. 1992.

LLINAS, R.R.; SUGIMORI, M.; CHERKSEY, B. Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann N Y Acad. Sci.*, v. 560, p. 103-111. 1989.

LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, v. 193, n. 1. p. 265-275, Nov. 1951.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. *Toxicon.*, v. 26, p. 759-772. 1988.

MADDEN, D. R. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci.* v. 3, n. 2, p. 91-101, 2002.

MARTIN-MOUTOT, N. *et al.* Properties of omega conotoxin MVIIIC receptors associated with alpha 1A calcium channel subunits in rat brain. *FEBS Lett.*, v. 366, n. 1, p. 21-25, Jun. 1995.

MARTIN-MOUTOT, N. *et al.* Interaction of SNARE complexes with P/Q-type calcium channels in rat cerebellar synaptosomes. *J Biol Chem.*, v. 271, n. 12, p. 6567-6570, Mar. 1996.

MARTIN-MOUTOT, N. *et al.* Phoneutria nigriventer toxin 1: a novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with micro conotoxin binding sites. *Mol Pharmacol.* v. 69, n. 6, p. 1931-7, Jun. 2006.

MATAVEL, A. *et al.* Electrophysiological characterization and molecular identification of the Phoneutria nigriventer peptide toxin PnTx2-6. *FEBS Lett.*, v.523, n. 1-3, p. 219-223, Jul. 2002.

MCENERY, M.W.; SNOWMAN, A.M.; SNYDER, S.H. Evidence for subtypes of the omega-conotoxin GVIA receptor. Identification of the properties intrinsic to the high-affinity receptor. *Ann N Y Acad Sci.*, v. 635, p. 435-437. 1991.

MEIR, A. *et al.* Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol rev.*, v. 79, n. 13, p. 1019-1088, Jul. 1999.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.*, v. 130, p. 1007S-1015S, 2000.

MIKOSHIBA, K. *et al.* Role of the C2A domain of synaptotagmin in transmitter release as determined by specific antibody injection into the squid giant synapse preterminal. *Proc Natl Acad Sci. USA*, v. 92, p. 10703-10707, 1995.

MINTZ, I.M. *et al.* P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Ag-IVA. *Nature*, v. 355, p. 827-829, 1992.

MIRANDA, D.M. *et al.* Phoneutria nigriventer toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes. *Neuroreport.*, v. 9, p. 1371-1373, 1998.

MIRANDA, D.M. *et al.* Spider neurotoxins block the beta scorpion toxin-induced calcium uptake in rat brain cortical synaptosomes. *Brain Res Bull.*, v. 54, p. 533-536, 2001.

NICHOLLS, D.G.; SIHRA, T.S.; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium-dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem.*, v. 49, p. 50-57, 1987.

NOVICK, P.; ZERIAL, M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol.* v. 9, p. 496-504, 1997.

NOWYCKY, M.C.; THOMAS, A.P. Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci.* v. 115, p. 3715-3716, 2002.

NOWYCKY, M.C.; FOX, A.P.; TSIEN, R.W. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, v. 316, p. 440-443, 1985.

OTTERSEN O.P., *et al.* Molecular organization of cerebellar glutamate synapses. *Prog Brain Res.* v. 114, p. 97-107, 1997.

PAREKH, A.B. Store-operated Ca^{2+} entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J Physiol.* v. 547, p. 333-348, 2003.

PONTING, C.P.; BENJAMIN, D.R. A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci.* v. 21, p. 422-425, 1996.

PRADO M.A., *et al.* 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.* v. 314 (Pt 1), p.145-150, 1996.

PUMPLIN, D.W.; REESE, T.S.; LLINAS, R. Are the presynaptic membrane particles the calcium channels?. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 78, p. 7210-7213, 1981.

RANDALL, A.; TSIEN, RW. Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci*, v. 15, p. 2995-3012, 1995.

RASH, L.D.; HODGSON, W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon.* v. 40, p. 225-254, 2002.

REUTER, H. The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. *J Physiol.* v. 192, p. 479-492, 1967.

REUTER, H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature.* v. 301, p. 569-574, 1983.

REUTER, H; BEELER, G.W. Jr. Calcium current and activation of contraction in ventricular myocardial fibers. *Science*. v. 163, p. 399-401, 1969.

REZENDE, JÚNIOR L.; *et al.* Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*. v. 29, p. 1225-1233, 1991.

RICHARDSON, M. *et al.* Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. v. 142, p. 173-187, 2006.

ROMANO-SILVA M.A., *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. *The Biochemical journal*, v. 296 (Pt 2), p. 313-319, 1993.

RYAN, T.A. A pre-synaptic to-do list for coupling exocytosis to endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, v. 18, p. 416-421, 2006.

SANCHEZ-PEREZ *et al.* Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. II. Signaling pathways and physiological modulators regulating NMDA receptor function. *Cerebellum*. v. 4, n. 3, p. 162-70, 2005.

SANTOS, R.G., *et al.* Binding sites and actions of Tx1, a neurotoxin from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, in guinea pig ileum. *Braz J Med Biol Res*, v. 32, p.1565-1569, 1999.

SCHIAVO, G.; OSBORNE, S.L.; SGOUROS, J.G. Synaptotagmins: more isoforms than functions?. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 248, p.1-8, 1998.

SLEPNEV, V.I.; DE CAMILLI, P. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci*, v. 1, p. 161-172, 2000.

SMITH, S.J.; AUGUSTINE, G.J. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci*, v. 11, p. 458-464, 1988.

SOLLNER, T.H. Regulated exocytosis and SNARE function (Review). *Mol Membr Biol*, v. 20, p. 209-220, 2003.

SOLLNER, T.H. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, v. 75, n. 3, p. 409-18, 1993.

SÜDHOF, T.C. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*. v. 27, p. 509-547, 2004.

SUTTON, R.B. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. v. 395, p. 347-353, 1998.

SUTTON, R.B. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell*. v. 80, p. 929-938, 1995.

TAKAHASHI, M. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 84, p. 5478-5482, 1987.

VIEIRA, L.B., *et al.* PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K⁺-evoked increase in [Ca²⁺]_i and Ca²⁺-dependent glutamate release in synaptosomes. *Neurochem Int*. v. 42, p. 277-282, 2003.

VIEIRA, L.B., *et al.* Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *J Pharmacol Exp Ther*. v. 314, p. 1370-1377, 2005.

WITCHER, D.R., *et al.* Purification and reconstitution of N-type calcium channel complex from rabbit brain. *Methods Enzymol*. v. 238, p. 335-348, 1994.

YONAMINE, C.M.; TRONCONE, L.R.; CAMILLO, M.A. Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal Phoneutria nigriventer spider toxin. *Toxicon*. v. 44, p. 169-172, 2004.

ZARAIN-HERZBERG *et al.* Cloning and characterization of the chick NMDA receptor subunit-1 gene. *Brain Res Mol Brain Res*. v. 137, n. 1-2, p. 235-51, 2005.

ZHANG, J.F. *et al.* Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology*, v. 32, p. 1075-1088, 1993.