

STEFANIA COTTA DONÉ

CINÉTICA DE INTERAÇÃO DA TOXINA TX1, DA
ARANHA *PHONEUTRIA NIGRIVENTER*, COM O
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATO.

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS
1999

Stefania Cotta Doné

Cinética de Interação da Toxina Tx1, da
aranha *Phoneutria Nigriventer*, com o
Sistema Nervoso Central de Rato.

Orientadora: Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia

Dissertação submetida ao Departamento
de Bioquímica e Imunologia do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências.

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte- Minas Gerais
1999



Instituto de Ciências Biológicas-UFMG
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE STEFANIA COTTA DONÉ. Aos trinta e um dias do mês de agosto de 1999 às 10:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado indicada pelo Colegiado do Curso em 26 de julho de 1999, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Cinética de Interação da Toxina Tx1, da Aranha *Phoneutria nigriventer*, com o Sistema Nervoso Central de Rato" requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Prof. Marcelo Porto Bemquerer da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; - Prof. Paulo Sérgio Lacerda Beirão da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; - Profa. Maria Elena de Lima Perez Garcia da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 31 de agosto de 1999.



Prof. Marcelo Porto Bemquerer-UFMG



Prof. Paulo Sérgio Lacerda Beirão-UFMG



Profa. Maria Elena de Lima Perez Garcia -UFMG
orientadora



Prof. Marcelo Santos
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica-Imunologia, ICB-UFMG,
em Exercício

Aos meus pais
Gladston & Maria Imaculada

“Everything on earth is in a continual flux - nothing stays constant or fixed. Our attachments to external things pass and change as things do. But there is one state where the soul finds a solid enough seat to rest and gather in all its being, with no need to recall the past or to press on to the future; a state where time is nothing, where the present lasts forever, with no mark of duration or trace of succession; a state where there is no feeling of deprivation or enjoyment, pleasure or pain, desire or fear - only that of our simple existence, which fills our soul entirely. As long as this state lasts the person in it can call themselves happy, not with an imperfect, impoverished and relative happiness but with an adequate, perfect and full happiness, which leaves in the soul no emptiness which it feels the need to fill.”

Rousseau

Agradeço...

- À prof. Maria Elena, pela orientação, carinho e acolhida
- Aos colegas do Laboratório: Adriano, Alessandra, Carla, Cinara, Flávia, Gleudnéia, Júlio, Luciano, Luciene, Malu, Raquel, Roberta, Rosângela e Zulema pelo carinho e apoio, e pelo excelente ambiente de trabalho.
- À Dra Marta do Nascimento Cordeiro e ao professor Carlos Diniz, pela ajuda nos momentos difíceis
- À Nelman, não só pela ajuda técnica, mas pelo “apoio moral” naquelas horas...
- Às amigas Ana Flávia e Sueley, pela disponibilidade, amizade e apoio
- A todos do Laboratório de Hipertensão Bioquímica, Depto de Fisiologia, pelo carinho e acolhida
- A todos do Laboratório de Físico-Química de Proteína e Enzimologia, em especial ao Prof. Marcelo Santoro pelo auxílio extraordinário nas horas difíceis.
- A todos do Laboratório de Membranas Excitáveis, não só pelo apoio científico mas também pelo apoio social...
- Ao departamento de Bioquímica e Imunologia, nas pessoas de Carlos Alberto Tavares, coordenador do Curso de Pós-Graduação e Celise, secretária do Curso, por tudo que fizeram e estão fazendo por nós
- A você, que por descuido não está nesta página , mas com toda certeza goza da minha mais profunda gratidão,

Muito obrigada por tudo.

Sumário

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	ix
<u>LISTA DE ABREVIACÕES</u>	x
<u>INTRODUÇÃO</u>	4
<u>1. AS ARANHAS</u>	4
1.1 ARANHAS DO GÊNERO <i>PHONEUTRIA</i>	4
<u>2. VENENOS E TOXINAS ANIMAIS</u>	4
2.1. TOXINAS ANIMAIS E A NEUROTRANSMISSÃO	4
<u>3. TOXINAS DE ARANHAS</u>	4
3.1 VENENO E TOXINAS DE <i>PHONEUTRIA</i>	4
<u>4. CONSIDERAÇÕES ACERCA DA INTERAÇÃO ENTRE LIGANTES E RECEPTORES.</u>	4
<u>OBJETIVOS</u>	4
<u>5. OBJETIVOS</u>	4
5.1 OBJETIVO GERAL	4
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4

MATERIAIS E MÉTODOS	4
6-MATERIAIS	4
6.1. DROGAS E REAGENTES	4
6.2. TOXINA	4
6.3. SOLUÇÕES PARA EXPERIMENTOS DE LIGAÇÃO	4
7-MÉTODOS	4
7.1. MARCAÇÃO DA TOXINA TX1 COM NA- ¹²⁵ I	4
7.2. PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS IODADOS DE ¹²⁵ I-TX1	4
7.2.1 CÁLCULO DA RADIOATIVIDADE ESPECÍFICA DO DERIVADO.	4
7.3. PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO SINAPTOSOMAL P ₂ DE CÓRTEX CEREBRAL DE RATO	4
7.4. EXPERIMENTOS DE LIGAÇÃO	4
7.4.1- TESTE DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE ¹²⁵ I- TX1	4
7.4.2- EXPERIMENTO DE ASSOCIAÇÃO	4
7.4.3- EXPERIMENTO DE DISSOCIAÇÃO	4
7.4.4- EXPERIMENTO DE SATURAÇÃO	4
7.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS	4
RESULTADOS	4
8. RESULTADOS	4
8.1. EXPERIMENTOS CINÉTICOS COM ¹²⁵ I-TX ₁	4
8.2 SEPARAÇÃO DOS DERIVADOS IODADOS RESULTANTES DA MARCAÇÃO DE TX ₁ .	4
8.3 EXPERIMENTOS CINÉTICOS COM ¹²⁵ I-D ₁	4
8.4 ESTUDOS DE EQUILÍBRIO COM ¹²⁵ I-D ₁	4
DISCUSSÃO	4
9. DISCUSSÃO	4
COLCLUSÕES	4
10. CONCLUSÕES	4

<u>APÊNDICE</u>	4
<u>11. ESTUDOS DIRETOS DE INTERAÇÃO ENTRE ACCEPTORES E LIGANTES.</u>	4
11.1. PROPRIEDADES CINÉTICAS	4
11.1.1 CINÉTICA DE ASSOCIAÇÃO	4
11.1.2. CINÉTICA DE DISSOCIAÇÃO	4
<u>11.2. PROPRIEDADES NO EQUILÍBRIO</u>	4
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	4
<u>12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	4

Lista de Figuras

	Página
<i>Figura 1- Representação esquemática da marcação de Tx₁ com Na-¹²⁵I.</i>	28
<i>Figura 2- Associação de ¹²⁵I-Tx₁ à preparação sinaptosomal de córtex cerebral de rato</i>	37
<i>Figura 3- Dissociação de ¹²⁵I-Tx₁ dos sítios aceptores na preparação de córtex cerebral de rato</i>	38
<i>Figura 4- Perfil da cromatografia de fase reversa (HPLC) de ¹²⁵I-Tx₁</i>	41
<i>Figura 5- Associação de ¹²⁵I-D₁ à preparação sinaptosomal de córtex cerebral de rato.</i>	42
<i>Figura 6- Dissociação de ¹²⁵I-D₁ de preparação sinaptosomal de córtex cerebral de rato.</i>	44
<i>Figura 7- Curva de saturação de ¹²⁵I-D₁ em fração sinaptosomal de córtex cerebral de rato.</i>	45
<i>Figura 8- Sequência de aminoácidos da toxina Tx₁</i>	51

Lista de Abreviações

ω -Aga IVA- ω -agatoxina IVA

4-AP- 4-aminopiridina

BSA- Albumina de Soro Bovino

ChTx- Caribdotoxina

ω -CgTx GVIA- ω -conotoxina GVIA

cpm- contagem por minuto

$^{125}\text{I-D}_1$ - Derivado 1 de $^{125}\text{I-Tx}_1$

α -DTx- α -dendrotoxina

FPLC- Fast Performance Liquid Chromatography

HEPES- Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico

HPLC- High Performance Liquid Chromatography

KTx- Kaliotoxina

NMDA- *N-metil-D-aspartato*

PbTx-2- Brevetoinina -2

TEA- Tetraetilamônio

TsTx- Tityustoxina

Ts VII- Toxina VII de *Tityus serrulatus*

TTx- Tetrodotoxina

Tx₁- Toxina 1 da aranha *Phoneutria nigriventer*

$^{125}\text{I-Tx}_1$ - Toxina Tx₁ iodada

INTRODUÇÃO

1. As Aranhas

As aranhas são animais pertencentes ao filo Arthropoda, sub-filo Chelicerata, classe Arachnida. Os aracnídeos constituem a classe mais ampla e mais importante dentro dos quelicerados. Além das aranhas, esta classe inclui exemplares familiares como os ácaros e os escorpiões. A classe Arachnida compreende 11 ordens, dentre as quais destacamos a ordem Araneae, que é mais ampla dos aracnídeos, com aproximadamente 32 mil espécies descritas (Barnes, 1990).

As aranhas são encontradas na Terra desde as mais remotas eras geológicas, como indicado pelos fósseis desses animais datados do período Siluriano (Bucherel, 1980).

Devido a uma excepcional capacidade de adaptação, os aracnídeos podem habitar quase todos os ambientes, inclusive o aquático. As aranhas são importantes para a manutenção do ecossistema.

As aranhas variam de tamanho podendo ir desde espécies minúsculas com menos de 0,5 cm de comprimento até as chamadas aranhas gigantes com mais de 10 cm. As aranhas são carnívoras, alimentam-se de outros artrópodes, de crustáceos, de anelídeos. As espécies maiores podem alimentar-se de pequenos vertebrados como lagartixas e filhotes de camundongos. A presa pode ser capturada ativamente, como fazem as aranhas caçadoras, ou passivamente através das teias, uma rede de fios de seda viscosos. As aranhas picam as presas com as quelíceras que, além de inocular o veneno, podem ser usadas também para sugar e macerar o alimento (Barnes, 1990).

Poucas espécies de aranhas apresentam venenos ativos no homem e acidentes mortais são raros. No Brasil, as aranhas causadoras dos mais sérios acidentes pertencem aos gêneros, *Loxosceles*, *Latrodectus* e *Phoneutria*. As aranhas do gênero *Lycosa* são citadas não pela seriedade dos acidentes, mas pela frequência de ocorrência.

As aranhas do gênero *Loxosceles* são pequenas, menores que 1 cm, podendo chegar a 3 cm com o comprimento das patas. Possuem 6 olhos dispostos em 3 pares. São de hábitos noturnos. Constroem teias irregulares em locais escuros. São conhecidas popularmente como “aranhas-marrons”.

As aranhas *Loxosceles* não são agressivas, picando apenas quando pressionadas ao corpo da vítima. Acidentes causados por estas aranhas são considerados os mais graves, devido a ação neurotóxica, proteolítica, hemolítica e coagulante do veneno. A picada passa despercebida à vítima. Os primeiros sintomas aparecem após 24 horas. A sintomatologia inclui: edemas, eritema localizado e indisposição, podendo haver necrose e ulceração no local da picada. Os casos mais graves levam à anemia e à insuficiência renal aguda. Se não tratada a tempo, a vítima pode vir a falecer (Lucas, 1988).

As aranhas do gênero *Latrodectus*, também conhecidas como “viúvas-negras”, são caracterizadas pelo abdômen “redondo”, globoso. Os pelos são vermelhos com manchas negras, exibindo no ventre uma marca em forma de ampulheta. As fêmeas são bem maiores que os machos e constroem teias irregulares. Os machos não constroem teias, aproveitando-se das construídas pelas fêmeas. Não são agressivas e escondem-se quando perturbadas. Picam apenas quando pressionadas ao corpo da vítima. Os acidentes são descritos em todos os continentes. O envenenamento por aranhas do gênero *Latrodectus* é grave e é caracterizado por forte ação neurotóxica (Lucas, 1988).

As aranhas do gênero *Lycosa* são conhecidas como tarântulas ou “aranhas-lobo”. O corpo das fêmeas adultas alcança um tamanho de até 2 centímetros, chegando a 5 centímetros com o comprimento das patas. Não são consideradas perigosas e os acidentes com aranhas deste gênero são raros e não possuem grandes repercussões clínicas. Muitos dos acidentes atribuídos às *Lycosa* são, na verdade, causados por aranhas do gênero *Loxosceles*.

O veneno desta aranha possui ação neurotóxica e o envenenamento é caracterizado por dor local discreta, com possível ocorrência de edema e eritema leves. Em casos mais graves pode-se observar necrose da pele (Lucas, 1988).

1.1 Aranhas do gênero *Phoneutria*

As aranhas do gênero *Phoneutria* são popularmente conhecidas como “aranhas-de-bananeira” ou “aranhas-armadeiras”. Pertencem à sub-ordem Labidognatha, à família Ctenidae e à sub-família Phoneutriinae.

O gênero *Phoneutria* foi primeiramente descrito por Perty em 1831. As espécies foram incluídas no gênero *Ctenus* por vários anos, até que foi reintegrada ao gênero original por Mello-Leitão em 1936 (Mello Leitão, 1936).

As aranhas pertencentes a este gênero são sul-americanas e a densidade da população é variável dentre os países desta região. No Brasil, são encontradas ao longo da costa, desde Santa Catarina até o Espírito Santo, sendo mais frequentemente encontradas em São Paulo.

São caracterizadas pela disposição dos 8 olhos em 3 fileiras: a primeira e a última com 2 olhos e a fileira do meio com 4 olhos. O tamanho do corpo pode chegar a 3 cm, podendo alcançar 15 cm com o tamanho das pernas,. A fêmea é mais agressiva que o macho e é encontrada com maior frequência.

Apresentam ao longo do corpo pêlos curtos e aderentes de cor marrom ou cinza. As fêmeas apresentam abdômen preto enquanto os machos apresentam tal parte alaranjada. As fêmeas apresentam uma mancha negra no ventre.

As aranhas do gênero *Phoneutria* são de hábitos crepusculares ou noturnos, solitárias, errantes e vivem em ambientes escuros como buracos no chão, debaixo de folhas, no tronco e cachos de bananeiras, raramente saindo à luz do dia. Não constroem teias; são extremamente agressivas, atacando ativamente a presa para se alimentar, ou quando se sentem ameaçadas. Dominam a presa com o “poder” do seu veneno. As aranhas desse gênero são responsáveis pelo segundo maior número de acidentes com aracnídeos no Brasil, sendo menos comum que os ocorridos com espécies do gênero *Loxosceles* (Lucas, 1988).

2. Venenos e Toxinas Animais

Todos os organismos possuem um sistema de sinalização química que é capaz de enviar e receber sinais. O resultado desse sistema é uma rede de comunicação fundamental para a vida. Animais produzem um grande número de substâncias que apresentam ações: tóxicas, com o objetivo de se alimentarem, como meio de defesa, para associarem com simbioses, para atração e seleção sexual, organização em colônias, dentre outras funções (Eisner & Mainwald, 1995).

A química destas substâncias é tão variada quanto seu espectro de ação. Essa diversidade química é uma das causas do sucesso alcançado por alguns grupos de animais, na colonização dos diversos ambientes. Os artrópodes são, sem dúvida, um dos grupos mais beneficiados dessa diversidade química. Os insetos produzem substâncias químicas para os mais diversos fins, como por exemplo, feromônios e repelentes. Os compostos produzidos pelos insetos são, na maioria dos casos, simples como fenóis, aldeídos, ácidos alifáticos e quinonas. Porém tem-se descoberto compostos bem mais complexos, como esteróides, pironas e alcalóides. Não se sabe ainda como tais compostos são produzidos, pois os insetos, usualmente, não possuem a maquinaria necessária para tal. Além de compostos para a defesa, os animais também produzem substâncias usadas como “armas” ofensivas, que são usadas para imobilizar e matar o agressor. Tais venenos são misturas complexas de substâncias tais como: poliaminas, aminas biogênicas (serotonina, histamina, etc.), polipeptídeos e proteínas complexas (Meinwald & Eisner, 1995).

Além dos artrópodes, quase todos os outros filos animais existentes (vertebrados e invertebrados) produzem peçonhas contendo componentes tóxicos. O avanço de técnicas de análise tornou possível a separação e o estudo detalhado dos componentes dos venenos animais. Muitas das toxinas purificadas a partir de peçonha de animais têm sido adaptadas e estudadas para serem utilizadas na terapêutica, no diagnóstico e como agentes inseticidas. Além disso é grande o interesse no estudo de toxinas animais que podem ser utilizadas como ferramentas de estudos farmacológicos e bioquímicos .

2.1. Toxinas Animais e a Neurotransmissão

Dentro do organismo vivo, as células são capazes de se comunicar. A interação entre elas se dá por meio de íons, ou substâncias químicas que são transmitidas de uma célula a outra através das membranas celulares, ou do meio externo para dentro da própria célula. Isso é possível porque nas membranas celulares são encontradas proteínas que possibilitam a passagem dos sinais e os transmitem adiante.

A sinalização elétrica envolve o movimento de íons através da membrana celular. Por ser a membrana impermeável aos íons, faz-se necessário um sistema de transporte eficiente. Os canais iônicos são proteínas grandes que formam poros nas membranas de todos os tipos celulares e permitem a passagem dos íons através da mesma. São peças fundamentais na neurotransmissão. Há diversos tipos de canais iônicos “atuando” de forma “coordenada” de modo a regular e modular os sinais e as respostas do sistema nervoso. Os canais iônicos são responsáveis pela manutenção do potencial de repouso da membrana, modulação dos sinais elétricos, controle do fluxo de íons cálcio, os quais funcionam como mensageiros, controle do volume celular, controle do fluxo de cargas responsáveis por processos secretórios e outros processos. Os canais são seletivos a determinadas espécies iônicas, existindo canais para cada tipo de íon importante na transmissão (Hille, 1992).

Os sinais químicos são transmitidos através das membranas celulares com o auxílio de um outro grupo de proteínas transmembrana, denominadas receptores. Estes receptores são proteínas grandes e respondem aos sinais gerados pela interação com um neurotransmissor. Existem vários tipos de receptores, para os vários tipos de neurotransmissores. Os receptores são agrupados de acordo com o tipo de resposta originadas dos diversos estímulos.

Toxinas animais são consideradas ferramentas importantes no estudo dos sistemas de neurotransmissão tanto em vertebrados quanto em invertebrados, pois interagem com os canais iônicos ou com os receptores, modificando a resposta induzida pelos mesmos e alterando a comunicação entre as células.

As neurotoxinas, em geral, têm ação altamente específica e são, dessa forma, meios efetivos para identificação e caracterização de componentes importantes na neurotransmissão central e periférica. Por causa dessa especificidade, várias toxinas são capazes de distinguir entre os diversos sub-tipos de receptores e de canais iônicos e, mais ainda, são capazes de distinguir também diferentes sítios de ligação em uma mesma molécula, corroborando então o excelente emprego das mesmas como ferramentas no estudo da maquinaria de transmissão sináptica. Como exemplo pode-se citar a tetrodotoxina, peça importante na purificação e caracterização de canais de sódio de cérebro de rato (Hartshorne & Catteral, 1984). Outro exemplo é a α -bungarotoxina, que juntamente com a cobratoxina, foi importante em estudos detalhados do receptor nicotínico de acetilcolina (Kemp e colaboradores, 1980).

3. Toxinas de Aranhas

A peçonha das aranhas constitui-se de uma mistura de enzimas, sais orgânicos, poliaminas, amins biogênicas, aminoácidos e peptídeos (Atkinson & Wright, 1992).

Dentre as enzimas encontradas estão hialuronidases, esterases, proteases, collagenases, fosfatase alcalina, isomerases e enzimas com ação lipolítica. Também foram encontradas amins biogênicas como serotonina, histamina e tiramina, assim como GABA, glutamato, aspartato e asparagina. Ácido cítrico foi também encontrado em glândulas veneníferas, sugerido como inibidor de fosfolipases presentes no veneno (Schulz, 1997).

As poliaminas são toxinas de baixo peso molecular (< 1000) encontradas na peçonha de aranhas e de vespas. Possuem estruturas homólogas formadas por uma cadeia alifática aminada (poliamina), e um grupo cromóforo (geralmente indol ou fenol). Algumas delas contêm um ou mais resíduos de aminoácidos. As poliaminas agem como potentes antagonistas não-competitivos de receptores ionotrópicos de L-glutamato, do tipo NMDA e não-NMDA, tanto em terminações periféricas de artrópodes como em neurônios piramidais de hipocampo de mamíferos. Também bloqueiam certos tipos de canais de cálcio e receptores nicotínicos da acetilcolina. Além da ação pos-sináptica, podem agir pré-sinápticamente, aumentando ou inibindo a captação de glutamato em terminações nervosas de artrópodes (Schulz, 1997; Jackson & Usherwood, 1988; Blasgborough, 1994).

Os componentes majoritários do veneno de aranhas, no entanto, são de natureza protéica, não-enzimática. Podem ser proteínas de alto peso molecular até moléculas bem pequenas, constituídas de uns poucos resíduos de aminoácidos, os peptídeos, que são os componentes mais estudados.

Uma das toxinas de aranha mais caracterizada é a α -latrotoxina. Esta proteína de peso molecular de 130000 foi purificada a partir do veneno da aranha do gênero *Latrodectus*. A α -latrotoxina induz liberação maciça de neurotransmissores em presença ou ausência de cálcio (Rosenthal, 1989; Rosenthal, 1990).

A α -latrotoxina interage com duas proteínas integrais de membrana, uma das quais é uma neurexina- a Neurexina I α - que liga a toxina de modo dependente de cálcio, e a outra é denominada Latrofilina, que liga a toxina de modo independente de cálcio (Missler, 1998). Além da α -latrotoxina, foram encontradas na mesma peçonha outras toxinas ativas em insetos e crustáceos (Grishin, 1998).

Os venenos de certas aranhas também apresentam toxinas que se ligam aos canais iônicos. Podem-se citar como exemplos as ω -agatoxinas do veneno da aranha *Agelenopsis aperta* (Adams e colaboradores, 1990), a hololenatoxina, da aranha *Hololena curta* (Bowers e colaboradores, 1987) e PLTx II, da aranha *Plectreurys tristis* (Branton, 1987, Adams, 1994) que apresentam ação específica sobre canais de cálcio. As μ -agatoxinas, também da aranha *Agelenopsis aperta* (Adams e colaboradores, 1989), e as curtatoxinas, peptídeos purificados a partir da peçonha da aranha *Hololena curta* são ligantes de canais de sódio em insetos (Stapleton, 1990).

3.1 Veneno e Toxinas de *Phoneutria*

O envenenamento por aranhas do gênero *Phoneutria* foi descrito primeiramente por Brazil & Vellard em 1925. Os efeitos causados pelo veneno, quando testado em animais, foram principalmente neurotóxicos e incluem agitação violenta, salivação abundante, paralisia, convulsões, tremores musculares, sialorréia, dispnéia, priapismo podendo levar à morte do animal.

Barrio, em 1955, por meio de eletroforese em papel, separou o extrato obtido de glândulas veneníferas de *Phoneutria fera* em duas frações: uma com migração para o polo positivo e a outra para o polo negativo. Entretanto, o veneno extraído por estimulação elétrica apresentou apenas uma fração, que migrou para o polo negativo. Este autor também demonstrou que a ação do veneno da aranha *Phoneutria fera* em músculo esquelético apresenta duas fases: a primeira, caracterizada por espasmos musculares e fibrilações em contrações polifásicas e pequenos relaxamentos e a segunda fase, caracterizada por paralisia e asfixia. Os efeitos foram reproduzidos apenas pelas frações que migravam para o polo negativo.

Diniz, em 1963, mostrou que o veneno de *Phoneutria fera* é uma mistura complexa de substâncias. A separação do mesmo, por cromatografia em papel, revelou que uma das frações obtidas podia reproduzir o efeito tóxico do veneno bruto. Foi também verificado que a capacidade contráctil induzida pelo veneno era devido à presença de serotonina, histamina e de duas substâncias de natureza protéica.

Schenberg & Pereira Lima (1966, 1971, 1976) isolaram e caracterizaram frações ativas do veneno de *Phoneutria fera* e *Phoneutria nigriventer* e demonstraram a presença de aproximadamente 14 substâncias protéicas, farmacologicamente ativas, com massas moleculares variando entre 5000 e 7000 Da.

Através de cromatografias de filtração em gel e troca iônica, Entwistle e colaboradores (1982) isolaram, do veneno de *Phoneutria nigriventer*, um peptídeo com massas moleculares entre 5500 e 5900 Da, o qual induziu potenciais de ação espontâneos ao longo dos axônios da preparação neuromuscular de fêmur de gafanhoto.

Fontana & Vital Brazil (1985) e Vital Brazil (1987) estudaram o efeito do veneno de *Phoneutria nigriventer* em preparação de nervo frênico-diafragma de rato. Verificou-se uma despolarização não-uniforme da preparação e um aumento nos potenciais de placa em miniatura. Tais efeitos foram abolidos por tetrodotoxina, ou pela redução de sódio no meio experimental, indicando ação sobre os canais de sódio na membrana da preparação.

Estudos do efeito da peçonha de *Phoneutria nigriventer* em aurículas isoladas de cobaia demonstraram que as ações cronotrópicas e inotrópicas positivas e negativas, observadas após a administração do veneno na preparação eram devido à liberação de acetilcolina e norepinefrina das terminações nervosas autônomas das aurículas, levando-se em consideração que tais efeitos eram abolidos pela administração de antagonistas colinérgicos e adrenérgicos. A tetrodotoxina também aboliu os efeitos cronotrópicos e inotrópicos positivos e negativos, o que sugeriu a ação da peçonha em canais de sódio da preparação (Vital Brazil e colaboradores, 1988).

Rezende Jr. e colaboradores (1991) descreveram uma metodologia combinando cromatografia de filtração molecular convencional com cromatografias de fase reversa em sistemas de alta resolução (FPLC; Fast Performance Liquid Chromatography, Pharmacia, Sweden) que separou o veneno de *Phoneutria nigriventer* em quatro frações (PhTx1, PhTx2, PhTx3 e M) química e farmacologicamente distintas. PhTx1, PhTx2 e PhTx3 apresentaram efeitos neurotóxicos em camundongos e seus componentes apresentam massas moleculares entre 6000 e 9000 Da. As frações PhTx1 e PhTx2 induziram sintomas excitatórios em camundongos, enquanto a fração PhTx3 induziu paralisia flácida. A fração "M" é constituída de peptídeos ativos em músculo liso, porém, desprovidos de ação neurotóxica.

A partir da fração PhTx1, Diniz e colaboradores (1990), isolaram e determinaram a sequência completa de uma neurotoxina denominada Tx1. Tx1 é um peptídeo de cadeia única, constituído de 77 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 8000 Da, contendo alta proporção de cisteínas. Posteriormente, Rezende Jr (1992), mostrou que Tx1 induz contração do íleo e aurícula, isolados de cobaia, ação abolida por atropina e tetrodotoxina.

A fração PhTx2 é uma mistura de isoformas. Cordeiro e colaboradores (1992) purificaram nove peptídeos desta fração, que foram denominados Tx2-1 a Tx2-9 e apresentam alta homologia estrutural entre si. Os pesos moleculares foram determinados por espectroscopia de massa e foram, respectivamente, 5838,8 (53 resíduos), 5116,6 (49 resíduos), 5291,3 (48 resíduos) e 3742,1 (32 resíduos) para Tx2-1, Tx2-5, Tx2-6 e Tx2-9. Tx2-1, Tx2-5 e Tx2-6 são as mais tóxicas para camundongos quando injetadas por via intracerebroventricular. As três toxinas causaram efeitos excitatórios tais como lacrimejamento, hipersalivação, sudorese e agitação, seguidos por paralisia espástica e morte. Tx2-9 se mostrou muito menos tóxica para camundongos, causando apenas ereção da cauda e redução da mobilidade.

A fração PhTx3 também é constituída por uma mistura de peptídeos. Cordeiro e colaboradores (1993) purificaram e identificaram 6 isoformas nesta fração, denominadas Tx3-1 a Tx3-6. Os peptídeos apresentaram baixa homologia entre si. Os pesos moleculares calculados para estas toxinas por espectroscopia de massa e por SDS-PAGE variam entre 3500 e 8500. Tx3-3 e Tx3-4 são as mais tóxicas para camundongos e causam paralisia flácida seguida de morte em 10 e 30 minutos após a injeção via intracerebroventricular. As outras toxinas apresentam ação semelhante, porém com menor intensidade.

Figueiredo e colaboradores (1995) identificaram uma nova fração, denominada PhTx4, na peçonha de *Phoneutria nigriventer*, composta de 7 subfrações (Tx₄₍₁₎ a Tx₄₍₇₎). Mafra e colaboradores (1999) mostraram que PhTx4 e as subfrações Tx₄₍₃₎, Tx₄₍₄₎, Tx₄₍₅₎, Tx₄₍₆₎, Tx₄₍₇₎ inibem a captação de ³H-L-glutamato em sinaptosomas de córtex cerebral de rato. A fração Tx₄₍₇₎ mostrou-se a mais eficaz em inibir a captação de L-glutamato. A partir de Tx₄₍₅₎ e Tx₄₍₆₎, Figueiredo e colaboradores (1995, 1999) purificaram e determinaram a sequência de aminoácidos de duas toxinas, Tx₄₍₅₋₅₎ e Tx₄₍₆₋₁₎. Ambas apresentam alta toxicidade para insetos e não induzem efeitos tóxicos em camundongos. Entretanto, Tx₄₍₅₋₅₎ bloqueia as correntes iônicas induzidas pelo NMDA em cultura de neurônios de hipocampo de rato.

Utilizando técnicas de biologia molecular, Diniz e colaboradores (1993) construíram uma biblioteca de cDNA, a partir da glândula de veneno de *Phoneutria nigriventer*, e clonaram o gene codificador da toxina Tx1.

Foi demonstrado que Tx1 é sintetizado primeiramente como um pré-propeptídeo, onde pôde-se distinguir 4 regiões distintas: uma sequência inicial que corresponde a um peptídeo sinal, uma sequência ácida de 15 resíduos de aminoácidos, a toxina e 2 resíduos de glicina. A toxina madura seria liberada após três clivagens proteolíticas.

Araújo e colaboradores (1993_a, 1993_b) demonstraram que a fração PhTx2 retarda a inativação dos canais de sódio em preparação de músculo esquelético de rã e as toxinas Tx2-5 e Tx2-6 afetam a ativação e a inativação destes canais, de forma semelhante à fração bruta. Matavel (1999) mostrou que Tx2-6 modifica a cinética dos canais de sódio sensíveis à voltagem, alterando os parâmetros de ativação e de inativação.

Romano Silva e colaboradores (1993) verificaram um aumento nas concentrações internas de sódio e de cálcio e na liberação de L-glutamato, em sinaptosomas cerebrocorticais de rato, após o tratamento com PhTx2. Tais efeitos foram abolidos por tetrodotoxina, sugerindo ação sobre canais de sódio.

Outros estudos realizados com o veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* mostram ainda que este induz aumento da permeabilidade vascular em ratos e coelhos e contração de músculo liso vascular de coelhos (Antunes e colaboradores, 1992, 1993). Também foi verificada indução de edema em pele de rato (Palframan e colaboradores, 1996). Costa e colaboradores (1996) estudaram a ação do veneno de *Phoneutria nigriventer* sobre a pressão arterial de ratos anestesiados. Este causou efeito bifásico sobre o sistema experimental: uma breve hipotensão seguida de uma hipertensão prolongada. A hipotensão foi parcialmente abolida por um bloqueador de canais de potássio- sensíveis a ATP e a hipertensão foi reduzida por bloqueadores de canais de cálcio tipo L.

Três peptídeos de peso molecular na faixa de 13000 foram purificados da peçonha de *Phoneutria nigriventer*. PNV1 possui 125 resíduos de aminoácidos, peso molecular de 13.899 e é ativo em músculo liso vascular de coelho, provocando espasmos nesta preparação (Marangoni e colaboradores, 1993). PNV2 possui 102 resíduos de aminoácidos, peso molecular de 12114 e também apresenta ação espasmódica em preparação de músculo liso vascular de coelho. O efeito espasmogênico de PNV2 não foi abolido por tetrodotoxina ou por antagonistas α -adrenérgicos, excluindo-se assim a

possibilidade do envolvimento de canais de sódio, ou liberação de adrenalina pela ação de PNV2 (Bento e colaboradores, 1993). PNV3 apresenta 132 resíduos de aminoácidos, peso molecular de 14475 e induz aumento na permeabilidade microvascular em pele de coelho. PNV3 apresenta grande homologia com outras toxinas (Tx2-1, Tx2-5, Tx2-6) isoladas do mesmo veneno (Bento e colaboradores, 1995).

Prado e colaboradores (1995) demonstraram que a fração PhTx3 diminui a captação de cálcio por sinaptosomas de córtex cerebral de rato e também reduz a liberação de glutamato dependente de cálcio na mesma preparação. Tx3-3, uma toxina purificada a partir de PhTx3, reproduz os efeitos da fração. Estes autores sugerem que Tx3-3 seja um antagonista de canais de cálcio que interfere na liberação de glutamato.

Guatimosim e colaboradores (1997) verificaram que Tx3-3 inibe canais de cálcio sensíveis à ω -Agatoxina IVA (classes P/Q), os quais participam do processo da exocitose em sinaptosomas de córtex cerebral de rato.

Recentemente, Cassola e colaboradores (1998) purificaram, a partir da peçonha de *Phoneutria nigriventer*, um peptídeo denominado ω -Phonetoxina-IIA. Este apresenta 76 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 8363. ω -Phonetoxina-IIA bloqueia, com alta afinidade, as correntes de cálcio tipo N em neurônios do gânglio dorsal de rato e com baixa afinidade as correntes tipo L em células β pancreáticas. Há evidências de que ω -Phonetoxina-IIA também seja ativa em outros canais de cálcio de alta condutância. Não foi observada a ação do peptídeo em canais de cálcio de baixa condutância.

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que Tx1 se liga com alta afinidade a receptores em sistema nervoso central de rato e sistema nervoso entérico de cobaias.

Bicalho (1994) mostrou que Tx1 se liga a receptores em preparação sinaptosomal de córtex cerebral de rato com um K_d na ordem de 3×10^{-10} M. Nesta preparação foi encontrado apenas um sítio receptor, ao qual a toxina Tx1 se liga de maneira não-cooperativa. Foi mostrado que Tx1 não compete pelo sítio receptor com nenhum dos ligantes testados, ativos em canais iônicos (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}).

Gouvêa dos Santos e colaboradores (1999) mostraram que Tx1 possui sítios receptores em preparação de membranas de sistema nervoso entérico de cobaia.

Nesta preparação, os parâmetros determinados foram semelhantes àqueles encontrados em sinaptosomas cerebrocorticais de rato, ou seja, Tx₁ liga-se aos sítios com um K_d da ordem de 2×10^{-10} M e possui apenas um sítio receptor, ao qual se liga de forma não-cooperativa. Nesta preparação Tx1 também não competiu pelo sítio de ligação com nenhum dos ligantes testados, ativos em canais de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺.

4. Considerações acerca da interação entre ligantes e receptores.

Os primeiros organismos multicelulares apareceram cerca de 2,5 bilhões de anos após o primeiro organismo unicelular. A razão para tal “atraso” pode estar relacionada com a necessidade dos organismos multicelulares desenvolverem um mecanismo elaborado de interação que permitiria a comunicação coordenada entre as células de modo a permitir o perfeito funcionamento do organismo. Cada célula do organismo possui um mecanismo complexo para a interpretação dos sinais o que permite estabelecer uma função especializada dentro do corpo (Alberts e colaboradores, 1996).

A comunicação entre as células de organismos multicelulares se dá através de moléculas sinalizadoras que se ligam a aceptores na célula alvo e desencadeiam uma resposta biológica, como por exemplo a divisão celular. O estudo da distribuição, localização, estrutura e função destas moléculas aceptoras são de extrema importância para a compreensão da resposta biológica.

Um dos modos mais comuns de estudo dos aceptores é o uso de versões marcadas da molécula ligante. A forma mais utilizada de marcação é a radioativa, utilizando como radionuclídeos ^3H , ^{125}I , ^{14}C , dentre outros (Hulme, 1992).

Estudos de ligação, utilizando sondas radioligadas, são úteis para estabelecer e caracterizar a interação entre ligantes e uma variedade de receptores (Weiland & Molinoff, 1981).

Drogas marcadas radioativamente têm sido usadas como sondas específicas e precisas no estudo detalhado das interações entre receptores e ligantes. Os estudos de ligação permitem determinar o comportamento cinético de interação de uma droga e o seu sítio acceptor, como também a caracterização do acceptor. Também é possível, a partir de estudos de ligação, discriminar classes de receptores e determinar a densidade dos mesmos na preparação utilizada experimentalmente. Estes estudos constituem o único modo de caracterizar receptores durante solubilização, purificação e reconstituição (Siegel e colaboradores, 1994).

OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Esclarecer o comportamento cinético da ligação da toxina Tx1 à preparação sinaptosomal de córtex cerebral de rato.

5.2 Objetivos Específicos

- Obter um derivado radiomarcado a partir de Tx₁, adequado aos estudos cinéticos
- Determinar a constante cinética de associação (k_1) do derivado de $^{125}\text{I-Tx}_1$
- Determinar a constante cinética de dissociação (k_{-1}) do derivado de $^{125}\text{I-Tx}_1$
- Determinar a constante de equilíbrio (K_d) a partir dos dados cinéticos, obtidos com o derivado de $^{125}\text{I-Tx}_1$.
- Comparar a constante dissociação K_d , calculada a partir dos dados cinéticos com o K_d calculado a partir dos dados no equilíbrio, com o uso do derivado.

MATERIAIS E MÉTODOS

6-Materiais

6.1. Drogas e reagentes

Todas as drogas e reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico, provenientes das empresas Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA) e Merck (Darmstadt, Alemanha).

O Na-¹²⁵I foi proveniente da Amersham International (Buckinghamshire, Inglaterra) e da DuPont (Boston, USA)

6.2. Toxina

A toxina Tx1 foi gentilmente cedida pelo Prof. Carlos Ribeiro Diniz e pela Dra. Marta do Nascimento Cordeiro da Fundação Ezequiel Dias. Tx1 é purificada em dois passos cromatográficos: filtração em gel convencional, em coluna Sephadex® G-50 e cromatografia de fase reversa em sistema FPLC, em coluna Pro-RPC® (Fast Performance Liquid Chromatography), segundo técnica descrita por Diniz e colaboradores em 1991.

6.3. Soluções para experimentos de ligação

As seguintes soluções foram utilizadas nos experimentos de ligação:

	Tampão de preparação, pH 7,4	Tampão de incubação, pH 7,4	Tampão de lavagem pH 7,4
HEPES	25 mM	25 mM	5 mM
Cloreto de colina	140 mM	140 mM	140 mM
KCl	5,4 mM	5,4 mM	5,4 mM
MgSO ₄	0,8 mM	0,8 mM	0,8 mM
CaCl ₂	1,8 mM	1,8 mM	1,8 mM
Glicose	10 mM	10 mM	10 mM
BSA		0,5 % (p/v)	2% (p/v)

As soluções foram divididas em alíquotas e mantidas congeladas (-20°C) até o momento do uso.

O “tampão de preparação” foi utilizado para ressuspender a preparação sinaptosomal utilizada em nossos experimentos. Este tampão tem composição semelhante ao tampão de incubação, exceto pela ausência de BSA.

O “tampão de lavagem” difere do “tampão de incubação” nas concentrações mais baixa de HEPES e mais alta de BSA .

7- Métodos

7.1. Marcação da toxina Tx1 com Na-¹²⁵I

A iodação de Tx1 com Na-¹²⁵I foi realizada de acordo com a técnica descrita por Rochat e colaboradores em 1977.

A 0,6 nmol de Tx1 adicionou-se 0,5 mCi de Na-¹²⁵I (proporção em nanomols iodo : proteína: 1 : 3) e 1,25µg de lactoperoxidase. Duas adições de 2,5 µL de H₂O₂ (1/50000) foram feitas no tempo 0 e após 1 minuto de reação. Nesta reação o iodo é oxidado e incorpora-se ao anel fenólico de resíduos de tirosina. A reação foi interrompida pela adição de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,4) contendo BSA (1 mg/mL). O iodo livre (não-incorporado á proteína) foi separado da toxina marcada utilizando-se de uma cromatografia de troca iônica (catiônica) em uma resina do tipo Dowex (1-X8, Serva-Heidelberg, USA) previamente ativada com solução de NaCl (0,9%) e pré-saturada com tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,4) contendo BSA (1mg/mL). A recuperação da toxina marcada foi feita através de duas lavagens sucessivas da resina com o tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,4) contendo BSA (1 mg/mL). O iodo livre radioativo residual, que permanece com a toxina marcada, foi estimado através de cromatografia em papel (Whatmann n° 1), utilizando-se como eluente metanol saturado com KI. O iodo livre migra através do papel, enquanto a toxina marcada permanece na origem. A radioatividade foi quantificada em cintilador gama (1275- Gamma Counter- LKB). A toxina marcada era mantida a 4°C em tampão fosfato de sódio contendo BSA 1 mg/mL, sendo diluída adequadamente, no momento do uso.

A toxina marcada se mantém estável cerca de 3 semanas. A estabilidade era verificada pela manutenção da ligação específica à preparação sinaptosomal. Um desenho esquemático do processo de marcação é mostrado na figura 1.

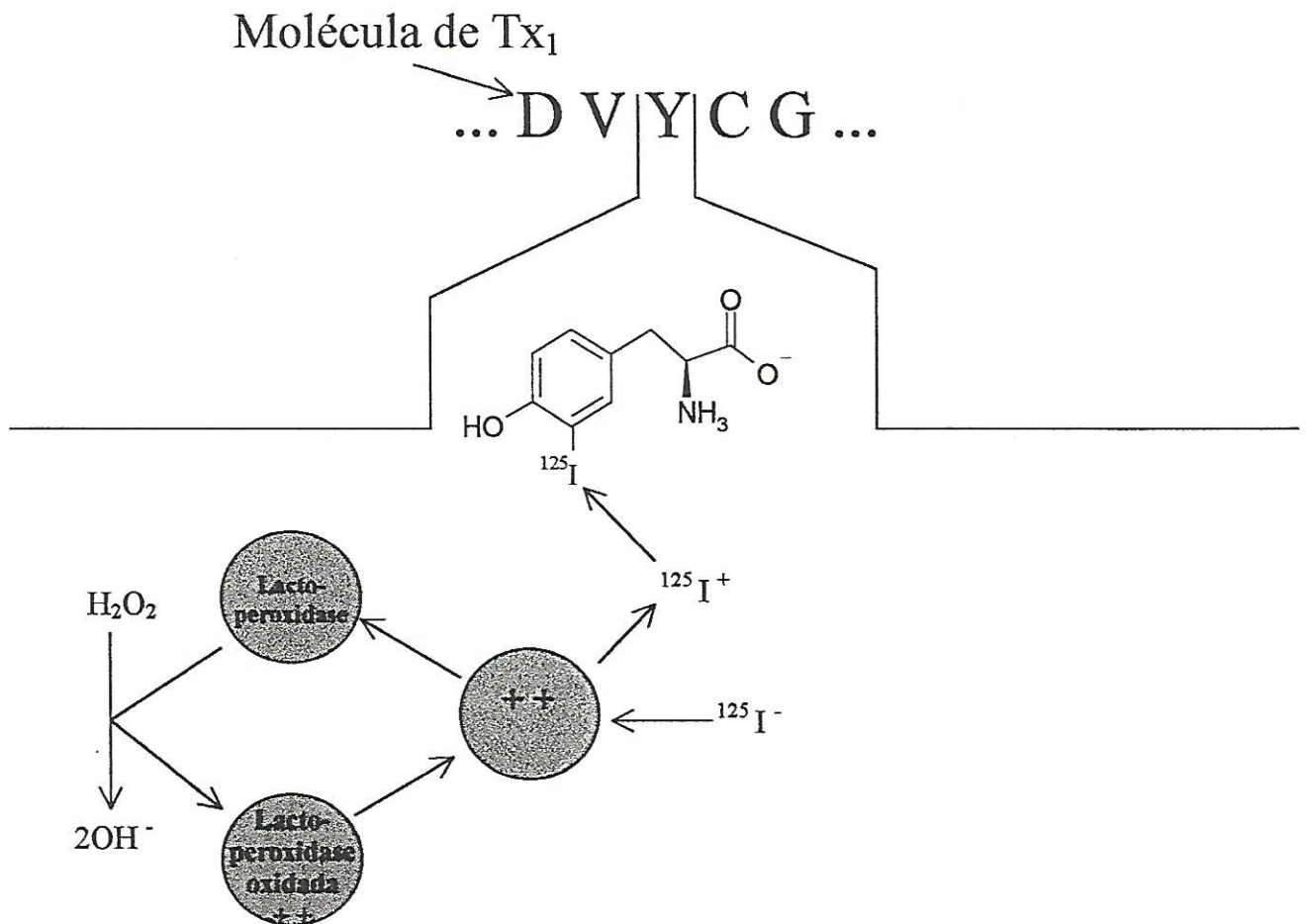


Figura 1- Representação esquemática da marcação de Tx₁ com Na-¹²⁵I. A lactoperoxidase (representada em círculos) é oxidada pela água oxigenada e oxida o iodo a uma forma mais reativa. O iodo oxidada é então incorporado ao anel fenólico de resíduos de tirosina do peptídeo.
(adaptado do livro "Molecular Biology of the Cell", 2^a ed., 1989)

7.2. Purificação dos derivados iodados de ^{125}I -Tx1

Após a obtenção da toxina marcada, esta foi submetida a uma cromatografia líquida de alta performance em sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Shimadzu - Kyoto, Japan), com o objetivo de separar possíveis derivados de marcação.

A marcação da toxina Tx1 foi semelhante ao descrito no item 7.1 exceto que, após a reação com a lactoperoxidase, adicionou-se ao tubo de marcação uma solução de 0,1% TFA/água, para finalizar o processo. A amostra obtida foi então submetida a uma cromatografia em HPLC utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa C₁₈ Vydac® -4,6 x 250 mm (Technicol Ltd., Stockport, U.K.). Como eluentes foram utilizados: A - 0,1% TFA/água e B - 0,1% TFA /acetonitrila. Os derivados foram eluídos da coluna com um gradiente de 0 a 50% de B em A por 100 minutos com um fluxo de 1 mL/minuto. A cromatografia foi monitorada pela leitura da absorvância a 214 nm e pela leitura da radioatividade em contador gama. Foram coletadas frações de 0,5 mL. As frações obtidas foram testadas quanto à ligação específica à fração sinaptosomal de córtex cerebral de rato.

7.2.1 Cálculo da radioatividade específica do derivado.

A radioatividade específica do derivado marcado foi calculada a partir da concentração de proteína presente na amostra correspondente ao pico selecionado e da radioatividade incorporada ao mesmo.

Para tanto, realizou-se a marcação da proteína com ^{127}I (proporção proteína: iodo foi 1: 1) e ^{125}I como traçador (proporção proteína : iodo, em nanomols, foi 100 : 1). O produto da marcação foi submetido a uma cromatografia em HPLC como descrito no item 7.2.

A concentração protéica foi estimada pela integração da área do pico obtido no cromatograma. A razão entre a radioatividade contida no pico e a área correspondente é a radioatividade específica calculada.

7.3. Preparação da fração sinaptosomal P₂ de córtex cerebral de rato

A fração sinaptosomal (P₂) foi preparada segundo técnica descrita por Gray & Whittaker em 1962.

Todo o processo foi realizado a 4 °C. Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos (250 g) provenientes do CEBIO- Centro de Bioterismo do ICB-UFMG. Após a decapitação, o cérebro foi imediatamente retirado. O córtex foi dissecado, pesado e colocado em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0) contendo sacarose (0,32M), na proporção (tecido:solução) de 10% (P/V). O córtex foi homogeneizado em Potter-Elvehjan (Thomas Scientific- Swedesboro, EUA). O homogenato foi centrifugado por 10 minutos a uma velocidade de 1000 g em centrífuga refrigerada a 4 °C (Sorvall 5 FB, DuPont Instruments). Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado novamente por 20 minutos a 15000 g. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em “tampão de preparação”, na proporção de 10mL por grama inicial de tecido. Foi realizada uma terceira centrifugação por 20 minutos a 15000 g. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspensionado em tampão de preparação, na proporção de 10mL de tampão por grama inicial de tecido.

A concentração de proteínas presente na preparação foi determinada pelo método descrito por Lowry e colaboradores em 1951.

7.4. Experimentos de ligação

7.4.1- Teste das frações obtidas de ^{125}I - Tx1

As frações obtidas após a cromatografia em fase reversa (HPLC) da ^{125}I -Tx1 foram testadas para se verificar a ligação específica à preparação sinaptosomal de córtex cerebral de rato.

Alíquotas de 50 μg de tecido foram incubadas com as frações cromatográficas de ^{125}I -Tx1 na concentração de 10^{-10} M na ausência (ligação total) ou na presença (ligação não-específica) de Tx1 nativa na concentração de 10^{-7} M, por 30 minutos a 20°C (volume de incubação: 500 μL). Após a incubação, alíquotas de 400 μL foram filtradas em filtros de borosilicato (GF/B Whatmann) pré-saturados com BSA (5 mg/mL), adaptados a um sistema de filtração à vácuo (Sartorius). Os filtros foram lavados 4 vezes com 2 mL de “tampão de lavagem” (mantido a 4°C). O processo de filtração é muito rápido (em torno de 5 segundos). A radioatividade contida nos filtros foi quantificada em contador gama. A ligação específica foi determinada subtraindo-se a ligação não-específica da ligação total. A ligação não-específica corresponde a, aproximadamente 20% da ligação total.

Em todos os experimentos subsequentes, as amostras foram filtradas, os filtros lavados e a radioatividade quantificada da mesma maneira descrita acima.

7.4.2- Experimento de associação

A fração sinaptosomal, na concentração de 125 µg/ mL em tampão de incubação, foi pré-incubada a uma temperatura de 20°C por 20 minutos a fim de estabilizar a temperatura. Em seguida, adicionou-se $^{125}\text{I-Tx1}$ ou $^{125}\text{I-D}_1$ (derivado obtido de $^{125}\text{I-Tx1}$) para as concentrações indicadas nos experimentos. Alíquotas de 400µL (50µg de tecido) foram filtradas nos intervalos de tempo determinados.

A ligação não- específica foi determinada da seguinte forma: adicionou-se à suspensão de tecido $^{125}\text{I-Tx1}$ ou $^{125}\text{I-D}_1$ nas concentrações indicadas e Tx1 nativa em concentração 1000 x superiores ao ligante radioativo. Após incubação de 30 minutos a 20°C, amostras de 400µL (50µg de tecido) foram filtradas nos intervalos de tempo determinados.

7.4.3- Experimento de dissociação

A fração sinaptosomal, na concentração de 125 µg/mL em tampão de incubação, foi pré- incubada a uma temperatura de 20°C por 20 minutos. Posteriormente foi adicionado ao tubo de ensaio $^{125}\text{I-Tx1}$ ou $^{125}\text{I-D}_1$ para as concentrações indicadas nos experimentos. Seguiu-se incubação a 20°C por 1 hora a fim de permitir que a ligação atingisse o equilíbrio. Após a incubação, foram filtradas 4 amostras de 400µL (50µg de tecido), que representam a ligação de $^{125}\text{I-Tx1}$ ou $^{125}\text{I-D}_1$ ao tecido, no equilíbrio. Em seguida Tx1 nativa, em concentração 1000 x superiores ao ligante radioativo, foi adicionada e amostras de 400µL (50µg de tecido) foram filtradas nos intervalos de tempo determinados.

A ligação não-específica foi determinada da seguinte forma: foram adicionadas juntas, ao tecido $^{125}\text{I-Tx1}$ ou $^{125}\text{I-D}_1$ para as concentrações indicadas nos experimentos e Tx1 nativa em concentração 1000 x maior que o ligante radioativo. Após incubação de 30 minutos a 20°C, amostras de 400µL (50µL de tecido) foram filtradas nos intervalos de tempo determinados.

7.4.4- Experimento de saturação

Alíquotas contendo 50µg de tecido foram incubadas com ^{125}I Tx1 ou ^{125}I -D₁ em concentrações crescentes conforme indicado (10^{-12} a 10^{-9} M) na ausência (ligação total) ou na presença de Tx1 nativa na concentração de 10^{-7} M (ligação não-específica), por 30 minutos a 20°C (volume de incubação: 500 µL). Após a incubação, 400 µL de cada amostra foram filtrados. A ligação específica foi determinada subtraindo-se a ligação não-específica da ligação total.

7.4. Análise dos resultados

Os resultados foram analisados com o auxílio dos programas:

- Microsoft® Excell 97, (Microsoft Corporation)
- GraFit (Erithacus Software Ltd)
- SigmaPlot® (Jandel Corporation)
- A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se “Intervalo de Confiança”.

RESULTADOS

8. Resultados

8.1 Experimentos cinéticos com $^{125}\text{I-Tx}_1$

Inicialmente foram realizados experimentos para determinar a cinética de interação de $^{125}\text{I-Tx}_1$ com preparação sinaptosomal de córtex cerebral de rato.

A figura 2 mostra o gráfico de associação de $^{125}\text{I-Tx}_1$ aos receptores em córtex cerebral de rato. O gráfico é representativo de 3 experimentos.

A saturação é alcançada em, aproximadamente, 720 segundos (12 minutos) de incubação. A ligação máxima (B_{max}) de $^{125}\text{I-Tx}_1$ foi inferior a 10% da concentração inicial do ligante, satisfazendo as condições impostas pelo modelo aplicado (para detalhes, ver apêndice).

A constante observada (k_{obs}) calculada foi de $3,46 \pm 1,15 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($n = 3$).

A curva apresenta apenas um componente, estando de acordo com o modelo matemático proposto para a interação da toxina Tx1 com o receptor (ver apêndice).

A figura 3a mostra a curva de dissociação da toxina marcada $^{125}\text{I-Tx}_1$ da preparação sinaptosomal de córtex cerebral de rato, durante 3 horas, a 20° C . A figura é representativa de uma série de 3 experimentos.

Observa-se que a dissociação é incompleta. A toxina marcada ($5 \times 10^{-11} \text{ M}$) não se deslocou completamente dos sítios receptores, na presença de $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ de toxina nativa mesmo após 24 horas de incubação a 4° C (figura 3b). Aproximadamente 40% da toxina marcada permanece ligada ao sítio receptor após 24 horas de reação. A regressão linear dos dados mostra a existência de dois componentes (cinética biexponencial), com cinéticas diferentes (figura 3a, inserto). Os k_{-1} calculados foram de $2,07 \pm 0,76 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para o componente rápido (fig. 3a, inserto, símbolos pretos) e $6,4 \pm 2,8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para o componente lento (fig. 3a., inserto, símbolos vazados), respectivamente.

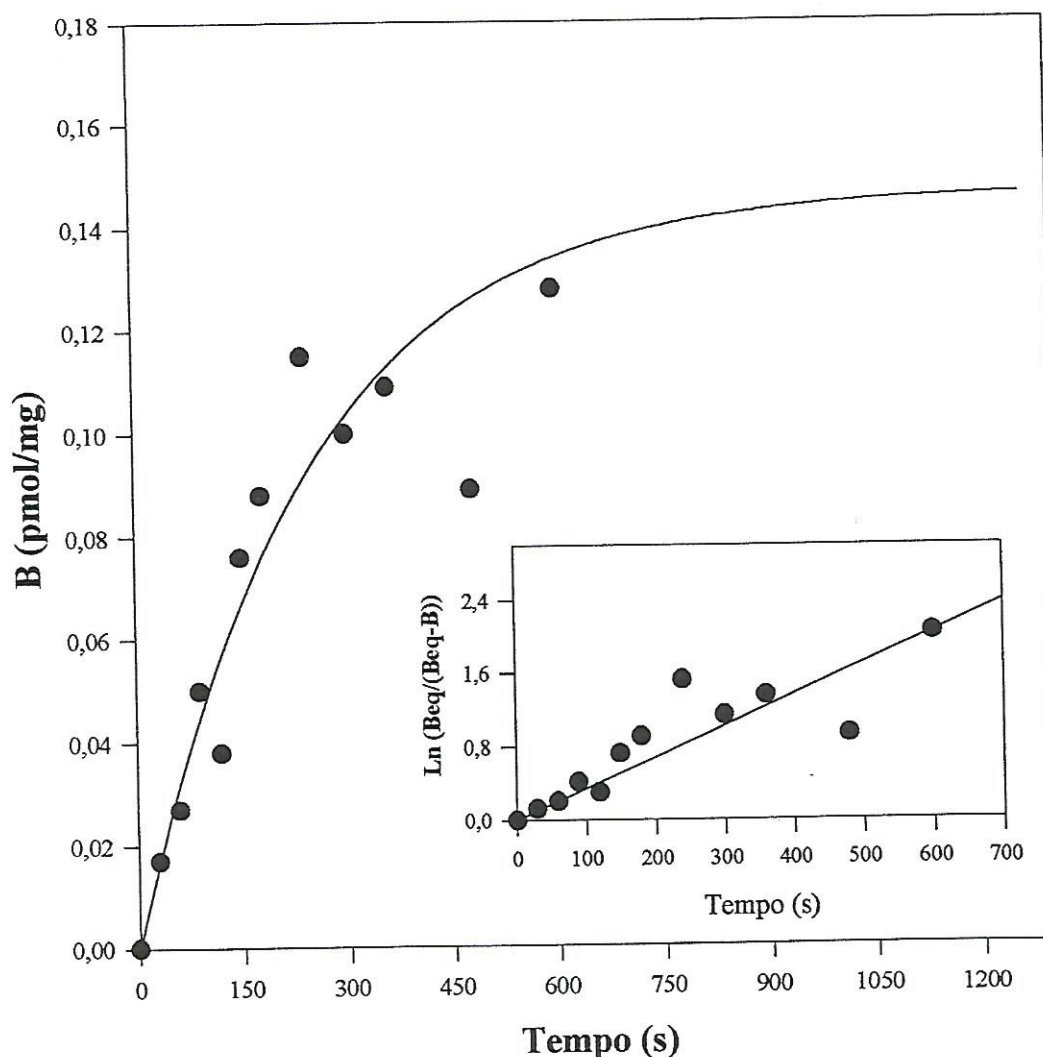


FIGURA 2- Associação de $^{125}\text{I-Tx}_1$ à preparação sinaptosomal de córtex cerebral de rato. O tecido ($125 \mu\text{g/mL}$) foi pré-incubado a 20°C . Adicionou-se $^{125}\text{I-Tx}_1$ para a concentração final de $5 \times 10^{-11} \text{ M}$. Amostras de $50 \mu\text{g}$ de tecido foram filtradas nos intervalos de tempo indicados. Os dados mostram a ligação específica de $^{125}\text{I-Tx}_1$ ao receptor. O k_{obs} calculado por regressão não-linear foi de $3,46 \times 10^{-3} \pm 1,15 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($n = 3$). Inseto: regressão linear dos dados. A ligação específica foi estimada como descrito em "Métodos".

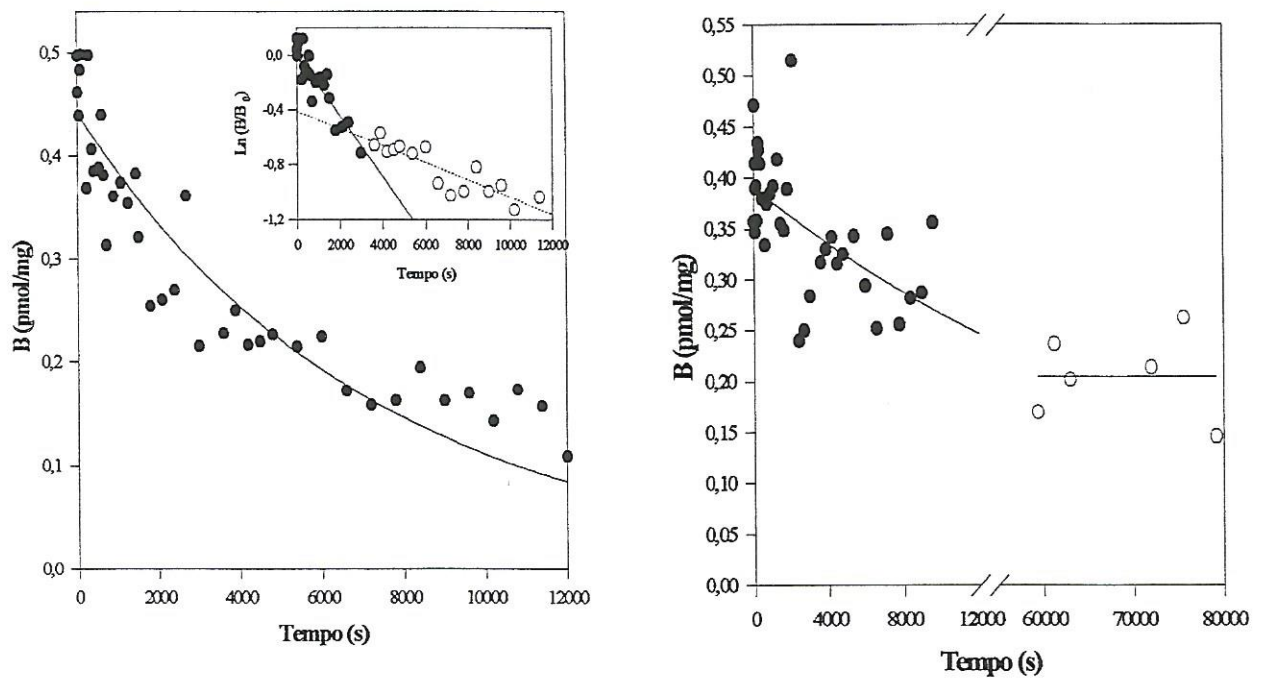


FIGURA 3- Dissociação de $^{125}\text{I-Tx}_1$ dos sítios receptores na preparação de córtex cerebral de rato. O tecido ($125\mu\text{g/mL}$) foi pré-incubado a 20°C . Adicionou-se 5×10^{-11} M de $^{125}\text{I-Tx}_1$ e seguiu-se incubação por 1 hora. A dissociação de $^{125}\text{I-Tx}_1$ se iniciou com a adição de 5×10^{-7} M Tx_1 nativa. Amostras de $50\mu\text{g}$ de tecido foram filtradas nos intervalos de tempo indicados.. O gráfico “a” representa experimentos ($n = 3$) realizados num intervalo de 3 horas a 20°C . Inseto: regressão linear dos dados. As constantes de dissociação (k_{-1}) calculadas foram $2,07 \pm 0,76 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $6,4 \pm 2,8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (componentes rápido e lento, respectivamente. $n = 3$). O gráfico “b” representa experimento realizado num intervalo de 24 horas a 4°C . A ligação específica foi estimada como descrito em “Métodos”.

Considerando-se a dissociação incompleta de $^{125}\text{I-Tx1}$, como mostrado na figura 3, decidimos investir na separação de possíveis derivados radiomarcados, que nos possibilitasse compreender melhor o modelo de interação desta toxina com a preparação estudada.

8.2 Separação dos derivados iodados resultantes da marcação de Tx₁.

A figura 4 mostra o perfil cromatográfico obtido pela separação do material resultante da marcação de Tx₁ com ^{125}I . A toxina nativa foi eluída com 28% de acetonitrila, em 68 minutos (pico a). Posteriormente, os derivados iodados foram eluídos em dois picos com 2.8.5% e 29.5% de acetonitrila, e nos tempos de 69 e 71 minutos respectivamente (pico b e pico c). Perfis semelhantes foram obtidos em todos os experimentos realizados (n = 6).

Foram realizados testes de ligação específica com os materiais radioativos obtidos cromatograficamente nas amostras correspondentes aos pico b e c. A amostra eluída no pico b mostra uma ligação específica bastante satisfatória (cerca de 75%) e nos pareceu mais adequado para iniciarmos os experimentos cinéticos, considerando-se que este derivado deve ser menos modificado pelo processo de marcação. Este material passou a ser denominado $^{125}\text{I-Derivado 1}$, ou simplesmente $^{125}\text{I-D}_1$.

A radioatividade específica de $^{125}\text{I-D}_1$ foi de 306 cpm/fmol, calculada como descrito em “Métodos”.

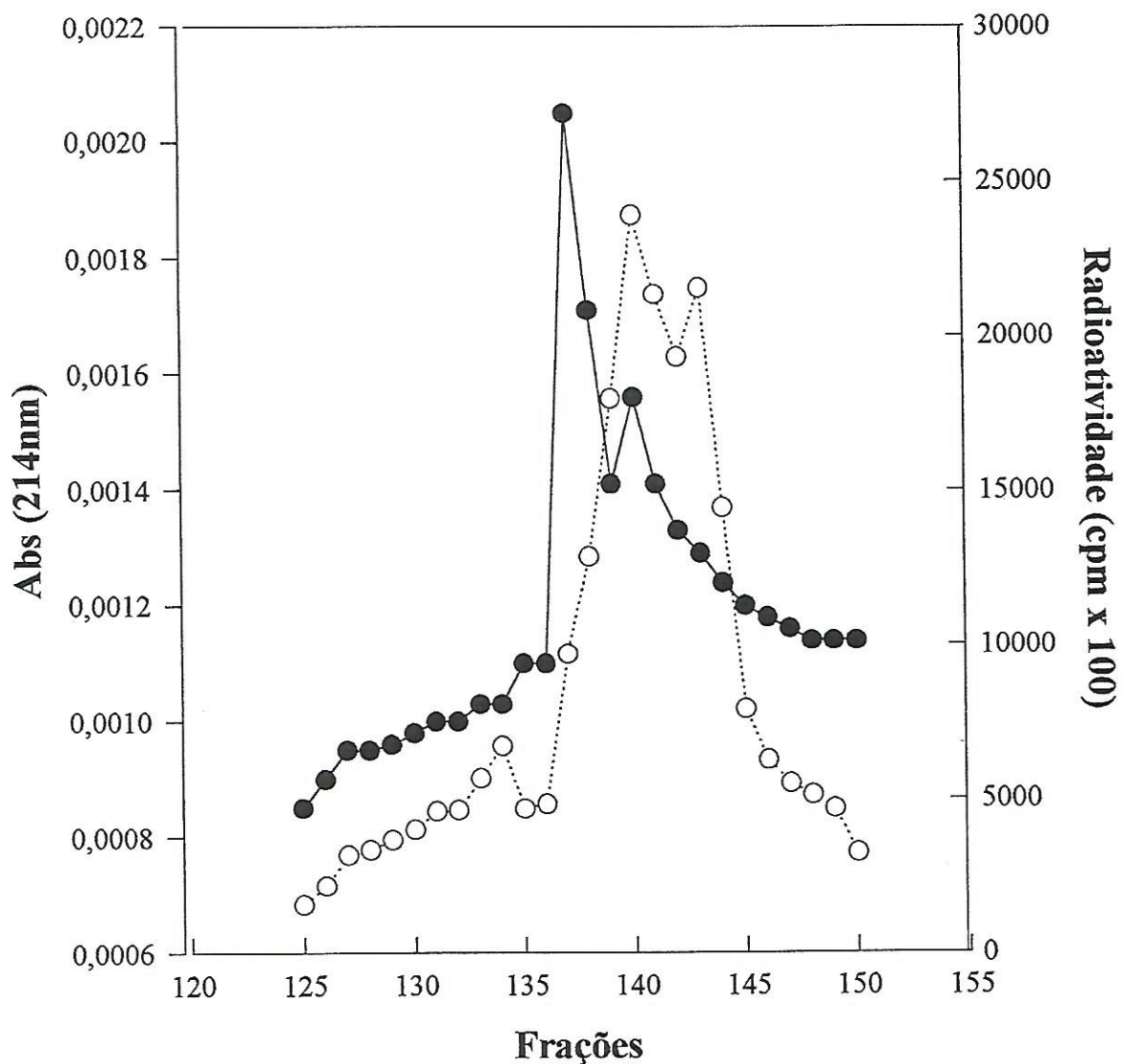


FIGURA 4- Perfil da cromatografia de fase reversa (HPLC) de $^{125}\text{I-Tx}_1$. Coluna de fase reversa C_{18} (Vydac, 0,46 x 25 cm) foi equilibrada com solução 0,1% de TFA em água. A cromatografia foi desenvolvida usando um gradiente linear de 0 a 50% de acetonitrila em 0,1% de TFA, em 100 minutos (0,5% de B/minuto). Amostra: 2,5 nmols de $^{125}\text{I-Tx}_1$ marcados com 2,5 nmols de KI e ^{125}I como traçador, como descrito em "Métodos". O fluxo foi de 1 ml/minuto. O conteúdo protéico do eluato foi estimado pela leitura da absorvância a 214 nm e a radioatividade foi determinada por leitura em cintilador gama. O pico "a" representa a toxina nativa; o pico "b" representa $^{125}\text{I-D}_1$ e o pico "c" representa $^{125}\text{I-D}_2$. Os símbolos cheios representam a leitura da absorvância e os símbolos vazados representam a leitura radioativa.

8.3. Experimentos cinéticos com $^{125}\text{I-D}_1$

Nos experimentos seguintes, estudamos o comportamento cinético do derivado $^{125}\text{I-D}_1$.

A figura 5 representa a associação do derivado $^{125}\text{I-D}_1$ aos receptores em córtex cerebral de rato. A figura é representativa de uma série de 5 experimentos.

Observa-se que a saturação é alcançada em, aproximadamente, 300 segundos (5 minutos) de incubação. A constante observada (k_{obs}) de $1,2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi calculada por regressão não-linear dos dados mostrados no experimento representativo (fig.5). A ligação máxima ($B_{\text{máx}}$) do derivado à preparação foi inferior a 10% da concentração inicial do ligante, satisfazendo as condições impostas pelo modelo aplicado (para detalhes, ver apêndice). A média dos valores de k_{obs} foi de $1,59 \pm 0,45 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($n = 3$). No inserto da figura 5 está representado a análise dos dados por regressão linear. Observa-se que o gráfico apresenta um único componente na associação com o receptor.

A figura 6 mostra a dissociação do derivado $^{125}\text{I-D}_1$ dos aceptores em córtex cerebral de rato, induzida por alta concentração de toxina nativa. A figura é representativa de uma série de 5 experimentos.

Observa-se que a dissociação do derivado foi completa, atingindo o equilíbrio em aproximadamente 1 hora e 20 minutos. A constante de dissociação (k_{-1}) foi $4,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, calculada por regressão não-linear dos dados experimentais. A média dos valores de k_{-1} e $t_{1/2}$ calculados foram de $4,7 \pm 1,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $26,4 \pm 5,5$ minutos, respectivamente ($n = 4$). A análise dos dados por regressão linear mostra que $^{125}\text{I-D}_1$ se dissocia do sítio receptor de forma uniforme, apresentando um único componente, conforme mostra a figura.

A constante cinética de associação calculada foi $2,5 \pm 0,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (para detalhes ver apêndice).

A próxima etapa de nosso trabalho teve como objetivo o cálculo da constante de afinidade (K_d) obtida com o uso do $^{125}\text{I-D}_1$.

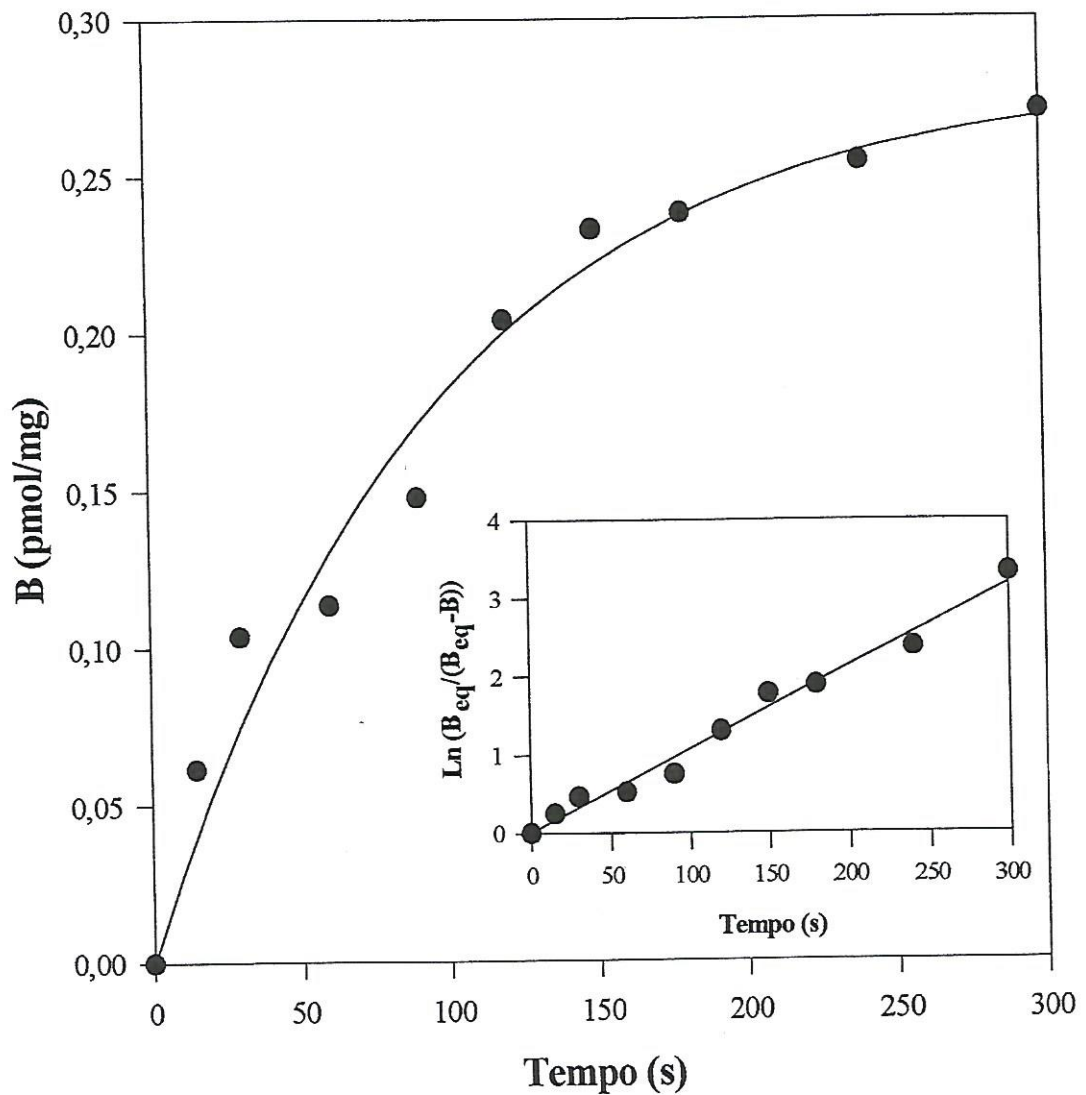


FIGURA 5- Associação de $^{125}\text{I-D}_1$ à preparação sinaptossomal de córtex cerebral de rato. O tecido ($125 \mu\text{g/mL}$) foi pré-incubado a 20°C por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se $^{125}\text{I-Tx1}$ para a concentração final de $6 \times 10^{-10} \text{ M}$. Amostras de $50 \mu\text{g}$ de tecido foram filtradas nos intervalos de tempo indicados. Os dados mostrados correspondem à ligação específica de $^{125}\text{I-D}_1$ ao receptor. A ligação não-específica foi estimada como descrito em "Métodos". Inserção: regressão linear dos dados. O k_{obs} calculado por regressão não-linear foi de $1,2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

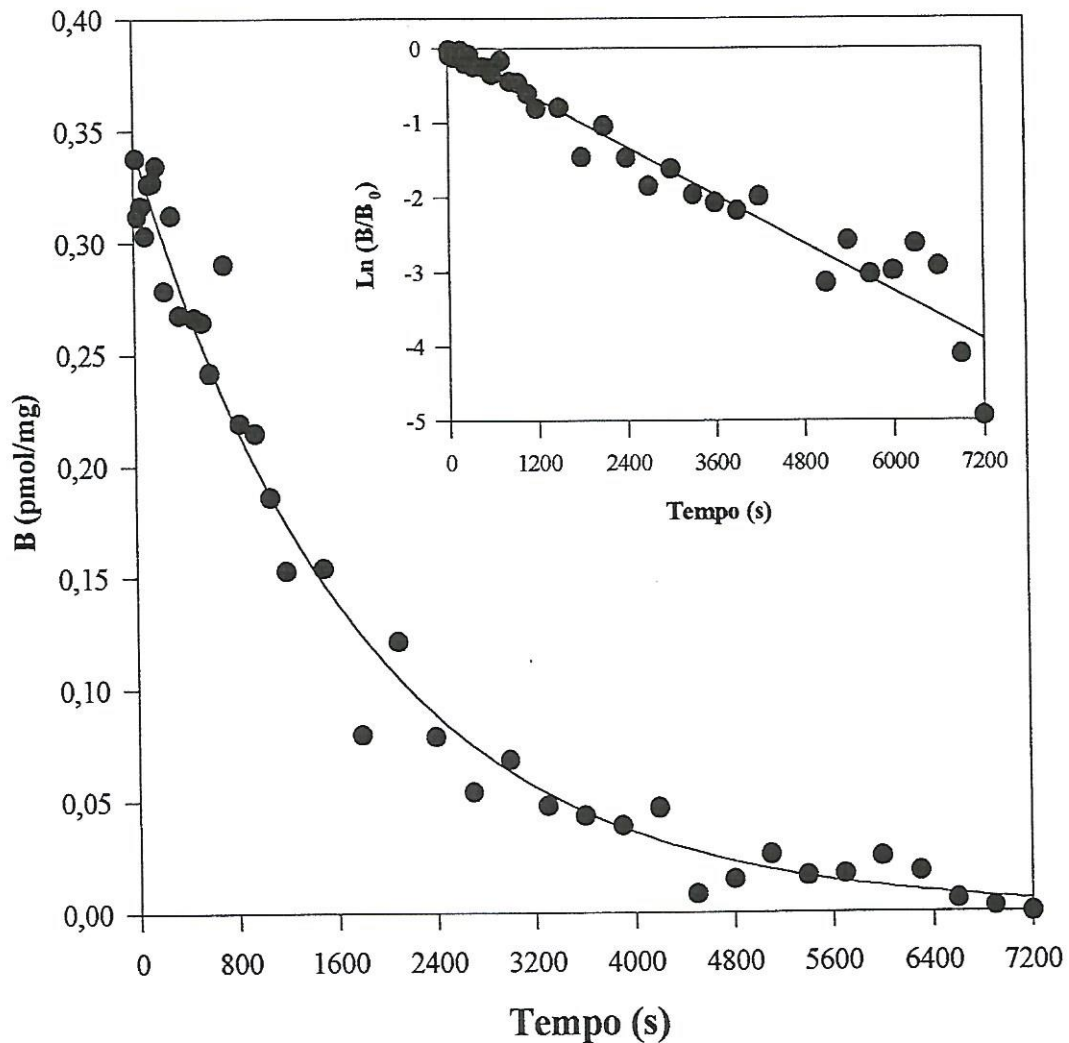


FIGURA 6- Dissociação de $^{125}\text{I-D}_1$ de preparação sinaptosomal de córtex cerebral de rato. O tecido ($125\mu\text{g/mL}$) foi pré-incubado a 20°C . Adicionou-se $^{125}\text{I D}_1$ para uma concentração final de 6×10^{-10} M e seguiu-se incubação por 1 hora. A dissociação de $^{125}\text{I-D}_1$ iniciou-se com a adição de 5×10^{-7} M Tx_1 nativa. Amostras de $50\mu\text{g}$ de tecido foram filtradas nos intervalos de tempo indicados. Os dados apresentados na figura representam a ligação específica de $^{125}\text{I-D}_1$ à preparação sinaptosomal. A ligação não-específica foi estimada como descrito em "Métodos". O k_1 calculado por regressão não-linear foi de $4,7 \times 10^{-4} \pm 1,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e o $t_{1/2}$ foi de $26,4 \pm 5,5$ minutos ($n = 4$). O inserto representa a regressão linear dos dados.

8.4. Estudos de equilíbrio com $^{125}\text{I-D}_1$

A figura 7 mostra a curva de saturação de $^{125}\text{I-D}_1$. Esta curva é representativa de um dos seis experimentos realizados.

O tecido foi incubado com concentrações crescentes de derivado $^{125}\text{I-D}_1$, como representado no gráfico. A ligação não-específica foi estimada através da incubação do derivado marcado em presença de um excesso (1000 vezes) de toxina nativa.

Observa-se que a ligação do derivado $^{125}\text{I-D}_1$ à preparação sinaptosomal de córtex cerebral de rato foi saturável. A constante de dissociação (K_d) foi de $2,2 \times 10^{-11} \pm 0,98 \times 10^{-11}$ M e o número total de sítios foi de 354 ± 15 fmoles/mg, ambos calculados por regressão não-linear dos dados ($n = 6$). O inserto da figura 7 mostra a análise dos dados segundo a equação de "Scatchard" (para detalhes, ver apêndice). Observa-se a presença de uma única reta, sugerindo a presença de apenas um sítio acceptor para $^{125}\text{I-D}_1$ em preparação cerebrocortical de rato.

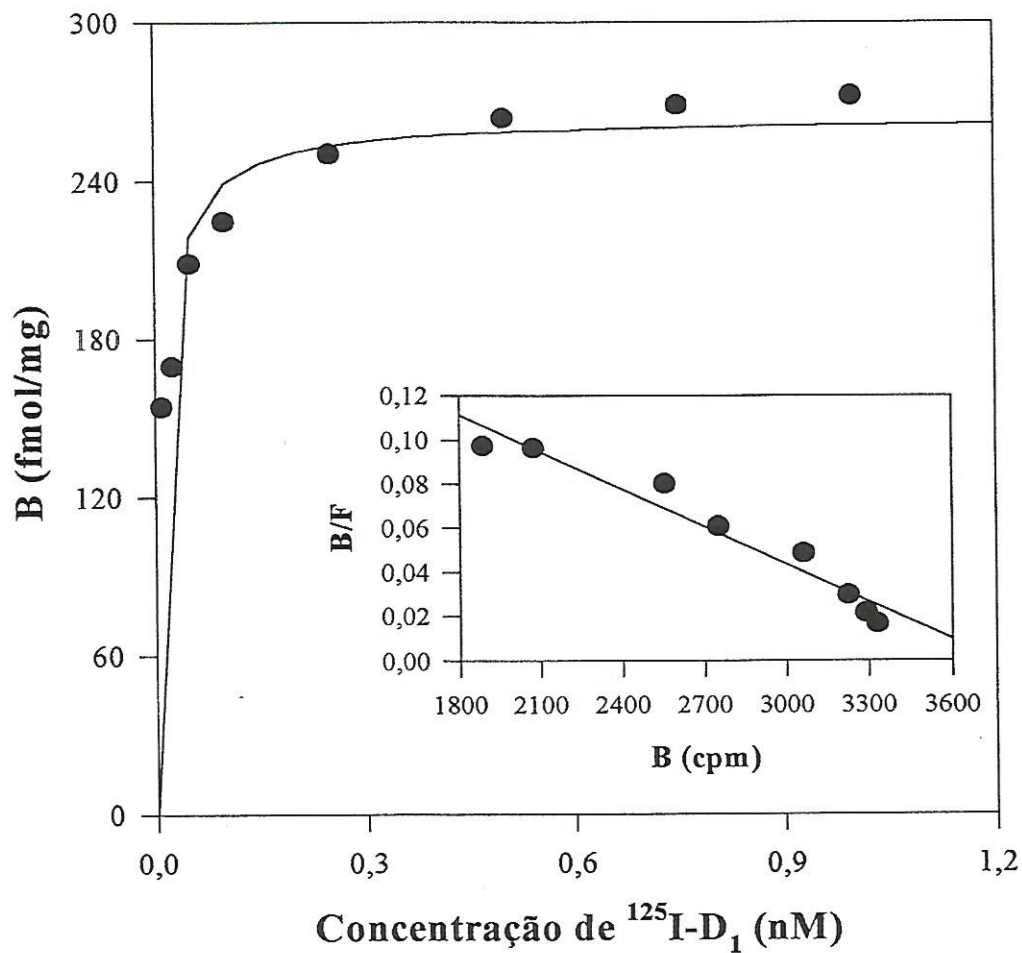


FIGURA 7 – Curva de saturação de $^{125}\text{I-D}_1$ em fração sinaptosomal de córtex cerebral de rato. O tecido (50 μg) foi incubado em presença de concentrações crescentes de $^{125}\text{I-D}_1$ na ausência (ligação total) ou na presença (ligação não-específica) de toxina nativa ($1 \times 10^{-7}\text{M}$). A curva representa a ligação específica de $^{125}\text{I-D}_1$ ao tecido. O K_d calculado para estes dados experimentais foi da ordem de $1,02 \times 10^{-11}\text{M}$ e o número de sítios foi de 264 fmoles/mg de proteínas. Inseto: regressão linear dos dados pela equação de “Scatchard”.

DISCUSSÃO

Experimentos de ligação utilizando-se de sondas radiomarcadas são úteis para estabelecer e caracterizar a interação entre ligantes e uma variedade de receptores (Weiland & Molinoff, 1981). Pode-se realizar uma série de estudos, diretos ou indiretos, visando o melhor conhecimento de características do ligante. Os estudos diretos são realizados com o objetivo de caracterizar o comportamento cinético e de equilíbrio da interação de um ligante com um receptor. Estudos indiretos são aqueles que se utilizam de outros ligantes com características conhecidas para o estudo de um novo composto. Pode-se caracterizar, dessa forma, a afinidade do ligante pelo receptor e qual é o receptor para o determinado ligante. A afinidade do ligante pelo receptor é resultado de uma série de interações complexas que vão resultar em um efeito biológico.

Este trabalho caracterizou a interação da toxina Tx₁ com os receptores em sistema nervoso central de rato. A maioria dos experimentos foi realizada utilizando-se técnicas de estudo direto.

Ao marcar uma molécula protéica com ¹²⁵I, pode-se incorporar pelo menos dois átomos de iodo em cada resíduo de tirosina da molécula, dependendo da disponibilidade de tais resíduos de acordo com a conformação tridimensional da proteína. A marcação direta dá-se por processos oxidativos e podem gerar vários derivados ou sub-produtos como: produtos de oxidação, espécies não-reativas, ligantes degradados, ou derivados com vários níveis de marcação. Tais produtos devem ser separados do derivado marcado efetivo, pois podem interferir na interação do ligante com o receptor e podem levar a interpretação errônea dos dados (Hulme, 1992).

Em certos casos, os possíveis sub-produtos ou derivados inativos, não alteram os resultados experimentais, provavelmente por representarem uma fração pequena em relação ao ligante principal.

Muitas toxinas radiomarcadas têm sido utilizadas para estudos de interação ligante-receptor sem, contudo, serem purificadas após o processo de marcação (por exemplo: Martin-Moutot e colaboradores, 1983; Gordon e colaboradores, 1993, De Lima e colaboradores, 1986).

Experimentos realizados por Bicalho (1994) mostram que a atividade tóxica de Tx_1 é preservada após a marcação com iodo, sugerindo que o comportamento de ligação da toxina marcada é semelhante ao da toxina nativa, podendo $^{125}I-Tx_1$ ser utilizada em experimentos de ligação.

Estudos mostram que a interação de $^{125}I-Tx_1$ com as preparações sinaptosomais de córtex cerebral de rato (Bicalho, 1994) e de membranas de íleo de cobaia (Gouvêa dos Santos, 1995, 1999) é de alta afinidade (cerca de 0,1nM). Entretanto, estes estudos foram feitos apenas em condições de equilíbrio. As constantes cinéticas não foram determinadas.

Nossos primeiros experimentos visaram a obtenção dos dados cinéticos utilizando-se toxina marcada, $^{125}I-Tx_1$, sem a prévia purificação dos possíveis derivados de marcação. A associação de $^{125}I-Tx_1$ com a preparação cerebrocortical alcança a saturação em aproximadamente 12 minutos. O k_{obs} calculado foi $3,46 \pm 1,15 \times 10^{-3} s^{-1}$, indicando interação rápida entre a toxina e o receptor. A análise dos dados por regressão linear (inseto da figura 2) mostra a presença de apenas um componente. Este experimento está em concordância com o modelo matemático (um ligante e um aceptor) aplicado.

Entretanto, os primeiros experimentos de dissociação (figura 3) mostram um comportamento anômalo de $^{125}I-Tx_1$. As curvas de dissociação (gráficos 3a e 3b) mostram que $^{125}I-Tx_1$ se dissocia aproximadamente 60% dos sítios receptores, demonstrando uma dissociação parcial. A análise dos dados por regressão não-linear apresentou curvas com dois componentes: um rápido e um lento (figura 3a, inseto).

Duas hipóteses foram levantadas com relação aos dados mostrados na figura 3:

1. $^{125}I-Tx_1$ se liga com afinidades diferentes a mais de um sítio receptor na preparação sinaptosomais, indicando que o modelo matemático utilizado até então (um ligante e um aceptor) estava incorreto.
2. A marcação da toxina Tx_1 pelo método utilizado, origina mais de um derivado (como descrito acima), e que estes derivados devem possuir comportamentos cinéticos distintos.

Experimentos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que $^{125}\text{I-Tx}_1$, não purificada, apresenta apenas um sítio receptor na preparação sinaptosomal de córtex cerebral de rato (Bicalho, 1994). Diante deste resultado resolvemos considerar a segunda hipótese.

Provavelmente o processo de marcação de Tx_1 com ^{125}I origina mais de um derivado iodado, pois esta toxina apresenta 3 resíduos de tirosina, ver figura 8. Ainda não foram realizados estudos sobre estruturas superiores (secundária e terciária) desta toxina o que nos ajudaria a sugerir um possível perfil de marcação para esta toxina. Pode-se sugerir que os diferentes tipos de derivados produzidos seriam responsáveis pelos dois componentes observados na cinética de dissociação. A partir destas observações, decidimos purificar possíveis derivados obtidos na marcação de Tx_1 , visando-se obter um ligante adequado para os estudos cinéticos.

Vários são os métodos utilizados na separação dos derivados obtidos da marcação de peptídeos; a escolha depende das características químicas da molécula. Uma das metodologias mais eficientes de separação de derivados é a cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. Isso porque a incorporação dos átomos de iodo à molécula leva a uma modificação na hidrofobicidade da proteína. Esta alteração possibilita a separação da molécula nativa dos produtos de marcação. Derivados apresentando mais de um iodo por resíduo de tirosina eluem posteriormente aos derivados menos modificados (Hulme, 1992).

Visando a separação de pelo menos um dos possíveis derivados marcados de Tx_1 , $^{125}\text{I-Tx}_1$ foi submetida à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. O objetivo foi a obtenção de um derivado purificado que nos permitisse proceder a análise cinética da interação da toxina com os sítios aceptores,

O resultado obtido na cromatografia de $^{125}\text{I-Tx}_1$ em HPLC (figura 4), sugere que a marcação de Tx_1 produziu pelo menos dois derivados, ou duas populações de derivados radioativos diferentes ($^{125}\text{I-D}_1$ e $^{125}\text{I-D}_2$). O derivado $^{125}\text{I-D}_1$ (pico b) apresenta um comportamento cromatográfico ligeiramente diferente da toxina nativa (pico a), enquanto as modificações ocorridas em $^{125}\text{I-D}_2$ (pico c) parecem ser mais pronunciadas.

Pode-se sugerir que $^{125}\text{I-D}_1$ seja um derivado predominantemente monoiodado, pois apresenta tempo de retenção mais próximo ao da toxina nativa que $^{125}\text{I-D}_2$. Estes derivados podem ser caracterizados quanto à presença de monoiodotirosinas ou diiodotirosinas após tratamento com um coquetel de enzimas proteolíticas e subsequente análise comparativa do produto com padrões adequados, por cromatografia de fase reversa em HPLC (Marchot e colaboradores, 1988).

AELTSCFPVGHEDGDASNCNCCGDDVYCGCGWGRWNCKCKVADQSYAYGICKDKVNCNPNRHLWPAKVCKKPCRRREC

FIGURA 8- Sequência de aminoácidos da toxina Tx₁. A sequência primária da toxina Tx₁ está aqui representada. Destacado em vermelho estão os resíduos de Tirosina da toxina. Tais resíduos são aqueles que poderiam estar sujeitos a modificação por ¹²⁵I (Diniz e colaboradores, 1991).

De Lima e colaboradores (1989) utilizando técnicas semelhantes separaram derivados de duas toxinas de veneno de escorpião. Antes da purificação as toxinas marcadas apresentaram comportamento cinético anômalo, como o ocorrido com $^{125}\text{I-Tx}_1$, neste trabalho. A toxina $^{125}\text{I-Ts VII}$ (do escorpião *Tityus serrulatus*) se dissociava de uma preparação sinaptosomal de inseto de forma parcial. Quando utiliza-se um derivado purificado de $^{125}\text{I-Ts VII}$ a toxina mostrou-se indissociável do tecido, o que sugeriu uma ligação irreversível do ligante ao receptor. A toxina do escorpião *Androctonus australis*, AaHIT, após a marcação, apresentou curvas de dissociação bimodais, semelhantes as encontradas para $^{125}\text{I-Tx}_1$, em nossos experimentos. Um dos derivados, purificado de $^{125}\text{I-AaHIT}$ apresentou cinética com um único componente nas curvas de associação e dissociação.

A radioatividade específica para $^{125}\text{I-D}_1$, calculada como descrito em métodos, foi 306 cpm/fmol, e está de acordo com dados encontrados na literatura, para outras toxinas polipeptídicas. (p.e. Cruz e colaboradores, 1986; Muniz e colaboradores, 1990).

Os estudos cinéticos realizados com o derivado selecionado ($^{125}\text{I-D}_1$) mostram que este possui comportamento cinético distinto daquele de $^{125}\text{I-Tx}_1$ antes da purificação.

Experimentos de associação indicam que $^{125}\text{I-D}_1$ se associa ao receptor mais rapidamente que $^{125}\text{I-Tx}_1$ (figuras 2 e 5). $^{125}\text{I-D}_1$ atingiu a saturação em aproximadamente 5 minutos de incubação, enquanto o tempo de saturação com $^{125}\text{I-Tx}_1$ foi de aproximadamente 12 minutos. O k_{obs} calculado também foi distinto para as duas situações ($1,59 \pm 0,45 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para $^{125}\text{I-D}_1 - 6 \times 10^{-10} \text{ M}$ e $3,46 \pm 1,15 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para $^{125}\text{I-Tx}_1 - 5 \times 10^{-11} \text{ M}$).

Experimentos de dissociação mostram que $^{125}\text{I-D}_1$ se dissocia completamente do sítio receptor, ao contrário de $^{125}\text{I-Tx}_1$, que se deslocou apenas parcialmente (aproximadamente 60%). Estes dados apontam para a heterogeneidade de $^{125}\text{I-Tx}_1$ e para um provável derivado mais puro, no caso de $^{125}\text{I-D}_1$. O $t_{1/2}$ calculado para a dissociação de $^{125}\text{I-D}_1$ foi de $26,4 \pm 5,5$ minutos, e a constante cinética de dissociação foi de $4,7 \pm 1,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. A análise dos dados obtidos com $^{125}\text{I-D}_1$, por regressão linear, sugerem a presença de apenas um componente de associação ao receptor.

Os dados mostram ainda que o derivado $^{125}\text{I-D}_1$ se associa mais rapidamente aos sítios receptores e se dissocia lentamente, o que é traduzido na alta afinidade do derivado. O k_1 , a constante cinética de associação, foi calculada seguindo a equação:

$$L * k_{\text{obs}} = k_1 - k_{-1}$$

O valor calculado para k_1 foi $2,5 \pm 0,73 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Os dados obtidos nos experimentos cinéticos validam o modelo reversível proposto para a interação da toxina com os receptores na preparação cerebrocortical de rato:



Como descrito no apêndice deste trabalho, as constantes cinéticas de associação (k_1) e dissociação (k_{-1}) relacionam-se com a constante de dissociação no equilíbrio (K_d) da seguinte forma:

$$K_d = k_{-1}/k_1.$$

A partir desta relação calculou-se a constante de dissociação (K_d) de $1,9 \times 10^{-11} \text{ M}$.

Se o modelo empregado acima está correto, a constante K_d calculada a partir de experimentos cinéticos deve ser próxima ao K_d calculado a partir dos experimentos no equilíbrio.

Foram realizados experimentos no equilíbrio (curvas de saturação) com o derivado $^{125}\text{I-D}_1$ a fim de confirmar a validade dos dados obtidos nos experimentos cinéticos.

Como mostrado na figura 7, $^{125}\text{I-D}_1$ se liga aos sítios receptores de forma saturável. O K_d calculado a partir de experimentos de saturação foi de $2,2 \pm 0,98 \times 10^{-11} \text{ M}$.

O valor está em concordância com os calculados nos experimentos cinéticos ($1,9 \times 10^{-11}$ M), confirmando a validade do modelo de interação proposto para Tx1 (iodada) com os sítios receptores em córtex cerebral de rato.

Houve um aumento da afinidade (K_d) da toxina quando utilizou-se o derivado $^{125}\text{I-D}_1$. $^{125}\text{I-D}_1$, apresenta maior afinidade pelo receptor que $^{125}\text{I-Tx}_1$ como demonstra os valores de K_d . O K_d calculado para $^{125}\text{I-D}_1$ foi cerca de 10 vezes menor que o calculado para $^{125}\text{I-Tx}_1$ por Bicalho ($2,2 \times 10^{-11}$ M e $3,0 \times 10^{-10}$ M respectivamente). Esta diferença pode ser explicada pela presença de diferentes derivados de marcação em $^{125}\text{I-Tx}_1$, os quais estariam interferindo no cálculo acurado da constante K_d . Resultados semelhantes foram obtidos por De Lima e colaboradores (1989) para as toxinas de escorpião.

Nas condições experimentais utilizadas, o número máximo de sítios (B_{\max}) calculado foi de 354 ± 15 fmol/mg. Esses valores sugerem que $^{125}\text{I-D}_1$ apresenta baixa capacidade e alta afinidade.

O sítio receptor de Tx_1 em sistema nervoso central de rato ainda não foi identificado. Estudos indiretos realizados por Bicalho (1994), utilizando competidores conhecidos dos principais canais iônicos presentes no sistema nervoso central, demonstraram que $^{125}\text{I-Tx}_1$ não compete pelo sítio acceptor com os ligantes dos canais de sódio, cálcio ou potássio testados nos experimentos. Resultados semelhantes foram obtidos por Gouvêa dos Santos (1995, 1999) em sistema nervoso entérico de cobaias.

Estudos indiretos (competição) realizados recentemente em nosso laboratório mostram que $^{125}\text{I-D}_1$, não compete com ligantes de canais de sódio, potássio ou cálcio, pelo sítio de ligação, quando foram utilizados os seguintes ligantes:

1. Canais de sódio: TTx, Veratridina, TsTx, TsVII, PbTx-2,
2. Canais de Potássio: KTx, ChTx, α -Dtx, Apamina, TEA, 4-AP
3. Canais de cálcio: ω -CgTx GVIA, ω -conotoxina MVIIC, Diltiazem, Nifedipina, ω -Aga IVA,

Estes resultados conformam àqueles já mostrados por Bicalho para $^{125}\text{I-Tx}_1$ e sugerem que Tx_1 possui um alvo distinto daqueles dos ligantes testados.

Porém, outros experimentos também realizados em nosso laboratório fornecem evidências que Tx_1 se ligue a algum tipo de canal de cálcio. Tx_1 foi capaz de competir com $^{125}\text{I-}\omega\text{-CgTx GVIA}$ (ligante de canais de cálcio tipo N) com IC_{50} de 2,5 nM (De Lima, comunicação pessoal). Entretanto, este resultado isolado não nos assegura que Tx_1 possa atuar sobre outros tipos de canais de cálcio.

Os fortes efeitos excitatórios causados pela injeção intracerebroventricular da toxina (Rezende Jr, 1991) sugerem que esta seja um estimulador da neurotransmissão excitatória em sistema nervoso central. Entretanto, por si só, resultados apresentados ainda são insuficientes para esclarecer ação farmacológica de Tx_1 . Apesar dos indícios de que Tx_1 possa atuar sobre os canais de cálcio, ainda são necessários esforços para confirmar esta hipótese.

Este trabalho contribuiu para a determinação dos parâmetros cinéticos da interação da toxina Tx_1 com os receptores em preparação cerebrocortical de rato. Apesar de serem insuficientes para determinação direta dos mecanismos moleculares que acarretam os sintomas excitatórios, estes podem auxiliar na identificação do sítio acceptor e concorrer para a interpretação de possíveis resultados das ações farmacológicas (p.e. com técnicas eletrofisiológicas, ou farmacológicas) desta toxina.

CONCLUSÕES

10. Conclusões

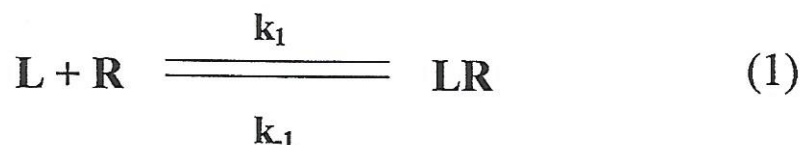
A partir deste trabalho concluiu-se que:

- $^{125}\text{I-Tx}_1$ constitui-se de uma mistura de derivados de marcação
- $^{125}\text{I-D}_1$, um dos derivados obtidos pela separação cromatográfica de $^{125}\text{I-Tx}_1$ da marcação de Tx_1 , se adequa ao modelo reversível de interação entre ligantes e receptores
- A partir da interação de $^{125}\text{I-D}_1$ com os receptores em preparação cerebrocortical de rato foi possível calcular os parâmetros cinéticos e de equilíbrio da reação:
 - k_1 foi $2,5 \times 10^7 \pm 0,73 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$
 - k_{-1} foi $4,7 \times 10^{-4} \pm 1,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
 - K_d calculado a partir dos dados cinéticos foi $1,9 \times 10^{-11} \text{ M}$
 - O K_d calculado a partir do equilíbrio foi $2,2 \pm 0,98 \times 10^{-11} \text{ M}$
 - O B_{max} foi $354 \pm 55 \text{ fmoles/mg}$ de proteínas
- $^{125}\text{I-D}_1$ se liga com alta afinidade (10 vezes maior que $^{125}\text{I-Tx}_1$) aos receptores na preparação cerebrocortical de rato
- A ligação é saturável e reversível.

APÊNDICE

8. Estudos diretos da interação entre receptores e ligantes.

O modelo mais simples de interação receptor – ligante assume que uma população homogênea de ligante interage com uma única população de receptores. Tal situação é descrita pela equação 1:



Onde R é a concentração de sítios receptores livre, L é a concentração de ligante livre LR é a concentração do complexo receptor-ligante, k_1 e k_{-1} são as constantes cinéticas de associação e dissociação, respectivamente.

Para que o modelo apresentado na equação 1 possa ser considerado adequado, devem ser observados alguns preceitos:

- 1- Todos os receptores devem ser igualmente acessíveis aos ligantes
- 2- Todos os receptores devem estar ou livres ou ligados ao ligante. Não é aceito ligação parcial.
- 3- A formação do complexo receptor-ligante não pode alterar, de forma permanente, nem o receptor nem o ligante
- 4- A ligação deve ser reversível.

A velocidade de formação do complexo receptor ligante é dado por:

$$V_f = k_1 * L * R \quad (2)$$

e a velocidade de dissociação do complexo receptor-ligante é dada por:

$$V_{dis} = k_{-1} * LR \quad (3)$$

onde V_f é a velocidade de formação do complexo, k_1 é a constante cinética de associação, L é a concentração do ligante livre, R é a concentração de sítios receptores, V_{dis} é a velocidade de dissociação do complexo receptor-ligante, LR é a concentração de complexo receptor ligante e k_{-1} é a constante cinética de dissociação.

Em equilíbrio, a velocidade de formação do complexo receptor-ligante é mesma velocidade de dissociação do complexo ($V_f = V_{dis}$).

Dessa forma:

$$\frac{[L] \cdot [R]}{[LR]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (4)$$

Nessas condições:

$$\frac{k_{-1}}{k_1} = K_d \quad (5)$$

Onde K_d é a constante de equilíbrio. K_d expressa a concentração do ligante que, em equilíbrio, ocupa 50% dos sítios receptores. Um valor alto de K_d significa baixa afinidade do ligante pelo sítio receptor enquanto um valor baixo de K_d significa que o ligante possui alta afinidade pelo sítio receptor.

8.1. Propriedades Cinéticas

A análise da cinética da interação entre um ligante e um receptor consiste em determinar a quantidade de ligante que se associa ao receptor ou dissocia do receptor em função do tempo.

8.1.1 Cinética de Associação

A velocidade de associação de um ligante a um receptor é determinada pela quantidade de ligante que se liga ao receptor em função do tempo. A constante de associação cinética pode ser calculada a partir da equação 6 (Motulsky, 1995):

$$B = B_{eq} \cdot (1 - e^{(-k_{obs} \cdot t)}) \quad (6)$$

onde B é a quantidade de ligante ligada ao receptor no tempo t , B_{eq} é a quantidade de ligante ligado ao receptor no equilíbrio, k_{obs} é a constante relacionada com a constante de associação k_1 e t é o tempo.

A equação 6 assume o seguinte preceito para ser válida:

- 1- A quantidade de ligante ligado ao receptor deve ser cerca de 10% da concentração total de ligante.

A vantagem da utilização da equação 6 é que não há necessidade da determinação independente do parâmetro B_{max} , que representa o número total de sítios receptores. Porém deve-se observar com atenção as condições exigidas para análise dos dados pela equação 6 pois se os dados não obedecerem os preceitos exigidos, a constante cinética de associação k_1 poderá ser erradamente calculada.

Como dito anteriormente, a constante k_{obs} pode ser relacionada com a constante k_1 e com a concentração do ligante. Isso se dá de acordo com a equação 7 (Weiland & Molinoff, 1981):

$$L * k_1 = (k_{obs} - k_{-1}) \quad (7)$$

, onde k_1 é a constante cinética de associação, k_{obs} é a constante cinética relacionada com a constante cinética de associação, k_{-1} é a constante cinética de dissociação e L é a concentração do ligante.

Quanto maior a concentração do ligante, maior o valor de k_{obs} e, conseqüentemente, menor será o valor de k_{-1} .

Uma forma alternativa de calcular a constante k_{obs} é pela análise por regressão linear dos dados obtidos, segundo a equação 8:

$$\text{Ln} \left[\frac{B_{eq}}{(B_{eq} - B)} \right] = k_{obs} \cdot t \quad (8)$$

O gráfico do lado esquerdo da equação 8 em função do tempo, obtido por análise dos dados pela equação 9, se os mesmos obedecerem o modelo descrito na equação 1, deve ser linear. Um gráfico bifásico ou curvilíneo implica em reações mais complexas, ou talvez seja determinado por uma população heterogênea de sítios receptores, populações heterogêneas de ligantes ou ainda por cooperatividade positiva ou negativa na interação. Pode-se ainda pensar em uma mudança conformacional no receptor induzida pelo ligante.

8.1.2. Cinética de Dissociação

Um experimento de dissociação mede a velocidade com que um ligante se dissocia do sítio receptor. Um experimento de cinética é importante para a caracterização do ligante e confirmar se o modelo descrito na equação 1 está sendo corretamente empregado (Motulzky, 1995).

A análise de regressão não-linear dos dados é feita aplicando-se a equação 9:

$$B = B_0 * (e^{-k_1 t}) \quad (9)$$

, onde B é a quantidade de ligante que permanece ligada ao receptor no tempo t , B_0 é a quantidade de ligante ligado ao receptor no tempo zero ($t=0$), k_1 é a constante cinética de dissociação e t é o tempo.

A completa reversibilidade da interação receptor-ligante é uma exigência para que o modelo seja empregado corretamente.

Pode-se também analisar os dados de experimentos de dissociação por regressão linear, segundo a equação 10:

$$\ln(B/B_0) = -k_1 * t \quad (10)$$

Se a interação entre o receptor e o ligante for completamente reversível, o gráfico do lado esquerdo da equação 10 em função do tempo, obtido na análise dos dados pela equação 10, deverá ser linear, com a inclinação representando a constante k_1 . Um gráfico bifásico ou curvilíneo pode ser resultado de uma interação complexa entre o receptor e o ligante. Também pode causar um gráfico não-linear a heterogeneidade do ligante, heterogeneidade dos sítios receptores ou ainda uma interação cooperativa.

Um outro parâmetro que pode ser calculado a partir dos dados obtidos em experimentos de dissociação é o $t_{1/2}$, que é o tempo em que metade do ligante se dissocia do sítio receptor. O $t_{1/2}$ pode ser calculado pela equação 11 a seguir:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_1$$

8.2. Propriedades no Equilíbrio

Experimentos de saturação são úteis para a análise da afinidade e do número de sítios de um ligante no equilíbrio. É importante determinar acuradamente se a interação entre o receptor e o ligante atingiu o equilíbrio. Também é importante determinar corretamente a ligação não-específica. Um cálculo equivocado da ligação não-específica pode levar a um erro na estimativa do número total de sítios ou indicar cooperatividade negativa.

A análise por regressão não-linear dos dados obtidos por experimentos de saturação pode ser feita pela equação 12 (Motulsky, 1995):

$$B = \frac{B_{\max} * L}{K_d + L} \quad (12)$$

, onde B é a concentração de complexo receptor ligante numa dada concentração de ligante, B_{\max} é a concentração total de sítios receptores, L é a concentração do ligante e K_d é a constante de dissociação no equilíbrio.

A utilização da equação 12 para análise dos dados de saturação deve obedecer a algumas exigências:

- 1- A ligação deve obedecer o modelo descrito na equação 1
- 2- A interação receptor-ligante deve estar em equilíbrio
- 3- Deve haver apenas uma população de receptores
- 4- A concentração de ligante livre após a interação atingir o equilíbrio deve ser considerada idêntica à concentração de ligante total
- 5- Não deve haver cooperatividade.

Pode-se também utilizar análise de regressão linear dos dados de saturação para calcular o K_d e o $B_{m\acute{a}x}$. Tal análise é feita pela equação de “Scatchard”, descrita na equação 13 (Scatchard, 1949):

$$\frac{B}{F} = - \frac{B}{K_d} + \frac{B_{m\acute{a}x}}{K_d} \quad (13)$$

onde B é a ligação específica, F é a concentração total de ligante, K_d é a constante de dissociação no equilíbrio e $B_{m\acute{a}x}$ é a concentração total de sítios.

Se a interação entre o receptor e o ligante obedecer o modelo descrito na equação 1, o gráfico resultante da análise dos dados pela equação 13 deve ser linear. Um gráfico bifásico ou curvilíneo pode representar uma interação mais complexa entre o receptor e o ligante, heterogeneidade de sítios receptores, heterogeneidade de populações de ligantes ou ainda por cooperatividade na interação receptor-ligante. Um gráfico curvilíneo ou bifásico também pode ser devido a uma determinação incorreta da ligação não-específica, o que leva a um erro também na estimativa da ligação específica. Se o equilíbrio não for alcançado, também há possibilidade de obtenção de um gráfico curvilíneo.

Antes do desenvolvimento das técnicas de análise de regressão não-linear em computadores, a análise dos dados por equação de “Scatchard” era uma forma mais simples de calcular o K_d e o $B_{m\acute{a}x}$. Porém, apesar dos gráficos de “Scatchard” serem úteis para visualização dos resultados, estes não são os mais adequados para análise dos dados. Isso ocorre, primeiro, porque os dados transformados não possuem uma distribuição normal em relação à reta; segundo, porque os desvios não são iguais para todos os pontos transformados e, terceiro, porque, na regressão de “Scatchard”, há uma alteração na relação entre os eixos X e Y, devido à necessidade de utilização do parâmetro B , eixo X, no cálculo de B/F , eixo Y. Por causa dos problemas listados, os valores de $B_{m\acute{a}x}$ e K_d calculados por regressão de “Scatchard” podem diferir dos dados calculados por regressão não-linear. Dessa forma, análise de dados por regressão não-linear oferecem resultados mais acurados, enquanto análises de regressão linear, como a análise por equação de “Scatchard”, oferecem dados aproximados (Motulsky, 1995).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12. Referências bibliográficas

ADAMS, M. E. TINS neurotoxins supplement. *TINS*, Abril, 1994.

ADAMS, E.A.; BINDOKAS, V.P.; HASEGAWA, L.; VENEMA, V.J. ω -Agatoxins: a novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom. *J. Biol. Chem.* **265** (2): 861-867, 1990.

ADAMS, M.E.; HEROLD, E.E.; VENEMA, V.J. Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom. *J. Comp. Physiol. A* **164**: 333-342, 1989.

ADAMS, M.E. & OLIVERA, B.M. Neurotoxins: overview of an emerging research technology. *TINS* **17** (4): 151-160, 1984.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. *Molecular Biology of the Cell*. 3ª edição Garland Publishing, Inc. N.Y., 1994.

ANTUNES, E.; MARANGONI, R.^a; BRAIN, S.D.; DE NUCCI, G. *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin *in vivo*. *Toxicon* **30** (9): 1011-1016, 1992.

ANTUNES, E.; MARANGONI R.A.; BORGES, N.C.C.; HYSLOP, S.; FONTANA, M.D.; DE NUCCI, G. Effects of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Braz. J. Med. Res.* **26**: 81-91, 1993.

ARAÚJO, D.A.M.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; BEIRÃO, P.S.L. Effects of toxic fraction PhTx2 from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium currents. *Naunin-Schmiederberg's Arch. Pharmacol.* **347**:205-208, 1993a

ARAÚJO, D.A.M.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; RICHARDSON, M.; BEIRÃO, P.S.L. A novel class of polypeptide toxin modifies sodium currents inactivation in isolated frog skeletal muscle. *J. Physiol*, **467**:365, 1993b.

ATKINSON, R.K.; WRIGHT, L.G. The mode of action of spider toxins on insect and mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* **102c** (3): 339-342, 1992.

BARNES, R.D. Zoologia dos Invertebrados. 4ª edição. Ed. Rocca, 1990

BARRIO, A. Spastic action of the venom of the spider *Phoneutria fera*. *Acta Physiol. Latinoam.* **5**: 132-143, 1955.

BENTO, A.C.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, B.; DE NUCCI, G. Identification of a new smooth muscle contracting polypeptide in *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Biochem. Pharmacol.* **46** (6): 1092-1095, 1993.

BENTO, A.C.; REGO, E.; PEDROSO-MARIANO, R.; MANCUSO, L.C.; GIGLIO, J.R.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; CARACELLI, I.; OLIVEIRA, B.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Isolation of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom responsible for the increased vascular permeability in rabbit skin. *Toxicon* **33**: 171-178, 1995.

BICALHO, A.F.X. Estudo da interação da toxina Tx1 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* com sistema nervoso de mamífero. Tese de Mestrado, 1994. Depto de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG.

BLASBGROUGH, I. S.; MOYA, E.; TAYLOR, S. Polyamines and polyamines amides from wasps and spiders. *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 888-893, 1994.

BOWERS, C. W.; PHILLIPS, H. S.; LEE, P.; JAN, Y. N.; JAN, L. Y. Identification and purification of an irreversible presynaptic neurotoxin from the venom of the spider *Hololena curta*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **84**: 3506-3510, 1987.

BRANTON, W. D.; KOLTON, L.; JAN, Y. N.; JAN, L. Y. Neurotoxins from *Plectreurys* spider venom are potent presynaptic blockers in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **7**(12): 4195-4200, 1987.

- BRAZIL, V. & VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. *Mem. Inst. Butantan*, 1-70, 1925.
- BUCHERL, W. *Acúleos que matam*. 4ª ed. Livraria Cosmos Editora, Rio de Janeiro, 1980.
- CASSOLA, A.C.; JAFFE, H.; FALES, H.M.; AFECHE, S.C.; MAGNOLLI, F.; CIPOLLA, J. ω -Phonetoxin-IIA: a calcium channelblocker from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Plügers Arch.* 436: 545-552, 1998.
- CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; VALENTIN, A.C.; Von EICKSTED, V.R.D.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. The purification and amino acid sequence of four Tx2 neurotoxins from the venom of the brazilian spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Letts*, 310 (2): 153-156, 1992.
- CORDEIRO, M.N.; FIGUEIREDO, S.G.; VALENTIN, A.C.; DINIZ, C.R.; Von EICKSTED, V.R.D.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. The purification and amino acid sequence of the six Tx3 type neurotoxins from the venom of the brazilian "armed spider" *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* 31 (1):35-42, 1993
- COSTA, S.K.P.; MORENO Jr., H; BRAIN, S.D.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. The effect of *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom on arterial blood pressure of anaesthetised rats. *Eur. J. Pharmacol.* 298: 113-120, 1996.
- CRUZ, L.; OLIVERA, B. M. Calcium channel antagonists. Omega -conotoxin defines a new high affinity site. *J. Biol. Chem.* 261: 6230-6232, 1986.
- DE LIMA, M. E.; MARTIN, M. F.; DINIZ, C. R.; ROCHAT, H. *Tityus serrulatus* toxin VII bears pharmacological properties of both beta-toxin and insect toxin from scorpion venoms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139 (1): 296-302, 1986.
- DE LIMA, M.E.; COURAUD, F; LAPIED, B.; PELHATE, M.; DINIZ, C.R.; ROCHAT, H. Photoaffinity labeling of scorpion toxin receptors associated with synaptosomal sodium channels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 151: 187-192, 1988.

DE LIMA, M.E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F.; HUE, B.; LORET, E.; DINIZ, C.R.; ROCHAT, H. On the binding of two scorpion toxins to the central nervous system of cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* 19(4): 143- 422, 1989.

DINIZ, C.R. Separação de proteínas e caracterização de substâncias ativas em venenos de aranhas do Brasil. *Anais Acad. bras. Ciênc.* 35:283-291, 1963

DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; RESENDE Jr., L.; KELLY, P.; FISHER, S. REIMANN, F.; OLIVEIRA, E.B.; RICHARDSON, M. The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Lett.* 263: 251-253, 1991.

DINIZ, M.R.V.; PAINE, M.J.I.; DINIZ, C.R.; THEAKSTON, D.G.; CRAMPTON, J.M. Sequence of the cDNA coding for the neurotoxic protein Tx1 from the brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* predicts the synthesis and proceeding of a preprotoxin. *J. Biol. Chem.* 268 (21): 15340-15342, 1993.

EISNER, T. MAINWALD, J. Chemical ecology. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 1, 1995.

ENTWISTLE, I.D.; JOHNSTONE, R. A.; MEDZIHRADESKY, D., MAY, T. E. 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: 1059-1067, 1982.

FIGUEIREDO, S.G.; LIMA PEREZ-GARCIA, M.E.; VALENTIM, A.C.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; RICHARDSON, M. The purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4 (6-1) from the venom of the "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* 33: 83-93, 1995.

FIGUEIREDO, S. G.; DE LIMA, M. E.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; PATTEN, D.; HALLIWELL, R. F.; GILROY, J. RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of highly insecticidal toxin from the venom of the Brazilian spider *Phoneutria*

nigriventer which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurons. *J. neurochem.*, 1999 (submetido)

FONTANA, M.D.; BRAZIL, O.V. Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated frenic nerve -diaphragm of rat. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **18**: 557-565, 1985.

GRAY, E.G.; WHITTAKER, V.P. The isolation of nerve endings from brain: an electron microscopic study of cell fragments divided by homogenization and centrifugation. *J. Anat.* **96**: 79, 1962.

GRISHIN, E. V. Black widow spider toxins: the present and the future. *Toxicon* **36** (11): 1693-1701, 1998.

GORDON, D.; ZLOTKIN, E. Binding of alfa scorpion toxin to insect sodium channels is not dependent on membrane potential. *FEBS Lett.* **315** (2): 125-128, 1993.

GOUVÊA DOS SANTOS, R. Interação da toxina Tx1 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* com plexo-mioentérico-músculo longitudinal do íleo de cobaia e seu efeito sobre a liberação de ³H-Acetilcolina. Tese de Mestrado, 1995. Depto. de bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG.

GOUVÊA DOS SANTOS, R.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; DE LIMA, M. E. Binding sites and the actions of Tx1, a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer* venom, in guinea pig ileum. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999, in press.

GUATIMOSIN, C.; ROMANO-SILVA, M.A.; CRUZ, J.S.; BEIRÃO, P.S.L.; KALAPOTHAKIS, E.; MORAES-SANTOS, T.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; GOMEZ, M.V.; PRADO, M.A.M. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Brithish J. Pharmacol.* **122**: 591-597, 1997.

HARTSHORNE, R.P.; CATTERAL, W. A. The sodium channel from rat brain. *J. Biol. Chem.* **259** (3): 1667-1675, 1984

- HEITZ, J.R.; NORMENT, R. Characterizatics of na alkaline phosphatase activity in bron recluse venom. *Toxicon* **12**: 181-187, 1974.
- HILLE,B. Ionic channels of excitable membranes. 2^o ed. Sinauer, 1992.
- HULME, E.C. Receptor-Ligand Interaction: A practical Approach. Oxford University Press Inc. N.Y., 1992
- JACKSON, H.; USHERWOOD, N. R. Spider toxins as tool for dissecting elements of excitatory amino acid transmission. *TINS* **11** (6): 278-283, 1988.
- KEMP, G.; MORLEY, B.; BRADLEY, R. J.; Purification and characterization of nicotinic acetylcholine receptors from muscle *membr.* *Biochem.* **3**(3): 229-257, 1980.
- LUCAS, S. Spiders in Brazil. *Toxicon* **26**: 759-772, 1988.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. I.; FAAR, A. L. RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275, 1951.
- MAFRA, R.A.; FIGUEIREDO, S.G.; DINIZ; C.R.; CORDEIRO; M.N.; CRUZ, J.; De LIMA, M.E. PhTx4, a new class of toxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom, inhibits the glutamate uptake in the rat brain synaptosomes. *Brain Research* **831**: 297-300, 1999.
- MAINWALD, J; EISNER, T. The chemistry of phyletic dominance. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **92**: 14-18 1995.
- MARANGONI, S.; BORGES, N.C.C.; MARANGONI, R.A.; ANTUNES, E.; VIEIRA, C.A.; NOVELLO, J.C.; DOMONT, G.B.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, B.; DE NUCCI, G. Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. *Toxicon* **31**:337-384, 1993.

MARCHOT, P. FRACHON, P. BOUGIS, P. Selective distinction at equilibrium between the two α -neurotoxin binding sites of *Torpedo* acetylcholine receptor by microtitration. *Eur. J. Biochem.* **174**: 537-542, 1988.

MARTIN-MOUTOT, N.; COURAUD, F.; HOUZET, E.; BERWALD-NETTER, Y. High affinity binding of α -scorpion toxin: a neuronal property. *Brain Research* **274**: 267-274, 1983.

MARTIN-MOUTOT, M.; LEVEQUE, C.; COURAUD, F. Characterization of the ω -conotoxin-binding molecule in rat brain synaptosomes and cultured neurons. *Mol. Pharmacol.* **34**(2): 87-90, 1988.

MATAVEL, A. C. S. Tx2-6, uma toxina da aranha *Phoneutria nigriventer* que modifica os canais de sódio sensíveis à voltagem. Tese de Mestrado, 1999.

MELLO-LEITÃO, C. Contribution a l'etude des Ctenidae du Bresil. *Festschr Strand* **1**: 589, 1936

MISSLER, M.; FERNANDEZ-CHACON, R.; SÚDORF, T. C. The making of neurexins. *J. Neurochem.* **71** (4): 1339-1347, 1998.

MOTULSKY, H. *The GraphPad® Guide to Analyzing Radioligand Binding Data*. GraphPad® Software, Inc. San Diego, 1995.

MUNIZ, Z. M.; DINIZ, C. R.; DOLLY, J. O. Characterization of binding sites for δ -dendrotoxin in guinea-pig synaptosomes: relationship to acceptors for the K^+ -channel probe α -dendrotoxin. *J. Neurochem.* **54**: 343-346, 1990.

PALFRAMAN, R.T; COSTA, S.K.P.; WILSONCROFT, P.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; BRAIN, S.D. The effect of a tachykinin NK1 receptor antagonist, SR 140333, on oedema formation induced in rat skin by venom from the *Phoneutria nigriventer* venom. *British. J. Pharmacol.* **118**: 295-298, 1996.

PRADO, M.A.M.; GUATIMOSIN, C.; GOMEZ, M.V.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; ROMANO-SILVA, M.A. A novel tool for investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem. J.* **314** (Pt1): 145-150, 1996

REZENDE Jr., L.; CORDEIRO, M.N.; OLIVEIRA, E.B.; DINIZ, C.R. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* **29**(10): 1225-1233, 1991.

RESENDE Jr, L. Separação de polipeptídeos tóxicos do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (aranha armadeira). **Tese de doutorado**, UFMG, Belo Horizonte, M.G., 1992.

ROCHAT, H.; TESSIER, M.; MIRANDA, F.; LISSINTZKY, S. Radiodination of scorpion and snake toxins. *Analy. Biochem.* **82**: 532-548, 1977.

ROMANO-SILVA, M.A.; RIBEIRO-SANTOS, R.; RIBEIRO, A.M.; GOMEZ, M.V.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; BRAMMER, M.J. 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.* **296**: 313-319, 1993.

ROSENTHAL, L.; MELDOLESI, J. α -Latrotoxin and the related toxins. *Pharmacol. Ther.* **42**: 115-134, 1989).

ROSENTHAL, L.; ZACCHETTI, D.; MADEDDU, L.; MELDOLESI, J.; Mode of action of α -latrotoxin: role of divalent cations in Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent effects mediated by the toxin. *Mol. Pharmacol.* **38** (4): 917-923.

SCATCHARD, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**: 525-532, 1949.

- SCHANBACHER, F. L.; LEE, C. K.; HALL, J. E.; WILSON, I. B.; HOWELL, D. E.; ODELL, G. V. Composition and properties of tarantula *Dugesiella hentzi* (girard) venom. *Toxicon* 11: 21-29, 1973.
- SCHENBERG, S.; PEREIRA-LIMA, F.A. Pharmacology of the polypeptides from the venom of the spider *Phoneutria fera*. *Mem. Inst. Butantan*, 33 (2): 627, 1966.
- SCHENBERG, S.; PEREIRA-LIMA, F.A. *Phoneutria nigriventer* venom. In: *Venomous Animals and their Venoms* (BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E.E., Eds.) Vol. 3: 279-297, 1971.
- SCHENBERG, S.; PEREIRA-LIMA, F.A. Venom of Ctenidae. In: *Arthropod venoms*. (Bettini, s., Ed. N.Y.: Springer):217-245, 1976.
- SCHULZ, S. The chemistry of spider toxins and silk. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37: 314-326, 1997)
- SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERTS, R.W.; MOLINOFF, P.B. Receptors and signal transduction: classification and quantitation. in: *Basic neurochemistry*, pp. 209-230, Raven Press, 1994
- STAPLETON, A.; BLANKENSHIP, D. T.; ACKERMANN, B. L.; GORDER, G. W.; MANLEY, G. D.; PALFREYMAN, M. G.; COUTANT, J. E.; CARDIN, A. D. Curtatoxins: neurotoxic insecticidal polypeptides isolated from the funnel-web spider *Hololena curta*. *J. Biol. Chem.* 265 (4): 2054-2059, 1990.
- VITAL BRAZIL, O. Spider venoms acting on the sodium channels. *Mem. Inst. Butantan* 49 (1): 25-33, 1987.
- VITAL BRAZIL, O.; LEITE, G. B.; FONTANA, M. D. Modo de ação da peçonha de *Phoneutria nigriventer* (Kerserling, 1891), nas aurículas isoladas de cobaia. *Ciência e Cultura* 40(2): 181-185, 1988.

WEILAND, G. A.; MOLINOFF, P.B. Quantitative analysis of drug-receptor interaction: I. Determination of kinetic and equilibrium properties. *Life Sciences* 29: 313-330, 1981.