

Ana Cristina do Nascimento Pinheiro

**EFEITO DAS NEUROTOXINAS DA ARANHA *PHONEUTRIA*
NIGRIVENTER NA ISQUEMIA CEREBRAL *IN VITRO***

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular**

**BELO HORIZONTE
2007**

Ana Cristina do Nascimento Pinheiro

**EFEITO DAS NEUROTOXINAS DA ARANHA *PHONEUTRIA*
NIGRIVENTER NA ISQUEMIA CEREBRAL *IN VITRO***

Tese submetida ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientador: Marcus Vinícius Gomez

Co-Orientadores: Prof. André Ricardo Massensini

Prof^ª. Cristina Guatimosim Fonseca

**BELO HORIZONTE
2007**

“The advantage of a bad memory is that one enjoys several times the same good things for the first time.”

Friedrich Nietzsche

Dedico essa tese

À minha primeira incentivadora em buscar conhecimento.....

Maria de Fátima Dutra Teixeira

Agradecimentos

Ao Professor Marcus Vinícius Gomez, pela sua enorme contribuição científica e pessoal para o desenvolvimento deste trabalho. A convivência com você durante esses anos foi especialmente agradável e proveitosa. Sua maneira de conduzir a pesquisa faz com que todas as pessoas ao seu redor se tornem apaixonadas pelo mundo científico! Obrigada por tudo!

Ao Professor André Ricardo Massensini, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelas discussões científicas e pela paciência! Ser sua co-orientanda foi um grande prazer! Como eu já havia dito anteriormente, você é uma pessoa admirável!

À Professora Cristina Guatimosim Fonseca, primeiramente pela acolhida no laboratório de Neurofarmacologia. Obrigada pelos seus ensinamentos científicos, pela sua disponibilidade em discutir resultados e pelo seu carinho em nossas conversas...É um privilégio conviver com você!

Ao Professor Helton Reis, pela sua contribuição científica!

Ao Prof. Luiz Armando De Marco e ao Prof. Marco Aurélio Romano Silva pela ótima convivência e pelos ensinamentos científicos!

À Prof. Wolfanga pela convivência e pelos vários ensinamentos e contribuição científica. Você é um grande exemplo!

Ao Prof. Marco Antônio Máximo Prado pela contribuição científica!

Ao Prof. Renato Santiago Gomez, pela convivência agradável e pela eterna orientação...

À Prof.^a Maria de Fátima Leite pelas várias discussões e viagens ao mundo cálcio intracelular! Obrigada pelo grande apoio pessoal!

Agradeço a minha irmã Karla, por ter me acompanhado de perto, nos momentos mais difíceis deste trabalho.....Sem você esse trabalho não teria sido realizado.....

Aos meus pais, pela mágica da minha existência!

Ao meu irmão Paulo, pelo carinho, pela doçura em cada palavra comigo, enfim, por me amar tanto!!!!

A minha irmã Fernanda pelo amor, cuidado e por iluminar minha vida com esse sorriso mais lindo do mundo!!!!

Aos meus sobrinhos: Isabella, Isadora e Gabriel, por enfeitar e colorir minha vida!!!!

A minha avó querida por todo carinho

Ao meu grande amor, Flávio, pelo amor, cuidado, carinho e tranquilidade! Você chegou para que eu pudesse descobrir o que é ser amada de verdade....Eu te amo muito!!!!

À minha família 2, Ariana, José Maria, Daniel, Alana, Augusto e Vanessa, obrigada pela acolhida.....

A minha grande amiga karina, por todos os bons momentos e pela intensa ajuda!!!

Ao meu grande amigo Stéfany, pelo apoio incondicional, carinho e por escutar minhas reclamações freqüentes!!!!

À Luciene pelo carinho de irmã e pela ajuda científica....

Ao Bruno Resende, pela amizade sincera, pelo carinho e pela ajuda científica....

Ao Allan, meu filho querido, obrigada pela sua presença e pelo equilíbrio....

À Karen e a Alexa pelo carinho....

À Janice, Melissa e Grace pela ajuda científica, pelo carinho e amizade....

À Dani pela grande ajuda e pelos bons momentos de convivência e descontração...

Às minhas amigas que estão longe, mas que participaram ativamente deste trabalho, Fabíola, Aninha e Lucimar, obrigada pelo carinho e amizade.

Ao meu grande amigo e irmão Alexandre pelo carinho e ajuda no desenrolar da minha tese...Muito obrigada!

Aos meus amigos do laboratório de neurofarmacologia: Alessandra Bá, Fabi (pela sua doçura), Eloah Gambogi, Paulo Henrique, Célio de Castro, Bráulio Marcone, Monalise Costa Batista, Mateus Gurerra, Adriane Pereira, Nanci, Cristina Martins, Cristiane Menezes, Magda Santos, Patrícia, Virgínia Vidigal, Fernanda Vidigal, Rodrigo Santiago Gomez, Bruno Pinheiro, Píndaro Dias Massote, Rafael Augustini, Débora Marques, Danuza Gontijo pela paciência e amizade.

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

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

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Isquemia Cerebral	2
1.2. Cascata Isquêmica	4
1.3. Transmissão Glutamatérgica	5
1.4. O Papel do Glutamato na Excitotoxicidade	8
1.5. Aspectos básicos da Sinalização de Cálcio Intracelular	9
1.6. Papel do Cálcio na isquemia cerebral:	13
1.7. Uso de agentes neuroprotetores na isquemia cerebral:	16
1.8. Uso de toxinas animais como agentes terapêuticos	18
1.9. Estrutura e Farmacologia das neurotoxinas do veneno das aranhas	19
1.10. Características da aranha Phoneutria nigriventer e ações do seu Veneno	21
2. OBJETIVOS	26
2.1. objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Material	29
3.1.1. Drogas e Reagentes	29
3.1.2. Equipamentos	30
3.1.3. Soluções	31
3.2. Métodos	33
3.2.1. Purificação das toxinas	33
3.2.2. Preparação das Fatias de Hipocampo	33
3.2.3. Procedimentos na Câmara de Perfusão	33
3.2.4. Determinação da viabilidade celular nas Fatias de Hipocampo de Ratos	36
3.2.5. Obtenção das imagens no Microscópio Confocal	36
3.2.6. Quantificação das imagens obtidas no microscópio confocal	37
3.2.7. Preparação das Fatias de Córtex:	37
3.2.8. Ensaio para liberação contínua de glutamato	38
3.2.9. Preparação das fatias de hipocampo para o ensaio de caspase-3	39
3.2.10. Ensaio fluorimétrico para a quantificação de caspase-3	39

3.2.11. Células SN56:	40
3.2.12. Meio de crescimento das células SN56	40
3.2.13. Cultura das células SN56	40
3.2.14. Procedimentos na camara de perfusão utilizando as células SN56	41
3.2.15. Determinação da viabilidade celular nas células SN56	41
3.3. Reprodutibilidade e análise estatística dos resultados.	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Padronização do Modelo Experimental	44
4.2 A fração PhTX3 apresentou neuroproteção superior à ω -conotoxina GVIA e à ω -conotoxina MVIIC	49
4.3 A neurotoxina TX3-4 apresentou neuroproteção superior a neurotoxina TX3-3 no modelo de isquemia cerebral <i>in vitro</i> .	56
4.4 As neurotoxinas TX3-3 e TX3-4 apresentaram neuroproteção até 1h após o evento isquêmico instalado no modelo de isquemia cerebral <i>in vitro</i> .	59
4.5 O cálcio intracelular apresenta papel importante no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i> :	63
4.5.1 O cálcio proveniente do retículo endoplasmático através da participação dos receptores de IP3 está envolvido no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	63
4.6 Liberação de glutamato durante o processo de isquemia cerebral	68
4.7 Quantificação do processo apoptótico durante o processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	73
5. DISCUSSÃO	76
5.1 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL:	77
5.2. A fração PhTX3 e as toxinas TX3-3 e TX3-4 do veneno da aranha Phoneutria nigriventer apresentaram efeito neuroprotetor significativo	81
5.3 O cálcio intracelular participa do processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	84
6. CONCLUSÃO	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
8. ANEXOS	116

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de cálcio
[K ⁺] _e	Concentração extracelular de potássio
[Na ⁺] _i	Concentração intracelular de sódio
2-APB	2- aminoetoxidifenil borato
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5methyl-4-isoxazolepropionic acid
ATP	Adenosina trifosfato
EGTA	Ácido etileno glicol-bis(β-aminoetil éter) N,N,N',N' -tetraacético
Glu	Glutamato
IgluR	Receptor ionotrópico de glutamato
IP3	Inositol 1,4,5 trifosfato ou trifosfato de inositol
IP3R	Receptor de IP3
ACSF	Artificial Cerebral Spinal Fluid
Mg	Miligrama(s)
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
NMDA	N-metil-D-aspartato
Ry	Rianodina
RyR	Receptor de rianodina
SNC	Sistema Nervoso Central
TTX	Tetrodotoxina
μL	Microlitro(s)
μM	Micromolar
ωMVIIC	Omega conotoxina MVIIC
ωGVIA	Omega conotoxina GVIA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Purificação das toxinas	35
Figura 2- Fatias de hipocampo controle e após o processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	45
Figura 3- Efeito da redução de cálcio no meio extracelular no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	47
Figura 4- Efeito da tetrodotoxina no processo de isquemia no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	48
Figura 5- Efeito da ω -conotoxina GVIA no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	50
Figura 6- Efeito da ω -conotoxina MVIC no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	51
Figura 7- Efeito da fração PhTX3 no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	52
Figura 8- Imagem das células SN56 antes e após o processo de isquemia <i>in vitro</i>	54
Figura 9- Efeito das toxinas PhTX3, ω -conotoxina GVIA e ω -conotoxina MVIC no processo de isquemia em células SN56	55
Figura 10- Efeito da toxina TX3-3 no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	57
Figura 11- Efeito da toxina TX3-4 no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	58
Figura 12- Efeito das toxinas Tx3-3 e TX3-4 em diferentes intervalos de tempo após o processo de isquemia instalado	61
Figura 13- Efeito das toxinas TX3-3 e TX3-4 após 90 e 120 minutos do processo de isquemia instalado	62

Figura 14- Efeito do BAPTA-AM no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	65
Figura 15- Efeito do dantroleno no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	66
Figura 16- Efeito do 2-APB no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	67
Figura 17- Efeito da redução de cálcio extracelular na liberação de glutamato no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	70
Figura 18- Efeito da ω -conotoxina GVIA, ω -conotoxina MVIIC, PhTX3, TX3-3 e TX3-4 na liberação de glutamato no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	72
Figura 19- Efeito da ω -conotoxina GVIA, ω -conotoxina MVIIC, PhTX3, TX3-3 e TX3-4 na quantificação de caspase-3 no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	74
Figura 20- Efeito do BAPTA-AM, 2-APB e dantroleno na quantificação de caspase-3 no processo de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	75

RESUMO

O papel dos bloqueadores de canais de cálcio em condições isquêmicas vem sendo investigado e descrito na literatura. A fração PhTX3 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* é um bloqueador de canais de cálcio de amplo espectro que inibe a liberação de glutamato, a captação de cálcio e também a recaptação de glutamato em sinaptossomas. A fração PhTX3 contém 6 isotoxinas: TX3-1 a TX3-6. Algumas dessas isotoxinas bloqueiam canais de cálcio do tipo –P/Q e outros canais de cálcio do tipo –N. Com essa ação, essas isotoxinas inibem a captação de cálcio e a liberação de neurotransmissores. As toxinas TX3-3 e TX3-4 inibem canais de cálcio do tipo –P/Q e a liberação de glutamato. Além disso foi demonstrado que a toxina TX3-4 inibe a liberação de glutamato independente de cálcio, via o transportador de glutamato. Em nosso trabalho demonstramos que a fração PhTx3 (1µg/mL) foi capaz de conferir neuroproteção ($82 \pm 4.1\%$) em um modelo experimental in vitro utilizando fatias de hipocampo cerebral de ratos e células SN56 submetidas ao evento isquêmico. As isotoxinas TX3-3 (8nM) e TX3-4(8nM) também apresentaram efeito neuroprotetor ($77 \pm 3.8\%$ e $68 \pm 4.2\%$) respectivamente utilizando fatias de hipocampo cerebral de ratos submetidas ao evento isquêmico. A fração PhTX3 e as toxinas TX3-3 e TX3-4 apresentaram efeito neuroprotetor até 1 hora após o evento isquêmico instalado. Esse efeito foi significativamente reduzido após 1 hora e 30 minutos do evento isquêmico instalado e não foi observado efeito neuroprotetor significativo após 2 horas.

O papel do cálcio intracelular no processo isquêmico também foi investigado em nosso trabalho. Foi observado que o BAPTA-AM e o 2-APB apresentaram neuroproteção ($55 \pm 2.9\%$ e $45 \pm 2.4\%$) respectivamente. Não observamos efeito neuroprotetor utilizando dantroleno. Assim podemos sugerir que o cálcio intracelular

liberado a partir dos estoques intracelulares sensíveis aos receptores IP3 participam do processo de morte celular na isquemia cerebral in vitro. Além disso, observamos que as ferramentas farmacológicas utilizadas para reduzir a quantidade de cálcio intracelular (BAPTA-AM, 2-APB e dantroleno) foram capazes de reduzir a atividade de caspase-3 (115 ± 4.32 , 136 ± 5.6 e 157 ± 5.85 nmol/mg de proteína) respectivamente, comparado com as fatias de hipocampo submetidas à isquemia sem adição de compostos testes (227 ± 5.4 nmol/mg de proteína). Realizamos os mesmos experimentos com a fração PhTX3 e as toxinas TX3-3 e TX3-4 e não observamos redução significativa na atividade de caspase-3 (203 ± 4.7 , 210 ± 3.35 e 212 ± 3.37 nmol/mg de proteína) respectivamente, comparado com as fatias submetidas à isquemia sem adição de compostos testes (223 ± 4.7 nmol/mg de proteína).

Diante dos nossos resultados, podemos concluir que as toxinas presentes no veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (fração PhTX3, TX3-3 e TX3-4) apresentaram efeito neuroprotetor significativo, mostrando ser uma nova classe de agentes terapêuticos com grande potencial de utilização nos casos de isquemia cerebral.

ABSTRACT

The role of calcium channel blockers in ischemic conditions has been studied and described in literature. The PhTx3 fraction of the venom of *Phoneutria nigriventer* spider is a broad spectrum calcium channel blocker, which inhibits glutamate release and calcium uptake in synaptosomes. The PhTx3 fraction contains six isotoxins: Tx3-1 to Tx3-6. Some of these isotoxins block calcium channels type -P/Q, and other blocks the N-type calcium channels. With this action, these isotoxins inhibit calcium uptake and the release of neurotransmitters. The Tx3-3 and Tx3-4 toxins inhibit calcium channels type -P/Q and the release of glutamate. It was also shown that the Tx3-4 toxin inhibit calcium-independent glutamate release via glutamate transporter. In our work we demonstrated that the PhTx3 (1µg/mL) was capable of providing neuroprotection (82±4.1%) in an experimental *in vitro* model using hippocampal slices of rats submitted to ischemic event. The PhTx3 fraction and the Tx3-3 and Tx3-4 toxins presented neuroprotector effect up to one hour after the ischemic event was induced. This effect was significantly reduced after one hour and thirty minutes after the ischemic event and no significant neuroprotection was observed after two hours.

The role of intracellular calcium was also investigated in our work. It was observed that the BAPTA-AM and the 2-APB presented neuroprotection (55±2.9% and 45±2.4%), respectively. No neuroprotection was observed using dantrolene. Thus we may suggest that intracellular calcium released from intracellular stocks sensible to IP3 is involved in the process of cellular death in brain ischemia *in vitro*. Furthermore, we observed that the pharmacological tools used to reduce the amount of intracellular calcium, BAPTA-AM, and blockers of intracellular calcium 2-APB and

dantrolene were able to reduce the caspase-3 activity of the ischemic tissue (115 ± 4.32 , 136 ± 5.6 e 157 ± 5.85 nmol/mg of proteina), respectively, compared to the hippocampal slices submitted to ischemia without the addition of test compounds (227 ± 5.4 nmol/mg of protein). On the same experiments with the PhTx3 fraction and the Tx3-3 and Tx3-4 toxins no significant reduction on the caspase-3 activity (203 ± 4.7 , 210 ± 3.35 e 212 ± 3.37 nmol/mg of protein), respectively, was observed when compared to the ischemia submitted slices without the addition of test compounds (223 ± 4.7 nmol/mg de proteína). Thus we concluded calcium channels are not involved in the caspase activity while blockers of intracellular calcium stores reduced the caspase-3 activity on brain ischemia.

Based on our results, we can conclude that the toxins present on the Phoneutria nigriventer spider venom (PhTx3 fraction, Tx3-3 and Tx3-4) showed significant neuroprotection of brain ischemia and thus have potential as a new class of therapeutical agents to be used on brain ischemia.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. ISQUEMIA CEREBRAL

As desordens cerebrais que envolvem processos isquêmicos são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma das principais causas de morte depois das doenças cardiovasculares e das neoplasias. Muitos pacientes após o processo isquêmico sofrem com algumas seqüelas motoras, emocionais e intelectuais durante anos. Assim, torna-se necessário o estudo de tratamentos para erradicar essas seqüelas ou melhorar a sobrevivência destes pacientes (GERT, 1997).

A incidência de processos isquêmicos é de aproximadamente 1 pessoa a cada 1000 (PULSINELLI, 1995 e RICCI e cols., 1991). Entretanto, isto depende da idade, do sexo e de outros fatores externos, como o tabagismo, sedentarismo e comorbidades. A taxa de incidência em pessoas com 80 anos ou mais é cerca de 20 pessoas em 1000 (KNOLLEMA, 1995). A taxa de incidência é maior em homens em todos os grupos de idade. Dentre as pessoas que sofrem com algum tipo de processo isquêmico, 20% morrem na primeira semana e 33% morrem no primeiro ano. Essa taxa de mortalidade é alta, além disso, 2/3 dos pacientes que sobrevivem a algum tipo de evento isquêmico permanecem com seqüelas físicas e neurológicas causadas pela neuropatologia durante anos (PULSINELLI, 1995 e RICCI e cols., 1991).

A isquemia cerebral pode ser global ou focal. Um exemplo típico de isquemia focal é a oclusão de um determinado vaso; na isquemia global todo o cérebro é acometido, como na hipotensão prolongada (GERT, 1997).

A gravidade da lesão cerebral durante a isquemia depende do seu tempo de duração, da localização da oclusão vascular, da presença da circulação colateral e de medidas de proteção ao cérebro isquêmico (GERT, 1997).

A patogênese da isquemia cerebral resulta da diminuição do fluxo sanguíneo em determinada região. Esse processo é acompanhado por uma redução da quantidade de oxigênio e glicose, culminando assim em uma crise celular energética. Como estratégia final para prevenir a morte celular, as células que estão na área isquêmica começam a iniciar o processo de glicólise anaeróbica. Entretanto esta fonte energética obtida através da via anaeróbica oferece pequena quantidade de energia para manter a sobrevivência neuronal (GERT, 1997).

Essa “crise energética” interrompe a atividade de vários mecanismos vitais celulares, incluindo primeiramente as bombas iônicas que dependem de energia para a sua funcionalidade. Paralelo a isso há um aumento da concentração de íons, principalmente aumento da concentração de cálcio intracelular e de potássio extracelular. Há aumento da concentração de neurotransmissores, principalmente de glutamato, tais eventos culminam em edema e morte celular (GERT, 1997). Após o insulto isquêmico, ocorre o retorno do fluxo sanguíneo, período denominado como reperfusão. A reperfusão de um tecido isquêmico restaura o aporte de oxigênio e glicose. A fosforilação oxidativa é restabelecida, o que contribui para a normalização dos processos energéticos fisiológicos celulares. A reperfusão tecidual desencadeia reações bioquímicas que aceleram o processo de glicólise, aumentando a acidose láctica e a produção de radicais livres tóxicos. Este processo é denominado “lesão de reperfusão” (HALLENBECK e cols, 1990).

Os mecanismos descritos anteriormente ocorrem não somente na região isquêmica, mas também em áreas ao redor do trauma inicial que são atingidas com

produtos tóxicos produzidos pelo evento traumático inicial. Isso leva a formação de uma região denominada “penumbra isquêmica”. O fenômeno de morte celular programada (apoptose) desempenha papel crítico na “penumbra”. A redução ou prevenção da morte celular na “penumbra isquêmica” é um dos principais alvos de estudos de intervenção farmacológica atualmente (GERT, 1997).

1.2. CASCATA ISQUÊMICA

O efeito primário do bloqueio do suprimento de oxigênio e glicose para o cérebro causa a interrupção do metabolismo celular energético. As taxas de glicólise e fosforilação oxidativa diminuem, conseqüentemente, o nível de ATP intracelular é reduzido, causando deterioração da função da membrana e da homeostase iônica que ativam vários processos biológicos, as quais levam a morte neuronal (LIPTON, 1999).

Estudos em retina de coelho demonstraram que a maioria do consumo de oxigênio é utilizada nos processos de geração de ATP que é importante para transporte de Na^+ (AMES e cols, 1992 e QUINONES HINOJOSA e cols, 1999). Quando a concentração de ATP intracelular reduz, a bomba Na^+/K^+ (Na^+/K^+ ATPase) é a mais vulnerável (LIPTON, 1999). A inibição da Na^+/K^+ ATPase rompe a regulação do potencial de membrana, do volume celular e do gradiente de Na^+ da célula (LIPTON, 1999).

O principal efeito da redução da função da Na^+/K^+ ATPase é a inibição da repolarização do axônio e da membrana sináptica após despolarização. Isto reduz o bloqueio do Mg^{2+} voltagem dependente dos receptores de NMDA (ZEEVALK e NICKLAS, 1992). Por sua vez, ativa o receptor NMDA pelo glutamato externo,

aumentando a despolarização e o influxo de Ca^{2+} . Os receptores AMPA/cainato também são ativados, levando ao influxo de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- e obrigatoriamente de água, através do gradiente osmótico, o que leva ao edema e à lise celular (LIPTON, 1999). De fato, é importante compreender que todos receptores de neurotransmissores estarão ativados durante o insulto isquêmico pelos seus respectivos ligantes. O processo é potencializado pela abertura sustentada e concomitante de canais de Ca^{2+} (LIPTON, 1999). O aumento da concentração de Ca^{2+} inibe o metabolismo oxidativo, criando um ciclo vicioso (VERKHRATSKY e SHMIGOL, 1996 e DE FLORA e cols, 1998).

1.3. TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos. Além de ter papel importante na sinalização excitatória, ele é importante na sinaptogênese, plasticidade sináptica e na patogênese de doenças neurológicas (CONTI e WEINBER, 1999).

Dois processos contribuem para a síntese desse neurotransmissor no terminal nervoso: o glutamato é formado a partir da glicose através do ciclo de Krebs e da transaminação do α -cetoglutarato ou pode também ser formado diretamente a partir da glutamina. Esta é formada na glia, transportada para o terminal e convertida localmente pela glutaminase a glutamato.

O glutamato é liberado de variadas fontes por diversos mecanismos. Apesar do grande enfoque na liberação pelo terminal nervoso via exocitose de vesículas sinápticas, esta não é a única forma de extrusão do glutamato. Este neurotransmissor pode ser liberado de maneira independente de cálcio, ou seja, sua liberação de origem não vesicular (DANBOLT, 2001).

Duas razões indicam a participação de glutamato liberado de modo independente de cálcio, via reversão da captação. Primeira, a liberação vesicular de glutamato é inibida pela hipóxia/anóxia, inicialmente devido à liberação de adenosina, que reduz o influxo pré-sináptico de cálcio (SANCHEZ-PIETRO e GONZALEZ, 1988). Segunda, após poucos minutos de início da hipóxia/anóxia, ocorre aumento na concentração de K^+ extracelular, despolarizando as células e aumentando a concentração intracelular de sódio (SIESJO, 1991). Estas mudanças promovem a reversão da captação de glutamato, levando a liberação independente de cálcio.

Os receptores de glutamato podem ser classificados em dois grupos distintos, baseados na via de transdução de sinais: receptores ionotrópicos, que são acoplados a canais catiônicos, NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico), e cainato, pertencem a este grupo. O outro grupo é composto por receptores metabotrópicos, estes acoplados à proteína G e atuam via segundo mensageiro (FAGNI e cols, 2000).

Os receptores AMPA são complexos tetraméricos ou pentaméricos de 4 subunidades homólogas denominadas GluR1-GluR4 que agrupam-se em várias combinações para formar os canais (HOLLMANN e HEINEMANN, 1994). Esse tipo de receptor medeia a transmissão sináptica excitatória rápida. Receptores NMDA são complexos multiméricos de subunidades homólogas NR1 e NR2A-NR2D que combinam-se para formar diferentes subtipos de receptores. Esses receptores são altamente permeáveis a íons cálcio, os quais ativam uma variedade de cascatas transdutoras de sinais envolvidas em muitas formas de plasticidade sináptica. Os receptores cainato são formados a partir de um conjunto de genes (GluR-5-7, KA-1 e

KA-2), estão largamente distribuídos pelo cérebro e implicados na epileptogênese e morte celular (VIGNES e cols, 1997 e O'BRIEN e cols, 1998).

Os receptores metabotrópicos de glutamato podem aumentar a concentração intracelular de cálcio via IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato) e/ou estoques de cálcio sensíveis a rianodina em neurônios. Os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) em vertebrados são produtos de oito genes e tem sido classificados em três grupos: I, II, III. Estes estão relacionados com a inibição da atividade da adenilato ciclase, ativação da fosfolipase D e ativação da fosfolipase A2 em neurônios de hipocampo (BOSSE, 1992 e PARMENTIER e cols, 1996).

A quantidade de glutamato liberada na fenda é várias vezes maior do que a necessária para ativar os receptores pós sinápticos. Transportadores de alta afinidade, localizados nos neurônios adjacentes e nas células gliais, rapidamente removem o glutamato da fenda para prevenir a morte celular (KANAI e cols, 1994). Os transportadores são farmacologicamente distintos dos receptores mGluRs e iGluRs. L-glutamato, L-aspartato e D-aspartato são substratos para estes transportadores (BREW & ATTWELL, 1987; TACHIBANA & KANEKO, 1988;).

Os transportadores captam glutamato para as células de Müller junto com o co-transporte de três íons de Na^+ (BREW & ATTWELL, 1987) e a saída de um íon K^+ (BARBOUR e cols, 1988; BOUVIER e cols, 1992; BOUVIER e cols, 1992). O excesso de íons sódio gera uma corrente líquida positiva para dentro da célula, a qual controla o transportador. Estes transportadores da membrana plasmática são diferentes dos transportadores vesiculares nos terminais. Aqueles localizados na membrana plasmática são Na^+ e voltagem dependentes e cloreto independentes (BREW & ATTWELL, 1987). Os transportadores vesiculares concentram o glutamato independentemente do sódio e dependente de ATP (NAITO & UEDA, 1983; TABB &

UEDA, 1991; FYKSE & FONNUM, 1996) e necessitam de cloreto (TABB & UEDA, 1991; FYKSE & FONNUM, 1996).

1.4. O PAPEL DO GLUTAMATO NA EXCITOTOXICIDADE

Há um consenso que a hiperativação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos (NMDA, cainato e AMPA) levará a um influxo de cálcio e sódio elevando suas concentrações intracelulares $[Ca^{2+}]_i$ e $[Na^+]_i$. Estes ativarão uma série de eventos que levarão à morte celular (OSBORNE e cols., 1999).

O termo excitotoxicidade foi utilizado por Olney et al. para descrever morte celular causada por aminoácidos excitatórios (OLNEY, 1969; OLNEY, 1969). Excitotoxicidade resulta de uma liberação excessiva e uma inadequada recaptação do glutamato sináptico. Seu papel na neurodegeneração hipóxica foi estabelecido na década de 80 através de estudos que mostraram sensibilidade neuronal reduzida à hipóxia, quando receptores de glutamato pós sinápticos foram bloqueados (KASS e LIPTON, 1982; ROTHMAN, 1983).

Isquemia e outras condições que levam a redução de energia *in vivo* são acompanhadas por perda da homeostase celular provocando entrada rápida e maciça do Ca^{2+} , K^+ , Na^+ e Cl^- (HANSEN, 1985). Em algumas células, tais como os neurônios piramidais CA1, o influxo inicial de Ca^{2+} parece ocorrer principalmente via canais que são operados por receptores NMDA (LOBNER e LIPTON, 1993). Entretanto estes canais operados por receptores rapidamente inativam-se e o influxo de Ca^{2+} é mediado por canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, trocadores Na^+/Ca^{2+} e vias ainda não identificadas (LOBNER e LIPTON, 1993). Entretanto, outros mecanismos parecem contribuir para o aumento na $[Ca^{2+}]_i$ causada pela isquemia.

Estes incluem canais de Ca^{2+} operados por estoques, liberação de Ca^{2+} de estoques internos e mecanismos de tamponamento de Ca^{2+} (ABDEL-HAMID e TYMIANSKI, 1997; CHEN e cols, 1997; GARCIA e cols, 2001; LIMBRICK e cols, 2001; RINTOUL e cols, 2001; WANG e cols, 2002).

As células gliais podem regular a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos neurônios (VERKHRATSKY e cols, 1998) e portanto, podem tamponar a elevação intracelular deste íon. Entretanto, células da glia podem também estar sujeitas a sobrecarga de Ca^{2+} durante a isquemia (DUFFY e MACVICAR, 1996; FERN, 1998; VERKHRATSKY e cols, 1998).

A liberação de Ca^{2+} de estoques internos pode também contribuir para a sobrecarga de Ca^{2+} induzida pela isquemia (KRISTIAN e SIESJO, 1998). Essa liberação pode ser ativada por IP_3 , seguindo a ativação de receptores de superfície acoplados a fosfolipase C, tais como receptores metabotrópicos de glutamato.

A concentração intracelular de cálcio mantida elevada ativa uma série de eventos, os quais participam na neurodegeneração. Entre elas, produção de radicais livres, síntese de óxido nítrico (NO), ativação de fosfolipase A_2 , clivagem do DNA, ativação de proteases e subsequente lesão do citoesqueleto (KRISTIAN e SIESJO, 1998; VERKHRATSKY e cols., 1998; LIPTON, 1999; NICOTERA e cols., 1999; SATTLER & TYMIANSKI, 2001).

1.5. ASPECTOS BÁSICOS DA SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR

O íon cálcio é um sinalizador intracelular altamente versátil, que pode regular diferentes funções celulares, como a liberação de neurotransmissores, transcrição gênica, proliferação celular, apoptose e outras. Esse íon desenvolve papel central na

biologia celular resultante da habilidade que as células possuem em compartimentalizar sinais de cálcio em dimensões de espaço, tempo e amplitude (BERRIDGE, 2003).

O nível de Ca^{2+} intracelular é determinado pelo equilíbrio entre os sinais que ativam a sua entrada para o citoplasma e reações que o removem, combinando tampões, bombas e trocadores para manter sua concentração no citosol (aproximadamente 100nM) (CARAFOLI & BRINI, 2000).

Quase todos os sistemas de sinalização de Ca^{2+} funcionam pela geração de pulsos na concentração intracelular do Ca^{2+} , oriundos de estoques internos ou do meio extracelular.

Uma das vias de aumento na concentração do cálcio citoplasmático é através do seu influxo do meio extracelular controlado por diversos canais na membrana, em resposta a estímulos como despolarização, deformação mecânica ou ativação hormonal (CARAFOLI & BRINI, 2000).

Esses canais podem ser operados por voltagem, operados por receptores, ou operados por estoques (PAREKH, 2003).

Os canais de cálcio operados por voltagem existem principalmente em tecidos excitáveis, tais como células musculares e neurônios, e são ativados por despolarização da membrana (NOWYCKY & THOMAS, 2002).

Os canais de cálcio operados por receptor compreendem uma diversidade de canais que são particularmente prevalentes em células secretórias e terminais nervosos. Esses canais são ativados pela ligação de um neurotransmissor ou um hormônio. Por exemplo, receptor NMDA que responde ao glutamato (CARAFOLI & BRINI, 2000).

Canais de cálcio operados por estoques são ativados em resposta à depleção dos estoques de cálcio intracelular, tanto por mensageiros fisiológicos da mobilização de cálcio, como por agentes farmacológicos. O mecanismo pelo qual os canais de cálcio operados por estoques “sentem” a depleção de cálcio ainda não está bem estabelecido (CARAFOLI & BRINI, 2000).

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

O retículo endoplasmático é uma organela de sinalização funcional que controla uma variedade de processos celulares, tais como a liberação de cálcio, biossíntese de esteróis, apoptose e a liberação de ácido araquidônico. Essa organela é uma fonte de sinais de cálcio, e este pode ser liberado através dos receptores de 1,4,5 trifosfato (IP₃), ou de rianodina (Rya) (BERRIDGE, 1998). Esses receptores são ativados por um grupo de mensageiros, tais como IP₃, cADPR (ADP ribose cíclica) e outros que estimulam ou modulam os canais de liberação destes estoques (BOOTMAN e cols., 2002).

Os receptores de IP₃ estão distribuídos ao longo de toda a rede do retículo endoplasmático das células de Purkinje (TAKEI e cols., 1992; MARTONE e cols., 1997). O sistema fosfatidilinositol (responsável pela formação de IP₃) é bem desenvolvido no cérebro (FISHER e cols., 1992). Sinais externos podem atuar nos receptores da superfície celular e gerar IP₃ e diacilglicerol (DAG) como segundos mensageiros através da hidrólise de 4,5 bifosfato de fosfatidilinositol. O DAG tem

como função ativar a proteína quinase C (PKC). IP3 difunde-se pelo citosol da célula e mobiliza cálcio dos estoques do retículo endoplasmático pela sua ligação com o receptor de IP3 presente nessa organela (BERRIDGE, 1998). Os receptores de IP3 e de rianodina são sensíveis também ao cálcio, e essa liberação de cálcio induzida pelo cálcio contribui para uma elevação rápida do nível citosólico de cálcio (liberação de cálcio induzida pelo cálcio CICR) (BERRIDGE, 2003).

Os receptores de rianodina foram inicialmente identificados como canais de cálcio responsáveis por liberar o cálcio do retículo sarcoplasmático de músculos esqueléticos e cardíacos (MCPHERSON e cols., 1993). Entretanto, esses receptores estão presentes em muitos tipos celulares, incluindo os neurônios (HAKAMATA e cols., 1992). Esses receptores são estruturalmente e funcionalmente análogos ao receptor de IP3. A abertura desses canais pode ser modulada por vários fatores, incluindo fosforilação, nucleotídeos de adenina, pH e o cálcio presente nos estoques (BERRIDGE, 2002).

Ambos receptores, de IP3 e de rianodina, participam do processo denominado “liberação de cálcio induzida por cálcio”, que amplifica sinais de cálcio. Esse processo pode ocorrer através de duas maneiras. Na primeira, ocorre o acoplamento entre os canais operados por receptores ou por canais operados por voltagem e os canais liberadores do retículo endoplasmático, como ocorre nos miócitos cardíacos e nos neurônios. Na segunda, ocorre a união dos próprios canais liberadores do retículo endoplasmático, criando ondas de cálcio que propagam a sinalização através da célula (BERRIDGE, 2002).

A remoção do cálcio do citoplasma pode ser feita através de três mecanismos. O primeiro é o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, localizado na membrana plasmática, que troca três íons Na^+ por um íon Ca^{2+} . Atua transportando o cálcio tanto para fora

como para dentro da célula, dependendo do gradiente iônico. O segundo, é através da bomba de cálcio ATPase da membrana plasmática (PMCA), que transporta o cálcio do citosol para o meio extracelular a partir da hidrólise do ATP (NOWYCKY & THOMAS, 2002).

A recaptação de cálcio para o retículo endoplasmático é realizada pela Ca^{2+} ATPase do retículo sarco-endoplasmático (SERCA). Na mitocôndria, a recaptação de cálcio pode ser feita pelo uniporter mitocondrial (COLLINS e cols., 2001)

Por outro lado, a recaptação pelo complexo de Golgi é mediada pelo transportador Ca^{2+} ATPase do tipo P (PMT1/ATP2C1) (NOWYCKY & THOMAS, 2002).

1.6. PAPEL DO CÁLCIO NA ISQUEMIA CEREBRAL:

A excitotoxicidade está presente em vários processos degenerativos neuronais, incluindo isquemia, epilepsia e em algumas doenças crônicas como a esclerose amiotrófica lateral. Um mediador chave no dano excitotóxico é o íon cálcio. Esse íon governa múltiplos processos celulares, como o crescimento celular, diferenciação e atividade sináptica. Para realizar todas essas funções celulares e manter a homeostasia, existem vários mecanismos para manter a concentração desse íon em níveis adequados, permitindo sinais temporais e espaciais de forma localizada (ARUNDINE e cols., 2003).

Na excitotoxicidade, a liberação excessiva de glutamato leva ao rompimento da homeostasia do cálcio. O glutamato ativa receptores pós sinápticos, incluindo receptores NMDA, AMPA e cainato. Após essa ativação, esses receptores permitem o influxo de cálcio e sódio. O aumento excessivo de cálcio é produzido por essa ativação de receptores, principalmente através do receptor NMDA e também pela

liberação de estoques internos, e portanto podem levar a perda dessa homeostasia e culminar em morte celular (ARUNDINE e cols., 2003).

A possibilidade de que alterações na homeostasia dos íons cálcio possam atuar na morte neuronal em estados patológicos, como isquemia cerebral e epilepsia, foram propostos há mais de 20 anos atrás (SIESJO, 1981). Schanne e cols, em 1979, propuseram que em condições patológicas associadas à insuficiência energética, há um aumento dos níveis de cálcio provenientes da ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem e dos canais de cálcio acoplados a receptores, e também pela liberação de cálcio estocado em organelas celulares. O aumento de cálcio citosólico ativa fosfolipases, promove a degradação de membranas, formação de radicais livres, edema celular, distúrbios na síntese de ATP mitocondrial e finalmente morte celular. Essa hipótese do cálcio foi baseada em observações anteriores feitas em hepatócitos de ratos submetidos a várias toxinas. Nesses experimentos foi possível relacionar a morte celular ao aumento das concentrações de cálcio citosólico. A morte celular foi observada somente em células cultivadas em meio com a concentração normal de cálcio (1Mm) e não em células cultivadas em meio pobre em cálcio (20 μ M). Esses experimentos mostraram que o influxo de cálcio induzido por um agente estressante engatilha processos patológicos resultando em morte celular (SCHANNE e cols, 1979).

Essa hipótese original do cálcio veio sendo modificada ao longo dos anos e hoje vários estudos vem mostrando que a morte neuronal não está necessariamente ligada ao aumento da atividade de cálcio citoplasmático. A hipótese do cálcio mitocondrial sugere que a captação de cálcio para o interior da mitocôndria resulta na formação de espécies oxidativas, abertura do poro de transição mitocondrial e liberação de citocromo c, resultando assim em morte celular. Todos esses eventos

podem acontecer sem que haja um aumento da concentração de cálcio citoplasmático (KOIKE e cols., 1989 e TURNER e cols., 2002).

A hipótese do cálcio do retículo endoplasmático foi proposta primeiramente em 1996 por Paschen e colaboradores. Essa hipótese propõe que a depleção de cálcio dos estoques intracelulares é o engatilhador da morte celular neuronal (PASCHEN e cols., 1999 e PASCHEN, 2000).

O retículo endoplasmático (RE) é um compartimento subcelular que exibe alta atividade de cálcio. A depleção de cálcio estocado no RE é considerada uma forma severa de estresse que é potencialmente letal às células. Essa característica presente no RE em relação à homeostasia de cálcio, difere este compartimento do citoplasma e da mitocôndria quanto aos níveis de cálcio. Esses dois últimos compartimentos mantêm níveis baixos de cálcio em situações normais e aumentam consideravelmente a concentração de cálcio em em que a célula é submetida a eventos estressantes. A homeostasia do cálcio do RE é realizada através dos receptores de IP3 e rianodina. Além desses receptores, há também uma bomba iônica de cálcio (SERCA) que bombeia íons cálcio do citoplasma para o interior do RE (PASCHEN, 2003).

A isquemia tem efeito direto na homeostasia do cálcio do RE. O gradiente de cálcio entre o citoplasma e o RE é mantido pela SERCA, uma bomba iônica dependente de ATP. Esse processo é bloqueado durante a isquemia, pois a quantidade de energia não é suficiente para que esta bomba opere de forma adequada, promovendo assim o aumento de cálcio citoplasmático (PASCHEN, 2003). Além da bomba SERCA, os receptores do RE também estão envolvidos no processo de morte celular neuronal. Foi observado em vários experimentos que o dantroleno, bloqueador dos receptores de rianodina, pode ser um agente

neuroprotetor em condições que envolvem isquemia e excitotoxicidade (FRANDSEN e cols., 1992 e ZHANG e cols., 1993).

Parece que o acoplamento entre RE e mitocôndria desenvolve papel importante na geração da morte celular neuronal uma vez que o acoplamento apoptótico envolvendo RE e mitocôndria seja estabelecido. Células neuronais em cultura foram tratadas com tunicamicina, um agente bloqueador da glicosilação das proteínas residentes do RE, promovendo assim liberação de cálcio, esse evento foi responsável pela liberação de citocromo C da mitocôndria e conseqüente ativação de caspase-3, culminando em apoptose (HACKI e cols., 2000).

1.7. USO DE AGENTES NEUROPROTETORES NA ISQUEMIA CEREBRAL:

Observando detalhadamente os processos celulares e moleculares que envolvem o evento isquêmico, surgiram numerosos estudos em busca da descoberta de um fármaco capaz de conter o processo isquêmico. Os principais mediadores desse processo foram considerados o cálcio e o glutamato, sendo assim, a maior parte das pesquisas foram dirigidas a esses mediadores.

Kidwell e colaboradores, em 2001, realizaram uma pesquisa sistemática das triagens terapêuticas para isquemia cerebral aguda após o ano 2000 e identificaram 88 substâncias neuroprotetoras envolvendo 37 agentes diferentes.

Os antagonistas dos receptores NMDA foram os primeiros fármacos a serem investigados como agentes neuroprotetores na isquemia. A utilização desses antagonistas não apresentou resultados satisfatórios devido ao grande número de efeitos colaterais. Baixas doses estão associadas com alteração na percepção sensorial, disforia, hipertensão, nistagmo e desorientação, progredindo para

agitação, paranóia, alucinação e retardo motor severo. Em altas doses pode ocorrer catatonia (MUIR e cols., 1995).

Diante desse enorme número de efeitos colaterais com a utilização desses antagonistas dos receptores de glutamato, vários estudos tem sido realizados para a descoberta de fármacos com o melhor perfil terapêutico e com menor número de efeitos colaterais.

A nimodipina, bloqueador dos canais de cálcio do tipo L, reduziu o dano isquêmico cerebral em modelos animais (MOHR e cols, 2000). Em outros estudos, a nimodipina apresentou redução da lesão isquêmica após hemorragia subaracnóide, provavelmente por reduzir as conseqüências do vasoespasma (ALLEN e cols, 1983).

Os anestésicos e os anticonvulsivantes apresentaram efeitos neuroprotetores por inibir a liberação de neurotransmissores (WEINBERGER e cols., 2006). Estudos iniciais com altas doses de pentobarbital apresentaram reduções no dano isquêmico em um modelo animal de isquemia cerebral (LEVY e cols, 1979). O efeito neuroprotetor do pentobarbital pode ser explicado pela redução da demanda metabólica, mas é também relatada a redução da liberação de catecolaminas no estriado (WEINBERGER e cols., 1983; BHARDWAJ e cols., 1990).

Em um modelo de isquemia cerebral em ratos, sevoflurano e propofol reduziram significativamente as concentrações extracelulares de noradrenalina, quando comparados com o grupo controle (ENGELHARD e cols., 2003). Efeito similar na redução de catecolaminas foi demonstrado com a administração de quetamina em um modelo de isquemia cerebral em ratos (HOFFMAN e cols., 1992).

1.8. USO DE TOXINAS ANIMAIS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS

Nos últimos anos, vários estudos têm sido feitos para identificar peptídeos neuroativos naturais de venenos de diferentes espécies que podem ser usados em uma variedade de aplicações médicas, em especial nas doenças neurodegenerativas. Essa busca se deve pela seletividade a uma variedade de subtipos de canais iônicos. Além de possíveis alvos terapêuticos, esses peptídeos são usados como ferramentas farmacológicas e dessa forma podem ser usados para modular ou auto regular os canais iônicos (RAJENDRA, 2004).

Os venenos das aranhas, ao contrário de outros venenos animais são heterogêneos. Esses são constituídos por proteínas, polipeptídeos, enzimas, ácidos nucleicos, monoaminas, sais inorgânicos e toxinas poliaminas (JACKSON, 1989). Os principais alvos dessas toxinas são os receptores neuronais, canais iônicos e proteínas pré sinápticas envolvidas na liberação de neurotransmissores (RAJENDRA, 2004). O veneno do caramujo marinho, do gênero *Conus*, vem sendo extensamente estudado. Este veneno contém uma mistura diversa de agentes farmacologicamente ativos que exercem suas funções em receptores e canais iônicos (JONES e cols., 2000). As conotoxinas em geral, são pequenos peptídeos com aproximadamente 10 a 30 aminoácidos e são classificados em A, M, O, S, T e P. Esses peptídeos exercem diversas ações farmacológicas por modularem as funções dos canais iônicos dependentes de voltagem ou receptores acoplados a canais iônicos. A conotoxina SNX-111 do caramujo *Conus magus*, um bloqueador dos canais de cálcio do tipo N, apresentou propriedades analgésicas e neuroprotetoras, que tem sido atribuídas a inibição da liberação de neurotransmissores e a supressão de conseqüências secundárias do influxo excessivo de cálcio. O análogo sintético dessa toxina, a Ziconotida, apresentou

eficácia na isquemia cerebral focal e na dor neuropática. Devido aos bons resultados obtidos com essa toxina na dor neuropática, esta foi aprovada pela Food and Drug Administration (USA) como uma nova droga terapêutica (BOWERSOX e cols., 1998).

Do veneno de cobras foram isolados inibidores de fosfolipase A2 (PLA2). Estes podem ser utilizados como ferramentas farmacológicas e/ou na regulação da atividade de PLA2 em várias doenças, incluindo as desordens neurológicas (FAURE e cols., 2000). A PLA2 pertence a um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolizam especificamente ácidos graxos da membrana lipídica e produzem uma variedade de mediadores inflamatórios, tais como, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas e fator ativador de plaquetas. Os inibidores de PLA2 têm apresentado sucesso no tratamento de desordens neurológicas associadas a PLA2, como a isquemia cerebral (YANAKA e cols., 1996).

1.9. ESTRUTURA E FARMACOLOGIA DAS NEUROTOXINAS DO VENENO DAS ARANHAS

As aranhas possuem lugar especial nos mitos populares e no folclore, devido a seus hábitos secretos, aspecto físico e comportamento predatório. Embora exista uma imensa diversidade (40.000 espécies descritas e provavelmente mais de 100.000 não descritas), poucas espécies representam realmente um problema médico (ESCOUBAS e cols., 2000).

As espécies de aranhas consideradas perigosas são encontradas no grupo das labidognatas (araneomorfos): *Latrodectus*, *Loxosceles* e *Phoneutria*. Estas são responsáveis por vários casos de envenenamento e registros de mortalidade (ESCOUBAS e cols., 2000).

Todas as aranhas secretam veneno (com exceção da família Uloboridae) que contém um complemento de neurotoxinas responsáveis por paralisar e matar a sua presa. Essas toxinas têm sido extensamente estudadas nos últimos anos e estão se tornando ferramentas farmacológicas de extrema importância (ESCOUBAS e cols., 2000). Os venenos das aranhas são misturas complexas de peptídeos neurotóxicos, proteínas e moléculas orgânicas de baixo peso molecular. Estes podem ser agrupados em três classes principais: moléculas orgânicas de baixo peso molecular (PM < 1000 Da), polipeptídeos (PM 3000-10000 Da) e proteínas de alto peso molecular (PM > 10000 Da) (ESCOUBAS e cols., 2000).

A vasta maioria das toxinas de aranhas identificadas são polipeptídeos com peso molecular entre 3000 e 10000 Da. Junto com as poliaminas, os peptídeos representam o principal arsenal tóxico das aranhas (ESCOUBAS e cols., 2000).

As proteínas do veneno incluem neurotoxinas de alto peso molecular e enzimas. Proteases, hialuronidases, esfingomielinases, fosfolipases e isomerases também são encontradas nos venenos de diversas aranhas (SCHAMBACHER e cols., 1973). A atividade dermonecrótica e hemolítica da *Loxocles* é devido à presença de esfingomielinases. As hialuronidases podem potencializar a ação de outros componentes do veneno, facilitando a penetração de vários compartimentos celulares e tecidos. Entretanto, a função biológica exata das enzimas presentes nos venenos das aranhas não foi elucidada (TAMBOURGI e cols., 1998).

Os venenos das aranhas contém uma diversidade de toxinas peptídicas que atuam nos canais de cálcio sensíveis a voltagem. Esses canais desenvolvem papéis fundamentais na função neuronal, muscular e cardíaca (CATTERAL e cols., 1992). O veneno da *Agelenopsis aperta* foi a primeira fonte descoberta de toxinas bloqueadoras de canais de cálcio. Essas toxinas, conhecidas como ω -agatoxinas,

bloqueiam canais de cálcio do tipo L, P, Q e N, com alta afinidade e seletividade variável (CATTERAL e cols., 1992).

Após a descoberta das ω -agatoxinas, uma larga variedade de toxinas peptídicas que atuam nestes mesmos canais foi descrita (ω -gramotoxina SIA da *Grammostola spatulata*, toxinas PhTX da *Phoneutria nigriventer*, ω -atracotoxinas da *Hadronyche spp* entre outras). Uma recente descoberta é a SNX482 do veneno da tarântula *Hysterocrates gigas* que permitiu uma clara caracterização das correntes de cálcio do tipo R (CATTERAL e cols., 1992).

A descoberta das μ -agatoxinas do veneno da *Agelenopsis aperta* que atuam em canais de sódio foi pioneira. Tal descoberta é relativamente recente quando comparada às toxinas de escorpião que atuam nos mesmos canais, estas últimas foram descobertas em 1970. Os peptídeos de aranha que atuam nos canais de sódio dependentes de voltagem têm o mesmo mecanismo de ação, eles lentificam a cinética de inativação dos canais de sódio, não permitindo sua total inativação (ESCOUBAS e cols., 2000).

1.10. CARACTERÍSTICAS DA ARANHA PHONEUTRIA NIGRIVENTER E AÇÕES DO SEU VENENO

A aranha *Phoneutria nigriventer* tem ocorrência desde o sul do Rio de Janeiro até o Uruguai, onde provavelmente foi introduzida vinda de um carregamento de bananas (RAMOS e cols., 1998). É a espécie mais comumente envolvida em envenenamento humano no Brasil (EICKSTED, 1983 e LUCAS, 1988). É muito agressiva e é conhecida popularmente como aranha armadeira, pela posição que toma ao se sentir ameaçada. Possui hábitos noturnos e permanece refugiada durante o dia. No período de acasalamento, esta espécie pode atingir o

intradomicílio, quando os machos tornam-se mais ativos à procura das fêmeas, acentuando-se os riscos de acidentes (BUCHERL, 1972). A aranha *Phoneutria nigriventer* não constrói teia e seu sucesso como predadora pode ser explicado pela potência das diversas toxinas presentes em seu veneno (GOMEZ e cols., 2002). Há relatos de que as picadas por *Phoneutria nigriventer* podem causar dor severa e muitos sintomas tóxicos, tais como, câimbras, tremores, convulsão tônica, paralisia espástica, priapismo, arritmias, distúrbios visuais e sudorese (BRAZIL e VELLARD, 1925; SCHEMBERG e LIMA, 1966; LUCAS, 1998). Esses sintomas são mais graves em crianças e a intoxicação pode levar a morte se não tratada.

Um dos principais motivos do interesse nas toxinas de aranha é o fato dos seus polipeptídios tóxicos interagirem com canais iônicos. Dessa maneira, algumas classes de toxinas podem afetar o funcionamento de canais de sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}), potássio (K^+), dentre outros (GRISHIN, 1999).

As toxinas obtidas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* têm sido extensivamente investigadas e cerca de 17 peptídeos com atividade tóxica já foram descritos na literatura (revisado por GOMEZ e cols, 2002). Existe interesse na caracterização bioquímica e farmacológica de neurotoxinas do veneno desta aranha como possível ferramenta de investigação das funções dos canais iônicos em níveis moleculares e celulares (DINIZ e cols., 1990; ARAÚJO e cols., 1993; ROMANO-SILVA e cols., 1993; CASSOLA e cols., 1998; KALAPOTHAKIS e cols., 1998; MIRANDA e cols., 1998; REIS e cols., 1999; REIS e cols., 2000). E, além disso, investiga-se o veneno de *Phoneutria nigriventer* por sua habilidade em afetar um grande número de sistemas fisiológicos, em particular os relacionados à dor e à inflamação (COSTA e cols., 2002).

Um dos principais efeitos neurotóxicos do veneno é a sua ação em canais de sódio (Na^+), podendo induzir disparos de potenciais de ação repetidos em fibras nervosas e musculares (FONTANA e cols., 1985). Além disso, duas diferentes linhas de evidências sugerem que uma das frações tóxicas da toxina interage com canais de Na^+ (ARAÚJO e cols., 1993; ROMANO-SILVA e cols., 1993). Entretanto, foi ainda observado que quando o veneno bruto de *Phoneutria nigriventer* era fracionado, algumas de suas frações produziam paralisia flácida em camundongos (CORDEIRO e cols., 1993; REZENDE e cols., 1991), sugerindo o envolvimento dessas toxinas com os canais de cálcio (GOMEZ e cols., 2002). Portanto, o segundo principal efeito farmacológico do veneno de *Phoneutria nigriventer* é a sua ação sobre os diferentes subtipos de canais de Ca^{2+} . Trabalhos publicados descrevem a ação de algumas toxinas de *P. nigriventer* na inibição das correntes de Ca^{2+} (CASSOLA e cols., 1998; LEÃO e cols., 2000; SANTOS e cols., 2002) ou no bloqueio do influxo deste íon em terminais nervosos (PRADO e cols., ; 1996; GUATIMOSIM e cols., 1997; MIRANDA e cols., 1998). Além dos efeitos nos canais de Na^+ e Ca^{2+} , há relato do efeito de uma outra toxina do veneno de *P. nigriventer* nas correntes de potássio (KUSHMERICK e cols., 1999).

As primeiras frações tóxicas descritas foram PhTx1 e PhTx2, as quais causavam contração do íleo de cobaio (REZENDE e cols., 1991). Araújo e colaboradores em 1993 demonstraram que na presença da fração PhTx2, os canais de sódio eram ativados em potenciais mais hiperpolarizados e inativados mais tardiamente. Além deste efeito nas propriedades cinéticas ou de condutância dos canais de Na^+ , a fração PhTx2 aumenta a entrada de Na^+ em sinaptossomas corticais, induzindo despolarização da membrana, influxo de cálcio e a liberação dos

neurotransmissores como glutamato (ROMANO-SILVA e cols., 1998) e acetilcolina (MOURA e cols., 1998).

Outra fração tóxica isolada e estudada foi a PhTx3. Esta fração quando injetada em roedores induzia paralisia flácida (REZENDE e cols., 1991), o que mais tarde foi atribuído a sua ação inibitória na liberação de neurotransmissores (GOMEZ e cols., 1995; PRADO e cols., 1996). A partir da fração PhTx3, seis diferentes toxinas (PnTx3-1 a PnTx3-6) foram purificadas. A toxina PnTx3-1 mostrou-se um seletivo e potente bloqueador das correntes de K^+ do tipo A, sem entretanto possuir qualquer efeito sobre outros tipos de correntes de K^+ e também foi capaz de bloquear as correntes de Ca^{2+} do subtipo L (KUSMERICK e cols., 1999). Além dos efeitos em canais de Na^+ e K^+ , algumas toxinas da família PhTx3 têm como alvos os canais de Ca^{2+} . Estudos em células GH3 revelaram que a toxina PnTx3-2 bloqueia parcialmente as correntes do tipo L (KALAPHOTAKIS e cols., 1998). Já as toxinas PnTx3-3, PnTx3-4 e PnTx3-6 inibem o influxo de Ca^{2+} induzido por despolarização com alta concentração de KCl em terminações nervosas (PRADO e cols., 1996; GUATIMOSIM e cols., 1997; MIRANDA e cols., 1998; VIEIRA e cols., 2003). Posteriormente, experimentos eletrofisiológicos demonstraram que PnTx3-3 é um potente bloqueador ($IC_{50}=0.7$ nM) das correntes dos subtipos P/Q e R localizadas no soma de células granulares do cerebelo, enquanto os subtipos N e L são parcialmente bloqueados em outros tipos celulares (LEÃO e cols. 2000). Análises de mais dados eletrofisiológicos demonstraram que outra phoneutriatoxina, a PnTx3-4 bloqueia os canais de cálcio do subtipo N (CASSOLA e cols., 1998; DOS SANTOS e cols., 2002) e P/Q (DOS SANTOS e cols., 2002). Esta toxina parece ligar-se em vários sítios, sendo parcialmente deslocada pelas ω -conotoxinas GVIA e/ou MVIIC (DOS SANTOS e cols., 2002). A toxina PnTx3-4 possui um intrigante mecanismo de

ação, uma vez que essa toxina também diminui a liberação de glutamato dependente e independente de Ca^{2+} em terminações nervosas de ratos (REIS e cols., 1999), através de mecanismos relacionados ao transportador de glutamato (REIS e cols., 2000).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a ação de neurotoxinas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* como agentes neuroprotetores na isquemia cerebral *in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Estudar o efeito neuroprotetor da fração PhTX3 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* em um modelo de isquemia cerebral *in vitro*.
- Estudar o efeito neuroprotetor isolado das toxinas TX3-3 e TX3-4 (presentes na fração PhTX3) em um modelo de isquemia cerebral *in vitro*.
- Estudar o efeito neuroprotetor dessas toxinas em diferentes intervalos de tempo após a instalação do processo isquêmico.
- Estudar o papel do cálcio intracelular no processo de isquemia cerebral *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Drogas e Reagentes

Descrição	Fabricante
Live/Dead – Viability/Cytotoxicity Kit L-3224 <i>Component A:</i> Calcein-AM 4mM solution in DMSO <i>Component B:</i> Ethidium homodimer- 1(EthD-1)2mM solution in 1:4 DMSO/H ₂ O	Molecular Probes Inc.
NaCl, KCl, CaCl ₂ , MgSO ₄ , NaHCO ₃ , KH ₂ PO ₄ , Glicose, MgSO ₄ , HEPES	Merck
Tetrodotoxina	Sigma
ω-Conotoxina GVIA	Sigma
ω-Conotoxina MVIIC	Sigma
Fração PhTX3	Funed
TX3-3 e TX3-4	Funed
BAPTA-AM	Sigma
Soro fetal bovino	Invitrogen
EGTA	Sigma

EDTA	Sigma
DTT	Sigma
CHAPS	Sigma
TRIS	Merck
Cocktail de inibidor de protease	Boehringer
Dantroleno	Sigma
2-APB	Sigma
DMSO	Sigma
Kit caspase-3	Molecular Probes
DMEM	Invitrogen
Penicilina/estreptomicina	Invitrogen
Dibutiril –AMPc	Sigma

3.1.2. Equipamentos

1-Tissue Chopper, Modelo PZN, USA

2-Câmara de perfusão de tecido da Fine Science Tools Inc, Canadá.

3-Unidade de controle de Temperatura da Fine Science Tools Inc, Canadá.

4-Sistema confocal de varredura a laser MRC 1024, Bio Rad, Hemel Hempstead, Reino Unido.

5-Balança eletrônica de precisão milesimal OHAUS. Modelo A560.

6-Balança eletrônica de precisão decimal Modelo Fx-300.

7-Espectrofluorímetro, Modelo PTI

8-Centrífuga

9-Estufa de CO2

10-Espectrofotômetro

3.1.3. Soluções

Solução de ACSF (Fluido Cérebro-espinhal artificial) sem glicose

Componentes	Molaridade (mM)
Cloreto de Sódio (NaCl)	127
Cloreto de Potássio (KCl)	2,0
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	2,0
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	2,0
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	26,0
Fosfato ácido de potássio (KH ₂ PO ₄)	1,2
HEPES	13,0
pH=7,4 ajustado com HCl 1N	

Solução ACSF com Glicose

Composição: ACSF e Glicose 10 mM

pH=7,4

Tampão de Lise:

Componentes

Cloreto de Sódio (NaCl)	125 mM
TRIS-HCl pH=7,6	20 mM
EGTA	10 mM
EDTA	5 mM
Cocktail de inibidor de protease (Boehringer)	40µl/mL

Tampão de Reação:**Componentes**

Cloreto de Sódio (NaCl)	100 mM
HEPES pH=7,4	50 mM
CHAPS	0,1%
DTT	10 mM
EDTA	0,1 mM

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Purificação das toxinas

Rezende e cols. (1991) propuseram um método para o fracionamento do veneno da *Phoneutria nigriventer*, através do qual o veneno é processado em uma combinação de filtrações em gel e RFPLC, gerando 3 frações neurotóxicas distintas (PhTx1 a PhTx3) (Figura. 1).

3.2.2. Preparação das Fatias de Hipocampo

Ratos da raça wistar pesando 150 a 200g, de ambos os sexos foram sacrificados pela decapitação em guilhotina. O cérebro foi removido rapidamente e os hipocampos dissecados e fatiados em 400µm de espessura e levados a câmara de perfusão para os procedimentos subseqüentes.

3.2.3. Procedimentos na Câmara de Perfusão

Após a obtenção das fatias de hipocampo, estas foram incubadas nas câmaras para fatias de tecido (Fine Science Tools Inc) no meio ACSF com glicose e oxigenadas (mistura carbogênica contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂), temperatura em 36,5 °C por um período de 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico da dissecação.

Após este período de recuperação, metade das fatias foram submetidas a pré-tratamento durante 30 minutos através de vários procedimentos, a saber: meio pobre em Ca²⁺ (0,3 mM), quelado por ácido etileno glicol-bis(α-aminoetil éter)

N,N,N',N' -tetraacético ácido tetracético(EGTA) ou por BAPTA-AM, submetida a bloqueadores de canal de sódio (tetrodotoxina), bloqueadores de canais de cálcio (ω - Conotoxina MVIIC e ω - Conotoxina MVIIC), toxinas obtidas da aranha *Phoneutria nigriventer* (fração PhTX3, TX3-3 e TX3-4), bloqueador dos receptores de rianodina (Dantroleno) e bloqueador dos receptores de IP3 (2-APB).

Em todos os experimentos, as fatias foram submetidas a privação de glicose/oxigênio, que é realizada perfundindo as câmaras com meio contendo 4mM de glicose e aeradas por uma mistura gasosa contendo 95% de nitrogênio e 5% de dióxido de Carbono , durante 10 minutos.

Após este período de isquemia, as fatias de hipocampo foram mantidas em solução com glicose e oxigênio para recuperação por mais 4 horas (reperfusão).

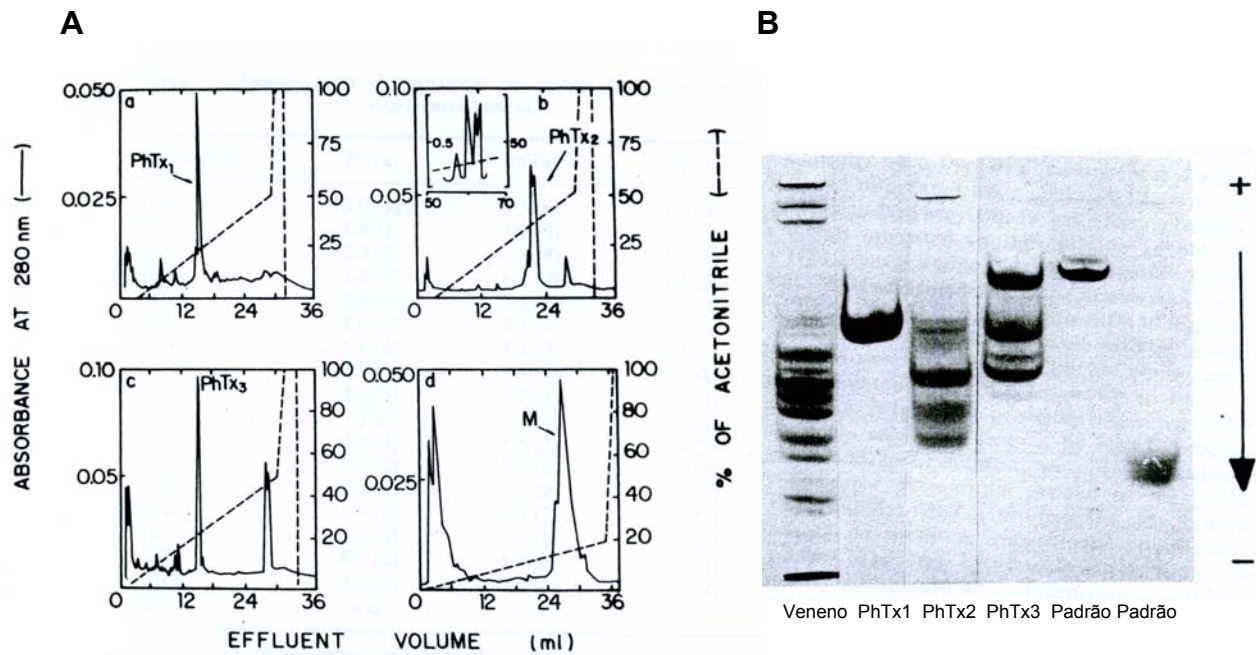


Figura 1: Purificação das frações Tx1 a Tx3 do veneno de *Phoneutria nigriventer*: (a) Cromatogramas de RFPLC das frações obtidas do veneno bruto de *Phoneutria nigriventer* após ser submetido a uma primeira etapa de purificação em filtração em gel. (b) Gel de eletroforese do veneno de *Phoneutria nigriventer* e das toxinas purificadas. (adaptado de Rezende Junior e cols., 1991)

3.2.4. Determinação da viabilidade celular nas Fatias de Hipocampo de Ratos

Para marcação com os corantes indicadores, dissolvem-se 12 μ L de etídio homodímero-1 e 4 μ L calceína-AM (a 2mM e 4mM respectivamente) em 4ml da solução ACSF previamente borbulhada em mistura carbogênica. Mantendo a solução de marcação protegida da luz, ela é dividida em 2 frascos contendo redes de nylon, um para as fatias de hipocampo do controle e outro para as pré-tratadas . Estas ficam incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e borbulhadas com mistura gasosa carbogênica. Após este período, as redes de nylon contendo as fatias de hipocampo são transferidas para outros frascos contendo a solução ACSF com glicose borbulhada em mistura carbogênica para proceder à lavagem por 15 minutos. Após a lavagem, são montadas em lamínulas e levadas ao microscópio confocal.

3.2.5. Obtenção das imagens no Microscópio Confocal

As fatias foram montadas em lamínulas e levadas ao microscópio confocal após os procedimentos nas câmaras de perfusão de tecido e marcação.

No microscópio, foram adquiridas imagens de sessões ópticas consecutivas ao longo do eixo Z, com espessura das sessões (Z step) de 1 micrômetro, comprimentos de onda com excitação de 488 nm para calceína e 568 nm para Etídio Homodímero e emissão em 522/35 e 598/40 respectivamente. A potência do laser (laser power) de 10% e íris de 3,5. Estes parâmetros foram mantidos em todos os experimentos. As imagens foram adquiridas e gravadas em arquivos separados para as emissões em 522/35nm (calceína) e 589/40nm (etídio homodímero). Essas

imagens foram gravadas em escala de cinza e depois foram coloridas pelo programa Confocal Assistant.

3.2.6 Quantificação das imagens obtidas no microscópio confocal

Para a realização da análise quantitativa, foram utilizadas apenas as imagens que representavam as células mortas (imagens obtidas com laser de excitação 568nm). Estas imagens foram montadas no software Confocal Assistant. Estas foram submetidas a um processamento através de um filtro de ajuste dos pixels pela mediana, para eliminar possíveis interferências de ruído na imagem, e foram obtidos os histogramas das respectivas imagens. Com o histograma da imagem, determinamos o valor do limiar basal de fluorescência para a imagem e levamos esta para posterior análise utilizando o software Metamorph Imaging 4.0. Neste programa, selecionamos a região CA1, aplicamos o valor de limiar e assim quantificamos o número de células mortas.

3.2.7. Preparação das Fatias de Córtex:

Dois ratos da raça Wistar pesando entre 150-200g foram mortos por decaptação e o córtex foi rapidamente retirado, em menos de um minuto, e submergido em ACSF gelado (4°C) contendo concentrações em mM de :127 NaCl, 2 KCl, 10 glicose, 1.2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, borbulhado com uma mistura carbogênica contendo 95%O₂ / 5% CO₂. O córtex foi dissecado e cortado em fatias de 400µM. As três primeiras fatias de cada extremidade do tecido foram descartadas. Foram pesados 80mg de tecido e estes foram colocados em frascos

contendo 1mL de ACSF com glicose (correspondente a um ensaio) e mantidos em incubação.

Foram preparados 6 frascos, cada um com 1 mL de ACSF normal gelado e 80mg de tecido. Estes foram colocados em câmaras onde foi possível controlar a temperatura (37°) por 90 min para ambientação (recuperação) do tecido. As amostras foram centrifugadas durante 5 segundos. O sobrenadante foi retirado, acrescentou-se novamente no frasco 1 mL de ACSF normal à 37°C.

Após a etapa supracitada o tecido foi pré incubado durante 30 min. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por mais 5 min e o sobrenadante retirado. As fatias são incubadas em solução isquêmica (contendo 4mM de glicose e aerada com uma mistura carbogênica com 95%N₂ / 5% CO₂ , para retirar todo o O₂ da solução) durante 10 min. Após o processo de isquemia as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante é recolhido para posterior ensaio para liberação de glutamato.

3.2.8. Ensaio para liberação contínua de glutamato

Esse ensaio é baseado na reação envolvendo GDH, NADP⁺ e NADPH e glutamato (ver equação 1). Quando o glutamato é liberado pelas fatias de córtex cerebral de ratos, este sofre oxidação pela enzima GDH. O NADP⁺ é o acceptor desse elétron que ao ser excitado por luz em comprimento de onda de 360 nm, emite luz no comprimento de onda de 450 nm, que é detectada por um fotomultiplicador no espectrofluorímetro. Dessa maneira pode-se quantificar o glutamato liberado pelas fatias de córtex cerebral de ratos (Nicholls e cols., 1987; Romano-Silva e cols., 1993).

Sendo que a reação pode ocorrer tanto para a formação de α -cetogluturato ou L-glutamato, um excesso de NADP^+ serve para favorecer o sentido da reação para a formação de α -cetogluturato.

GDH



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

3.2.9. Preparação das fatias de hipocampo para o ensaio de caspase-3

Após o término do procedimento experimental na câmara de perfusão, as fatias de hipocampo foram homogeneizadas com 800 μl de tampão de lise + coquetel de inibidor de protease (Boheringer Mannheim) utilizando-se potter e pistilo. O tecido lisado é centrifugado a 5000 rpm durante 5'. O sobrenadante é coletado para posterior ensaio fluorimétrico de caspase-3 e para dosagem proteica pelo método de Bradford (1976).

3.2.10. Ensaio fluorimétrico para a quantificação de caspase-3

Este ensaio baseia-se no substrato para caspase-3, o 7-amino-4-metilcumarim Z-DEVD (Z representa o grupo benziloxicarbonil). Este substrato é

fracamente fluorescente no comprimento de onda UV (excitação/emissão 330/390 nm), mas após a clivagem proteolítica este mesmo substrato produz forte fluorescência (excitação/emissão 342/441 nm).

Alíquotas de 50 μ l do sobrenadante são adicionadas a 20 μ l do substrato Z-DEVD-AMC (10mM) e 980 μ l da solução tampão de reação (HRS) e mantidas a 37°C durante 30 minutos. O volume dessa amostra é completado com solução tampão HRS para um volume final de 2000 μ L.

A amostra é então levada ao espectrofluorímetro para a realização da leitura (excitação/emissão ~342/441 nm).

3.2.11. Células SN56:

Foram utilizadas células SN56 (linhagem neuronal) para testar as ferramentas farmacológicas que produziram neuroproteção em fatias de hipocampo de ratos. As células SN56 foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Bruce H. Wainer, Departamento de Patologia da Universidade de Emory, Atlanta, Geórgia, USA.

3.2.12. Meio de crescimento das células SN56:

As células SN56 foram cultivadas em meio DMEM contendo 3,7g de NaHCO₃, por litro, 2mM de glutamina, penicilina/estreptomicina a 1%, 10% de soro fetal bovino.

3.2.13. Cultura das células SN56

As células SN56 foram geradas pela fusão somática de neurônios do septo de camundongos (21 dias) com uma linhagem celular de neuroblastoma (N18TG2) (Hammond et al., 1990), resultando em uma célula híbrida que apresenta várias características do fenótipo colinérgico (Blustajn et al. 1992). As células são mantidas em garrafas de cultura a 37°C, com uma atmosfera de 95% de ar, 5% de CO₂ (Hammond et al., 1990; Blustajn et al. 1992). Este meio era trocado a cada dois dias. Posteriormente, as células foram transferidas para placas de cultura contendo o mesmo meio de crescimento por período de 24 horas. Após este período, este meio foi mecanicamente removido e a diferenciação morfológica das células foi induzida com 1mM de N⁶,O² – dibutilil-adenosina 3',5'- monofosfato cíclico em meio de crescimento contendo todos os componentes com exceção do soro fetal bovino. Durante o processo de diferenciação o meio foi trocado diariamente e foram utilizadas as células com 4 dias de diferenciação. Foram utilizadas nos experimentos células com até 12 passagens.

3.2.14. Procedimentos na câmara de perfusão utilizando as células SN56:

Foram realizados os mesmos procedimentos experimentais citados anteriormente no tópico 3.3.4 para fatias de hipocampo.

3.2.15. Determinação da viabilidade celular nas células SN56:

Para marcação das células com os corantes indicadores, dissolvem-se 4μL de etídio homodímero-1 e 1,5μL calceína-AM (a 2mM e 4mM respectivamente) em 2ml da solução ACSF previamente borbulhada em mistura carbogênica. Mantendo a solução de marcação protegida da luz, ela é dividida em 2 placas de cultura (35mm),

uma para a lamínula com células controle e outro para as pré-tratadas . Estas ficam incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, borbulhadas com mistura gasosa carbogênica. Após este período, as lamínulas são transferidas para outras placas contendo a solução ACSF com glicose borbulhada em mistura carbogênica para proceder à lavagem por 15 minutos. Após a lavagem, as lamínulas contendo células são levadas ao microscópio confocal.

3.3. REPRODUTIBILIDADE E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.

Após a extração dos valores de cada tópico descritos acima, foi utilizado o programa Sigma Plot 8.0 (Jandel Scientific, Chicago, IL, USA) para confecção dos gráficos e do Sigma Stat 5.0 (Jandel Scientific, Chicago, IL, USA) para análise de variância (ANOVA) com teste t- Student. O valor de $p < 0.05$ indica diferença significativa para a comparação.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

Utilizando como referência o modelo experimental utilizado em fatias cerebrais por Monette e cols em 1998, padronizamos o nosso sistema utilizando fatias de hipocampo de ratos wistar.

No microscópio confocal, foi desenvolvida uma rotina na qual as imagens foram obtidas utilizando sondas fluorescentes para indicar morte e sobrevivência celular (ver Material e Métodos). As sondas utilizadas foram calceína-AM e Etídio Homodímero. Esses corantes foram utilizados porque marcam facilmente as células e permitem que trabalhemos com comprimentos de onda dentro do espectro visível, com excitação 488 nm para calceína e 568 nm para Etídio Homodímero e emissão em 522/35 e 598/40 respectivamente.

Para melhor analisar o resultado das imagens obtidas no microscópio confocal foi realizada análise quantitativa da morte celular (Ver Material e Métodos).

Na figura 2A podemos observar a grande quantidade de células viáveis nas fatias controles, comparado com as fatias submetidas ao processo isquêmico. É interessante observar que a região CA1 nas fatias submetidas à isquemia apresenta uma grande quantidade de células mortas (coloridas em vermelho). A análise quantitativa mostrou que houve uma redução de $65\pm 2.9\%$ de células mortas nas fatias controle, quando comparadas com as fatias submetidas à isquemia (Figura 2B).

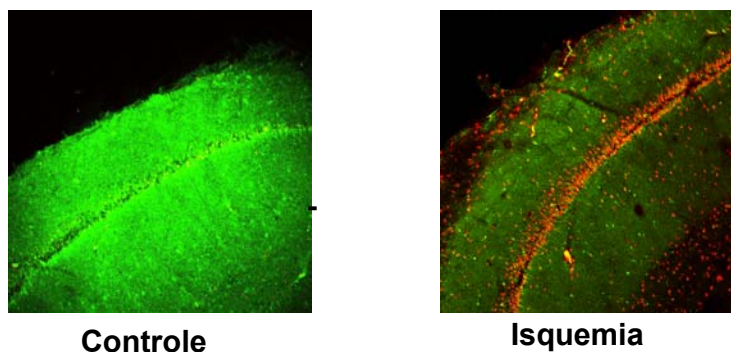
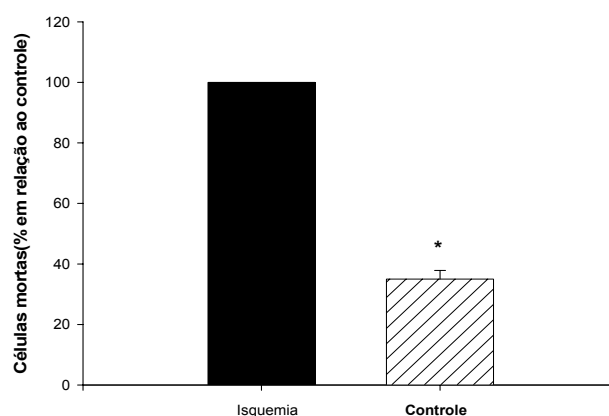
A**B**

Figura 2: Fatias de hipocampo controle e após o processo isquêmico. (A) Imagens representativas das fatias de hipocampo controle e após isquemia. (B) Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo após isquemia e controle .

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Em seguida algumas fatias de hipocampo foram perfundidas por uma solução isquêmica (redução de glicose e de O₂ e aeradas com N₂), enquanto as outras fatias foram mantidas em solução normal. Após o processo isquêmico, ambas as fatias de hipocampo foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias de hipocampo foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes, e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

Para validar nosso modelo experimental, realizamos experimentos com ferramentas farmacológicas para reduzir a concentração dos íons cálcio e também dos íons sódio. Sabe-se através da literatura que a redução na concentração desses íons promove neuroproteção.

Para estudar a importância do cálcio proveniente do meio externo, realizamos primeiramente experimentos reduzindo a concentração de cálcio do meio externo e logo após realizamos experimentos quelando o cálcio do meio extracelular utilizando para isso o EGTA. A figura 3 mostra que houve uma redução no número de células mortas nas fatias submetidas ao processo isquêmico com 0.3 mM de cálcio ($45\pm 2.3\%$) comparado com o controle das mesmas.

Este mesmo procedimento foi realizado utilizando EGTA, onde as fatias de hipocampo foram submetidas ao processo isquêmico na presença de 0.5mM desse agente. A figura 3 mostra que as fatias submetidas à isquemia com solução contendo EGTA 0.5mM apresentaram $35\pm 2.6\%$ de redução no número de células mortas, quando comparadas com as fatias controle dos mesmos.

A proteção conferida tanto pela solução contendo baixa concentração de cálcio e aquela por 0.5mM de EGTA não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as mesmas.

Para reduzir a concentração dos íons sódio durante o processo isquêmico, utilizamos a tetrodotoxina (TTX), um bloqueador de canais de sódio, como ferramenta farmacológica.

A figura 4 mostra que houve uma redução no número de células mortas ($25\pm 2.6\%$) nas fatias de hipocampo pré incubadas com TTX $1\mu\text{M}$, quando comparadas com aquelas fatias que não foram pré incubadas com TTX.

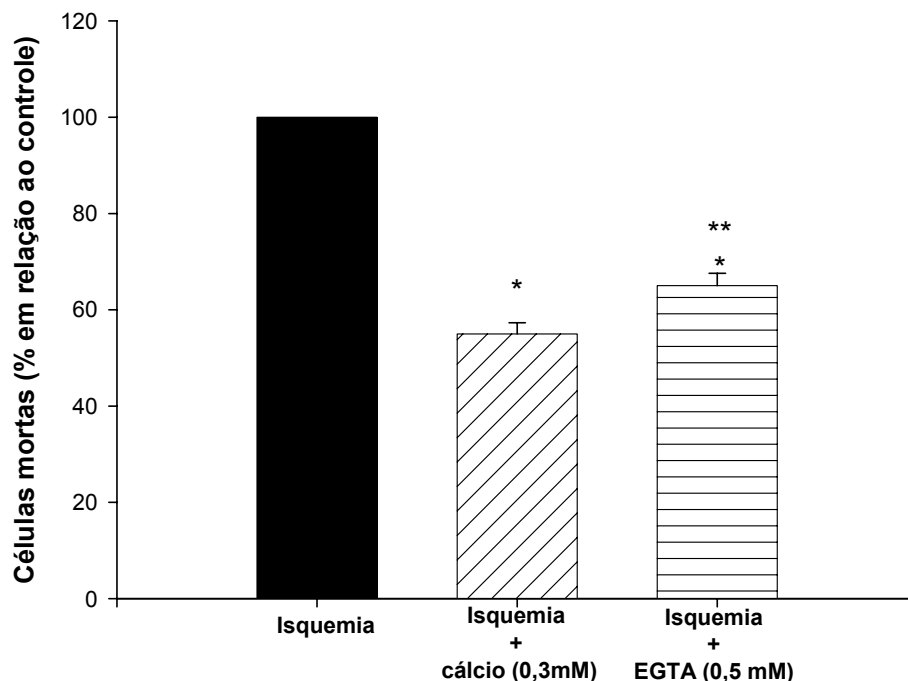


Figura 3: Efeito da redução de cálcio no meio extracelular no processo de isquemia. As fatias foram submetidas a solução isquêmica com baixa concentração de cálcio (0,3mM) e na presença de EGTA 0.5mM (quelante de cálcio externo).

* $p < 0,05$

** $p > 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este período, as fatias foram submetidas ao processo de pré-incubação solução ACSF normal. Em seguida as fatias de hipocampo foram submetidas ao processo isquêmico por 10min por uma solução privada de glicose e de O_2 e aeradas com N_2 em que uma das câmaras contendo parte das fatias foi adicionada uma solução contendo ACSF com 0,3mM de cálcio e na outra câmara foi adicionada ACSF com EGTA (0,5mM). Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

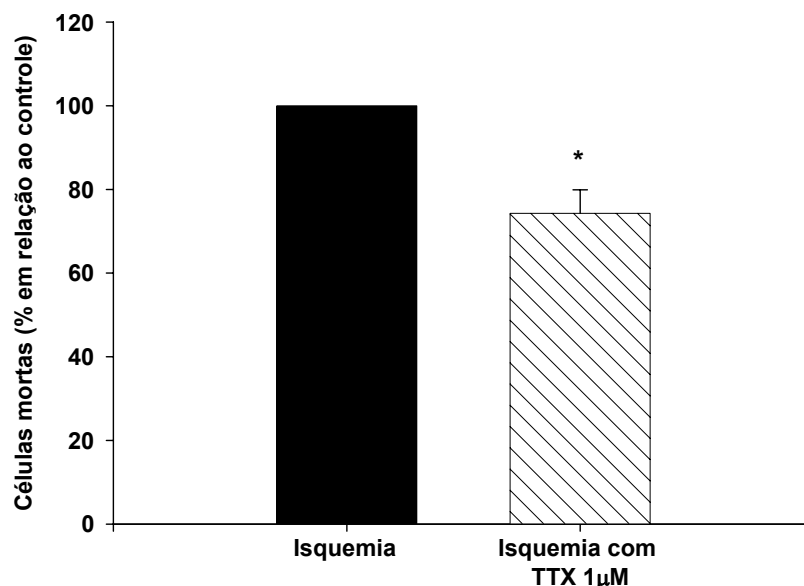


Figura 4: Efeito da tetrodotoxina no processo de isquemia. As fatias foram submetidas ao processo de incubação com TTX 1µM e em seguida foram submetidas ao processo isquêmico.

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo uma das câmaras contendo parte das fatias foi submetida a um processo de pré-incubação com uma solução contendo TTX 1µM e a outra câmara sofreu o mesmo processo sendo que a solução presente nesta não continha TTX. Em seguida as fatias foram perfundidas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O₂ e aerada com N₂). Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias foram marcadas com calceína e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

4.2 A FRAÇÃO PhTX3 APRESENTOU NEUROPROTEÇÃO SUPERIOR À ω -CONOTOXINA GVIA E À ω -CONOTOXINA MVIIC

Após a validação do nosso modelo experimental realizamos testes com a fração PhTX3 da aranha *Phoneutria nigriventer*. Para avaliar o efeito neuroprotetor dessa fração testamos conjuntamente a ação neuroprotetora de toxinas bloqueadoras de canais de cálcio (ω -conotoxina GVIA e ω -conotoxina MVIIC).

A figura 5 mostra fatias controles e/ou testadas com ω -conotoxina GVIA, um bloqueador de canal de cálcio do tipo N. As fatias de hipocampo pré incubadas com ω -conotoxina GVIA 1.0 μ M mostraram proteção celular parcial, com células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo (Figura 5A). Análise quantitativa dessa neuroproteção mostrou um valor de 32 \pm 2.3% de células vivas quando comparada com o controle (Figura 5B), $p < 0,05$.

Quando as fatias de hipocampo foram pré-incubadas com ω -conotoxina MVIIC, bloqueadora de canais de cálcio do tipo –N, -P/Q, observamos redução no número de células mortas de 46 \pm 2.9%, quando comparadas com as fatias que sofreram o mesmo processo, mas não foram pré incubadas com a toxina (Figura 6B).

Após realizarmos experimentos com neurotoxinas de caramujo bloqueadoras de canais de cálcio (ω -conotoxina GVIA e ω -conotoxina MVIIC) utilizamos a fração PhTx3 da aranha *Phoneutria nigriventer*. A neuroproteção conferida por esta foi bastante robusta. Na figura 7A podemos observar uma redução significativa de células mortas nas fatias pré incubadas com a fração PhTx3, quando comparadas com aquelas que não receberam tratamento com essa fração. Houve uma redução 82 \pm 4.1% no número de células mortas nas fatias pré incubadas com a fração PhTx3 comparado com o controle (Figura 7B).

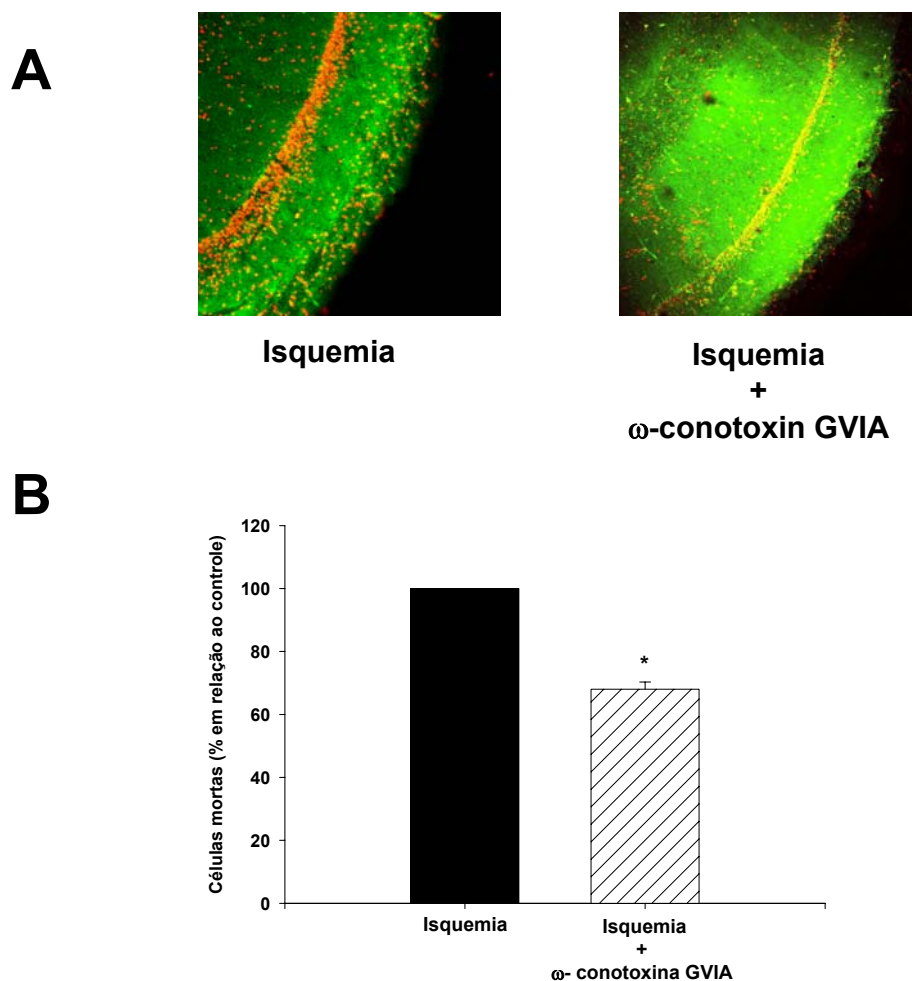


Figura 5: Efeito da ω -conotoxina GVIA no processo de isquemia cerebral. (A) Imagens representativas das fatias de hipocampo após isquemia sem toxina e após isquemia com toxina. (B) Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo após isquemia.

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo uma das câmaras contendo parte das fatias foi submetida a um processo de pré-incubação com uma solução contendo 1.0 μ M de ω -conotoxina GVIA e a outra câmara sofreu o mesmo processo sendo que esta continha apenas ACSF. Em seguida as fatias foram perfundidas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O₂ e aerada com N₂). Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

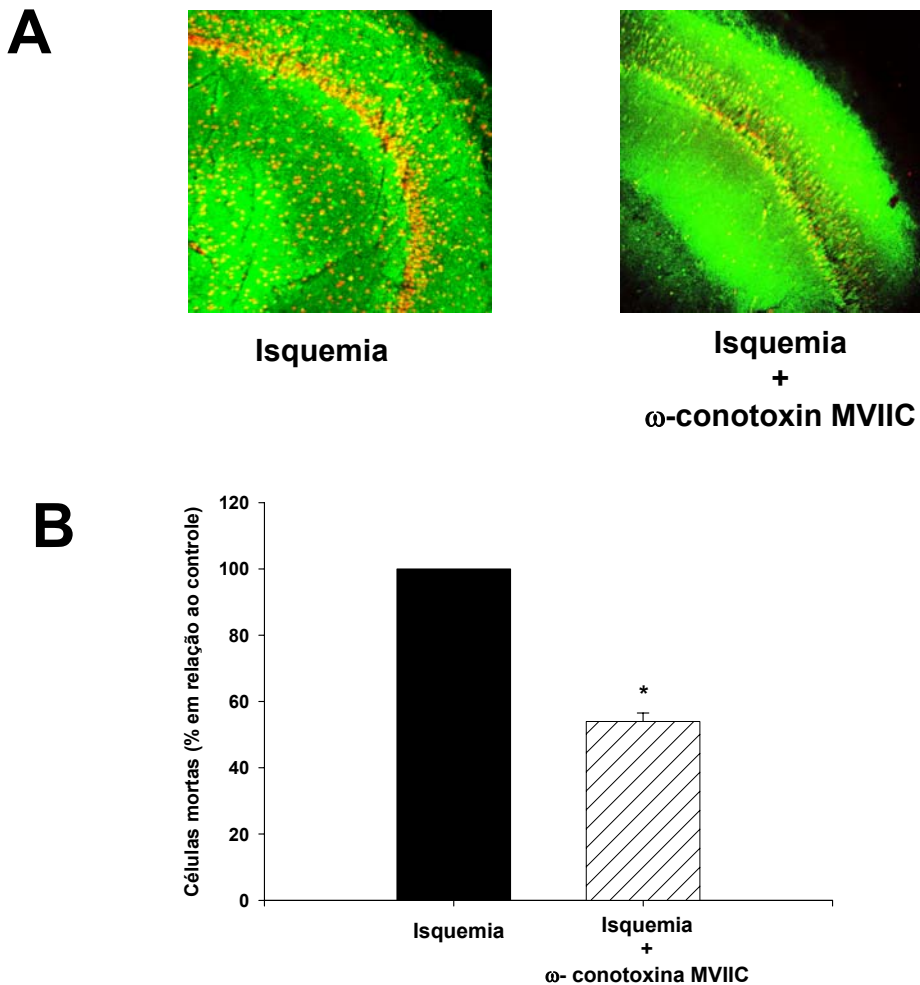


Figura 6: Efeito da ω-conotoxina MVIIC no processo de isquemia cerebral. (A) Imagens representativas das fatias de hipocampo após isquemia sem toxina e após isquemia com toxina. (B) Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo após isquemia.

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo uma das câmaras contendo parte das fatias foi submetida a um processo de pré-incubação com uma solução contendo 1.0 μM de ω-conotoxina MVIIC e a outra câmara sofreu o mesmo processo sendo que esta continha apenas ACSF. Em seguida as fatias foram perfundidas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O₂ e aerada com N₂). Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

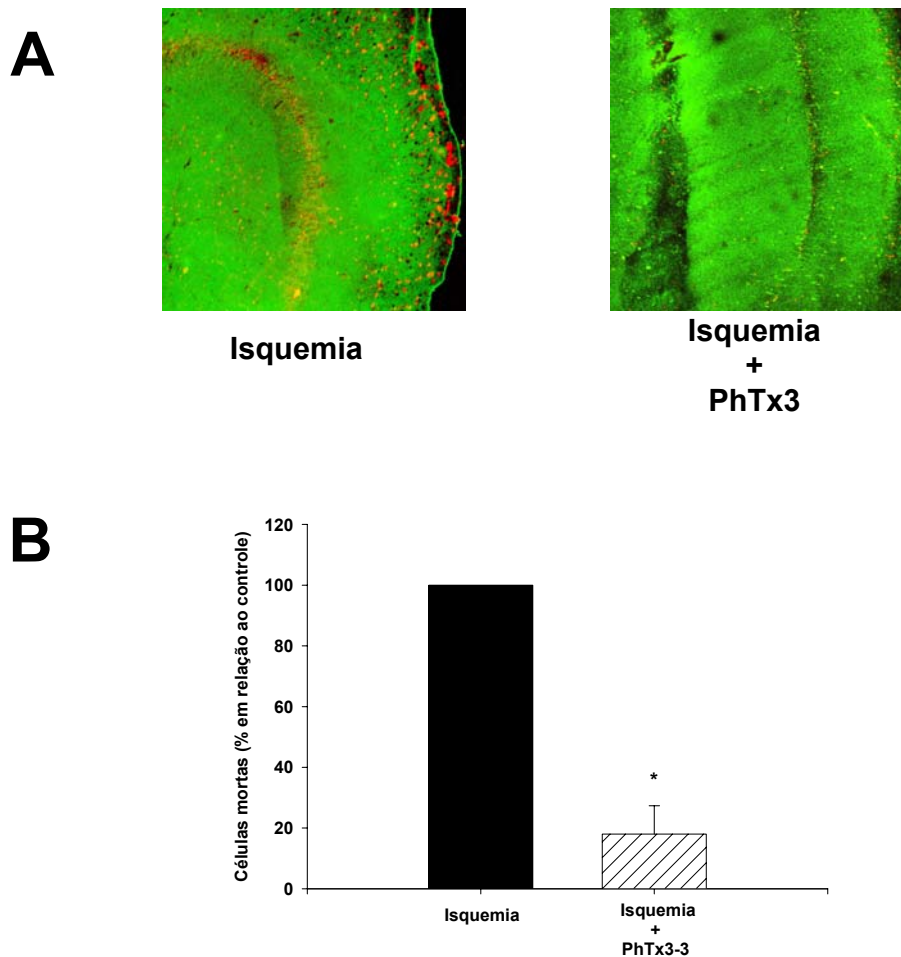


Figura 7: Efeito da fração PhTx3 no processo de isquemia cerebral.(A) *Imagens representativas das fatias de hipocampo após isquemia sem toxina e após isquemia com toxina.* (B) *Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo após isquemia.*

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo uma das câmaras contendo parte das fatias foi submetida a um processo de pré-incubação com uma solução contendo 1.0 µg/mL de PhTx3-3 e a outra câmara sofreu o mesmo processo sendo que esta continha apenas ACSF. Em seguida as fatias foram perfundidas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O₂ e aerada com N₂). Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

Esses mesmos experimentos foram realizados com uma linhagem de células neuronais (SN56). (Figura 8)

Quando as células foram pré tratadas com as toxinas ω -conotoxina GVIA(1.0 μ M), ω -conotoxina MVIIC (1.0 μ M) e o pool PhTx3(1.0 μ g/mL) observamos neuroproteção semelhante aquela quando se utilizou fatias de hipocampo. A análise quantitativa mostrou (44 \pm 3.8), (36 \pm 2.8%),e (73 \pm 4.7%) respectivamente de neuroproteção, quando comparada com as células que foram submetidas apenas ao processo isquêmico (Figura 9).

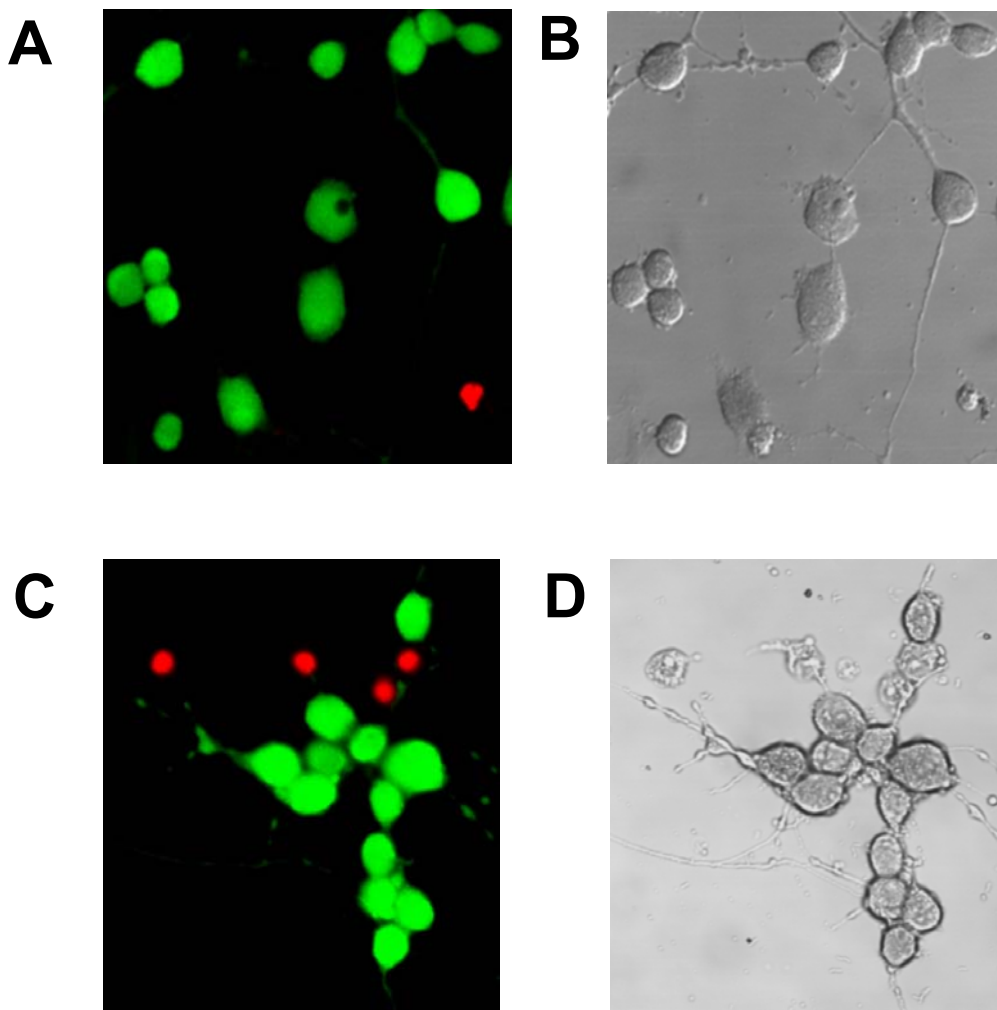


Figura 8: Imagens representativas das células SN56 antes e após o processo isquêmico. (A) Células SN56 controles marcadas com calceína-AM e etídio homodímero. (B) Imagem de luz transmitida das células SN56 controles. (C) Células SN56 submetidas à isquemia marcadas com calceína-AM e etídio homodímero. (D) Imagem de luz transmitida das células SN56 após isquemia.

As células SN56 foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para ambientação ao novo meio. Em seguida 1 lamínula contendo células SN56 foi perfundida por uma solução isquêmica (redução de glicose e de O₂ e aerada com N₂), enquanto a outra lamínula contendo células SN56 foi mantida em solução normal. Após o processo isquêmico, ambas as lamínulas foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as células foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram analisados 8 campos diferentes em cada amostra.

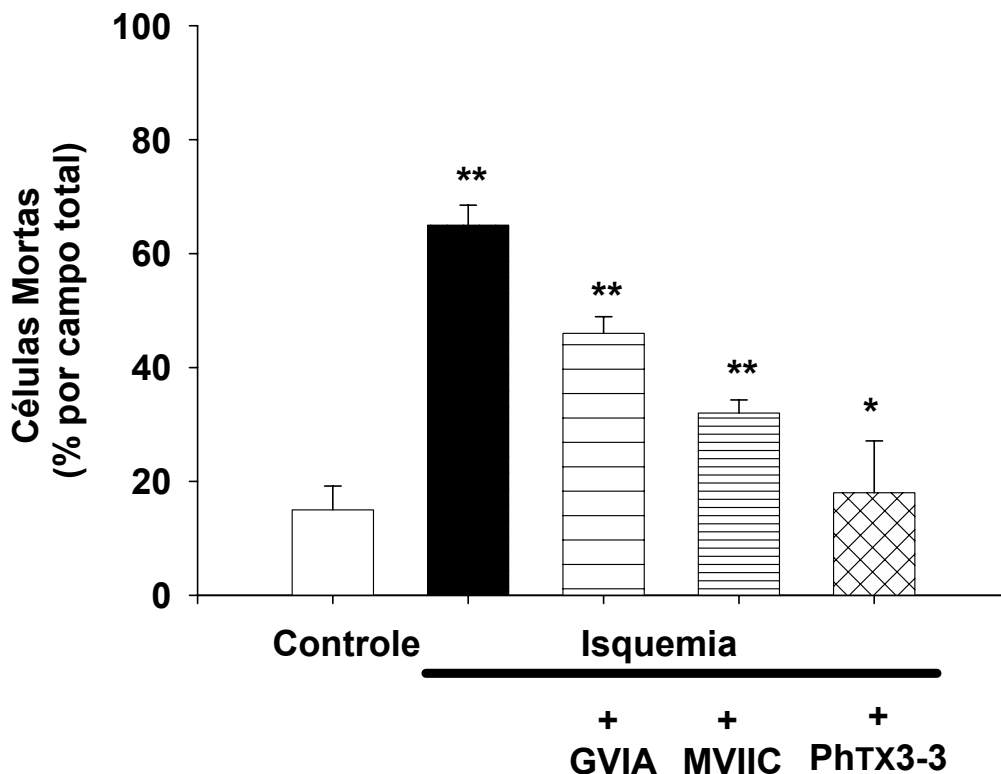


Figura 9: Efeito das toxinas PhTx3, GVIA e MVIIC no processo de isquemia em células SN56. Representação quantitativa das células SN56 após isquemia sem toxina e após isquemia com as toxinas.

* $p < 0,05$

** $p > 0,05$

As células SN56 foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para ambientação ao novo meio. Após este processo uma das câmaras contendo células SN56 foi submetida a um processo de pré-incubação com uma solução contendo a fração PhTx3, a ω -conotoxina GVIA ou a ω -conotoxina MVIIC e a outra câmara contendo células SN56 sofreu o mesmo processo sendo que esta continha apenas ACSF. Em seguida as células foram perfundidas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O₂ e aerada com N₂). Após o processo isquêmico, ambas as câmaras contendo as células foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as células foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes e em cada experimento foram analisadas 8 campos de cada amostra.

4.3 A NEUROTOXINA TX3-4 APRESENTOU NEUROPROTEÇÃO SUPERIOR A NEUROTOXINA TX3-3 NO MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL IN VITRO.

Após observarmos o efeito neuroprotetor da fração PhTX3 no processo de isquemia cerebral in vitro, resolvemos investigar as ações neuroprotetoras de isotoxinas isoladas dessa fração.

Nessa fração estão presentes 6 isotoxinas isoladas (TX3-1 a TX3-6), dessas isotoxinas optamos em estudar a ação das isotoxinas TX3-3 e TX3-4 como prováveis agentes neuroprotetores na isquemia cerebral in vitro, devido a suas particularidades. Essas isotoxinas são conhecidas por suas ações na liberação de neurotransmissores (acetilcolina e glutamato) e por serem importantes bloqueadoras de canais de cálcio.

Quando as fatias de hipocampo foram pré incubadas com a toxina TX3-3 (8.0 nM) observamos uma redução de $68 \pm 4.2\%$, quando comparadas com as fatias que foram somente submetidas a isquemia (Figura 10).

Após pré incubarmos as fatias de hipocampo com a toxina TX3-4 (8.0nM) observamos uma redução de $77 \pm 3.8\%$ células mortas, quando comparadas com as fatias controle que foram submetidas apenas a isquemia (Figura 11).

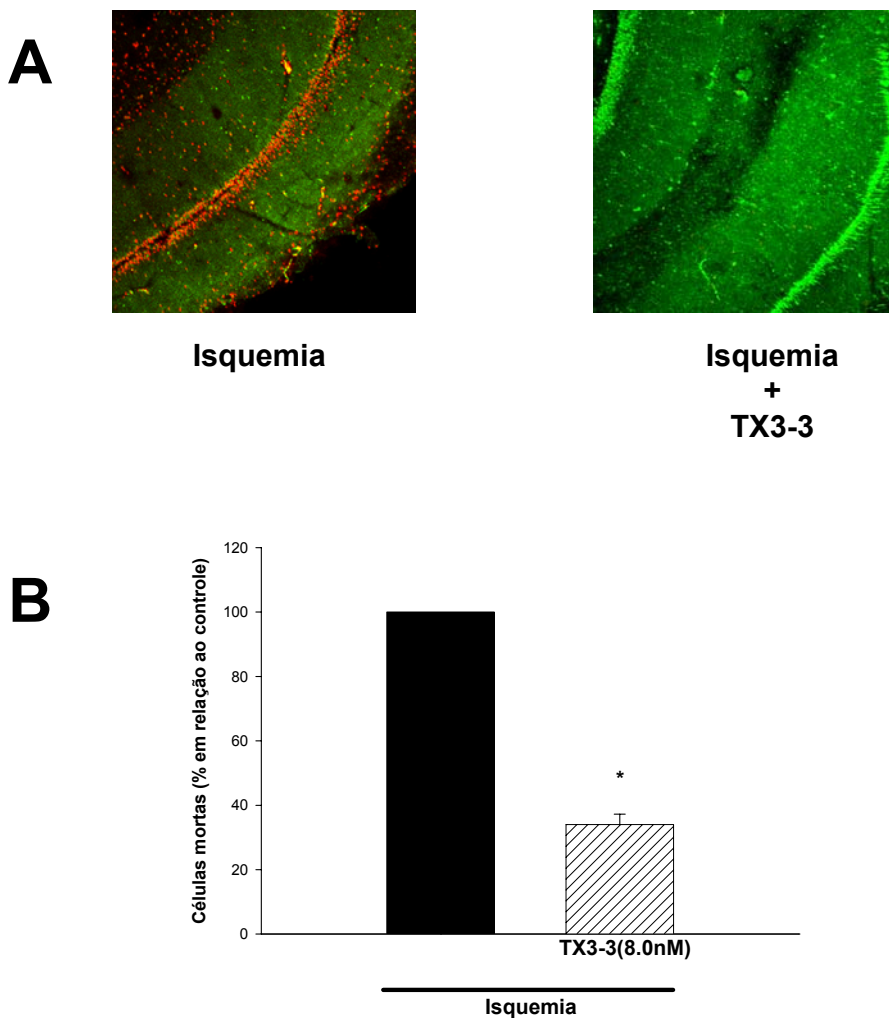


Figura 10: Efeito da toxina TX3-3 no processo de isquemia. (A) Imagens representativas das fatias de hipocampo após isquemia sem toxina e após isquemia com toxina. (B) Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo após isquemia.

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo uma das câmaras contendo parte das fatias foi submetida a um processo de pré-incubação com uma solução contendo 0,8nM de TX3-3 e a outra câmara sofreu o mesmo processo sendo que esta continha apenas ACSF. Em seguida as fatias foram perfundidas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O₂ e aerada com N₂). Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

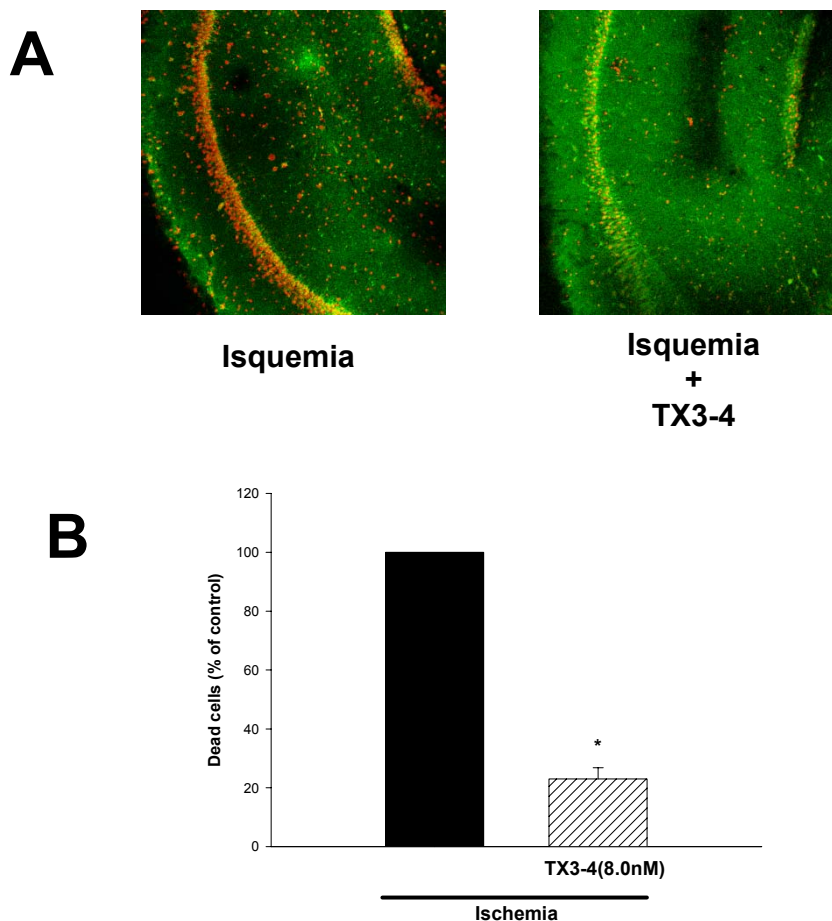


Figura 11: Efeito da toxina TX3-4 no processo de isquemia cerebral. (A) Imagens representativas das fatias de hipocampo após isquemia sem toxina e após isquemia com toxina. (B) Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo após isquemia.

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo uma das câmaras contendo parte das fatias foi submetida a um processo de pré-incubação com uma solução contendo 16nM de TX3-4 e a outra câmara sofreu o mesmo processo sendo que esta continha apenas ACSF. Em seguida as fatias foram perfundidas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O₂ e aerada com N₂). Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

4.4 AS NEUROTOXINAS TX3-3 E TX3-4 APRESENTARAM NEUROPROTEÇÃO ATÉ 1H APÓS O EVENTO ISQUÊMICO INSTALADO NO MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL *IN VITRO*.

Como descrito anteriormente na metodologia, os nossos experimentos foram realizados pré incubando os compostos testes de interesse 30 min antes de induzir o processo de isquemia.

Após verificar que as isotoxinas TX3-3 e TX3-4 da aranha *Phoneutria nigriventer* apresentaram efeito neuroprotetor no modelo experimental de isquemia cerebral *in vitro*, a nossa próxima pergunta foi: As isotoxinas TX3-3 e TX3-4 são capazes de produzir neuroproteção depois de instalado o processo isquêmico? Para responder essa pergunta realizamos experimentos adicionando essas toxinas depois de 10, 20, 30 ou 60 min do processo isquêmico instalado.

Primeiramente realizamos experimentos com a isotoxina TX3-3. As fatias de hipocampo foram submetidas ao processo de isquemia durante 10 min com uma solução contendo ACSF e aerado por uma mistura carbogênica contendo (95% de N₂ e 5% de CO₂). Após 10, 20, 30 e 60 min em experimentos separados, adicionamos 8.0nM de TX3-3 por 30 min. Em seguida, as fatias foram mantidas em uma solução ACSF aerada com uma mistura carbogênica contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂ durante 4 horas (período de reperfusão).

Observamos efeito neuroprotetor da toxina TX3-3 de (62±3.2%), (56±4.6%), (65.5±4.8%) e (48±3.6%) após 10, 20, 30 e 60 min respectivamente do processo de isquemia instalado (Figura 12A).

Realizamos os mesmos experimentos com a isotoxina TX3-4. As fatias de hipocampo foram submetidas ao processo de isquemia durante 10 min com uma solução contendo ACSF e aerada por uma mistura carbogênica contendo (95% de

N₂ e 5% de CO₂). Após 10, 20, 30 e 60 min em experimentos separados, nós adicionamos 8.0nM de TX3-4 por 30 min. Em seguida, as fatias foram mantidas em uma solução ACSF aerada com uma mistura carbogênica contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂ durante 4 horas (período de reperfusão). Após o término de cada experimento obtivemos os seguintes resultados: (66±4.2%), (63±3.2%), (65±4.6%) e (66±3.7%) após 10, 20, 30 e 60 min respectivamente do processo de isquemia instalado (Figura 12B).

Após 1 hora e 30 minutos do evento isquêmico instalado houve uma redução significativa do efeito neuroprotetor exercido pelas toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* (TX3-3 e TX3-4). Estas apresentaram (32±4.3% e 36±3.7%) respectivamente. Após 2 horas não observamos efeitos neuroprotetores significativos para as toxinas TX3-3 e TX3-4 (9±2.7% e 12±3.6%) respectivamente (Figura 13).

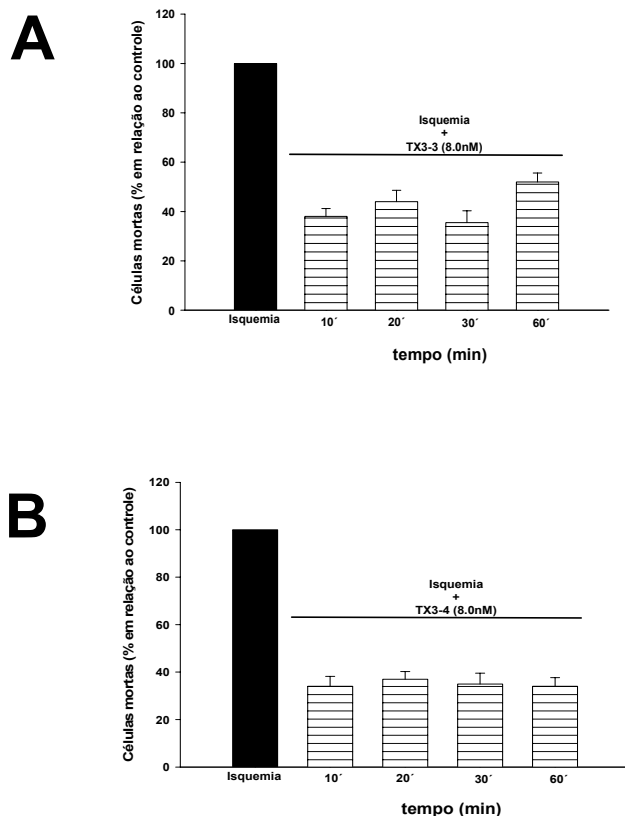


Figura 12: Efeito das toxinas TX3-3 e TX3-4 em diferentes intervalos de tempo após o processo de isquemia. (A) Representação quantitativa das fatias de hipocampo com adição da toxina TX3-3 (8.0nM) depois de 10, 20, 30 e 60 min do processo de isquemia instalado. (B) Representação quantitativa das fatias de hipocampo com adição da toxina TX3-4 (8.0nM) depois de 10, 20, 30 e 60 do processo de isquemia instalado.

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. No período de pré incubação as fatias foram mantidas em solução ACSF durante 30 min. Em seguida as fatias foram perfundidas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O₂ e aerada com N₂). Posteriormente ao processo isquêmico as fatias foram incubadas durante 30' com a toxina TX3-3 (0,8nM) ou TX3-4 (16nM) em diferentes tempos (10', 20', 30' e 60'). Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo

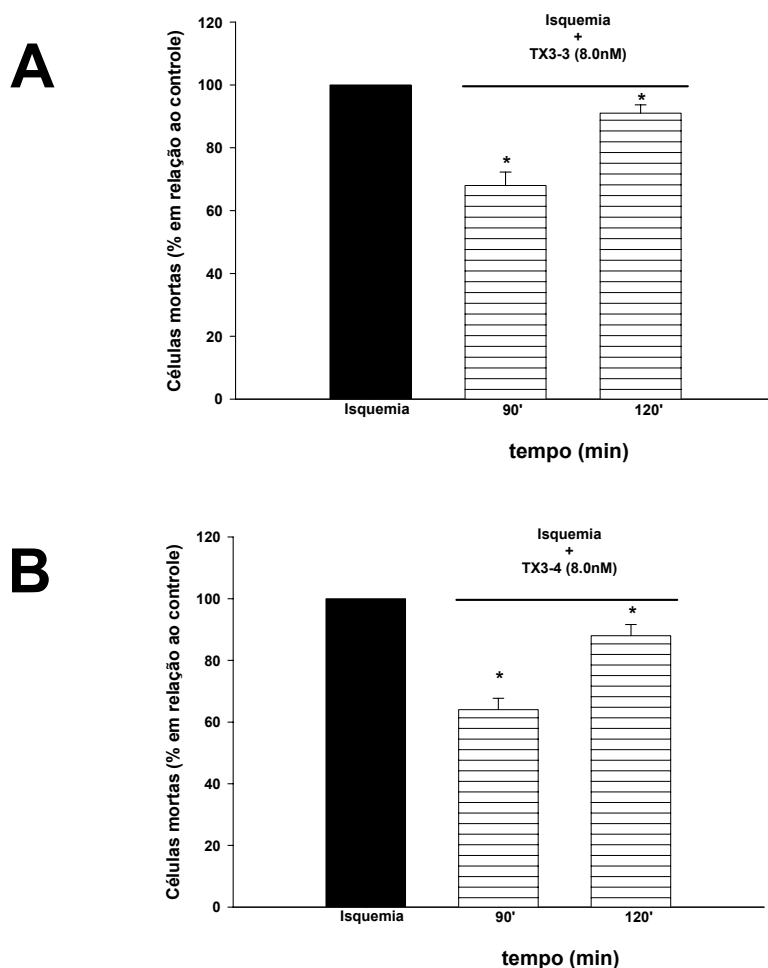


Figura 13: Efeito das toxinas TX3-3 e TX3-4 após 90 e 120 do processo de isquemia instalado. (A) Representação quantitativa das fatias de hipocampo após isquemia com adição da toxina TX3-3 (8.0nM). (B) Representação quantitativa das fatias de hipocampo após isquemia com adição da toxina TX3-4 (8.0 nM).

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. No período de pré incubação as fatias foram mantidas em solução ACSF durante 30 min. Em seguida as fatias foram perfundidas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O₂ e aerada com N₂). Posteriormente ao processo isquêmico as fatias foram incubadas durante 30' com a toxina TX3-3 (0,8nM) ou TX3-4 (16nM) após 90 e 120 minutos. Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

4.5 O CÁLCIO INTRACELULAR APRESENTA PAPEL IMPORTANTE NO PROCESSO DE ISQUEMIA CEREBRAL *IN VITRO*:

Após estudarmos o papel do cálcio extracelular na isquemia cerebral, decidimos estudar o papel do cálcio intracelular nesse mesmo processo. Para isso utilizamos primeiramente o BAPTA-AM, um quelante de cálcio intracelular para avaliar o efeito deste íon estocado em organelas citoplasmáticas.

Nesses experimentos, as fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 30min em meio de incubação na presença ou ausência do BAPTA-AM (100 μ M) e, subseqüentemente foram submetidas ao processo isquêmico. A figura 14A mostra que o BAPTA-AM protegeu as fatias do processo isquêmico. Observamos uma redução de $55\pm 2.9\%$ no número de células mortas nas fatias pré incubadas com 100 μ M de BAPTA quando comparado com as fatias que não foram pré incubadas com esse agente (Figura 14B). Esse resultado indica o envolvimento do cálcio intracelular no processo de isquemia cerebral.

4.5.1 O cálcio proveniente do retículo endoplasmático através da participação dos receptores de IP₃ está envolvido no processo de isquemia cerebral *in vitro*:

Após observarmos que os estoques de cálcio intracelular presentes em organelas intracelulares poderiam estar envolvidos no processo isquêmico, investigamos o papel do cálcio estocado no retículo endoplasmático neste processo de morte neuronal. Para realizar este trabalho utilizamos primeiramente um antagonista dos receptores de rianodina, o dantroleno, para investigar se o cálcio que poderia estar sendo liberado através dos receptores rianodina, teria alguma

influência no processo isquêmico. Nesses experimentos, as fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 30min em meio de incubação na presença ou ausência do dantroleno (100 μM) e, subseqüentemente foram submetidas ao processo isquêmico. A figura 15A mostra que o dantroleno não protegeu as fatias do processo isquêmico. Esse resultado indica que os receptores de rianodina não estão envolvidos no processo de morte celular induzido pela privação de glicose/oxigênio em fatias de hipocampo. A análise quantitativa (Figura 15B) mostra uma pequena redução, $9\pm 2.3\%$ (não significativa, $p>0.05$) no número de células mortas das fatias de hipocampo tratadas com dantroleno comparada com aquelas que não foram tratadas.

Após estudar a possível participação dos receptores de rianodina na isquemia cerebral, investigamos a contribuição dos estoques de cálcio sensíveis a IP3 no mesmo evento. Para isso utilizamos o 2-APB, que bloqueia a liberação de cálcio proveniente de receptores IP3. A figura 16 A mostra que o 2-APB protegeu as fatias do processo isquêmico. Esse resultado indica que os receptores de IP3 estão envolvidos no processo de morte celular induzido pela privação de glicose/oxigênio em fatias de hipocampo. A análise quantitativa (Figura 16B) mostra forte redução no número de células mortas ($45\pm 2.9\%$) das fatias de hipocampo tratadas com 2-APB comparada com aquelas que não foram tratadas.

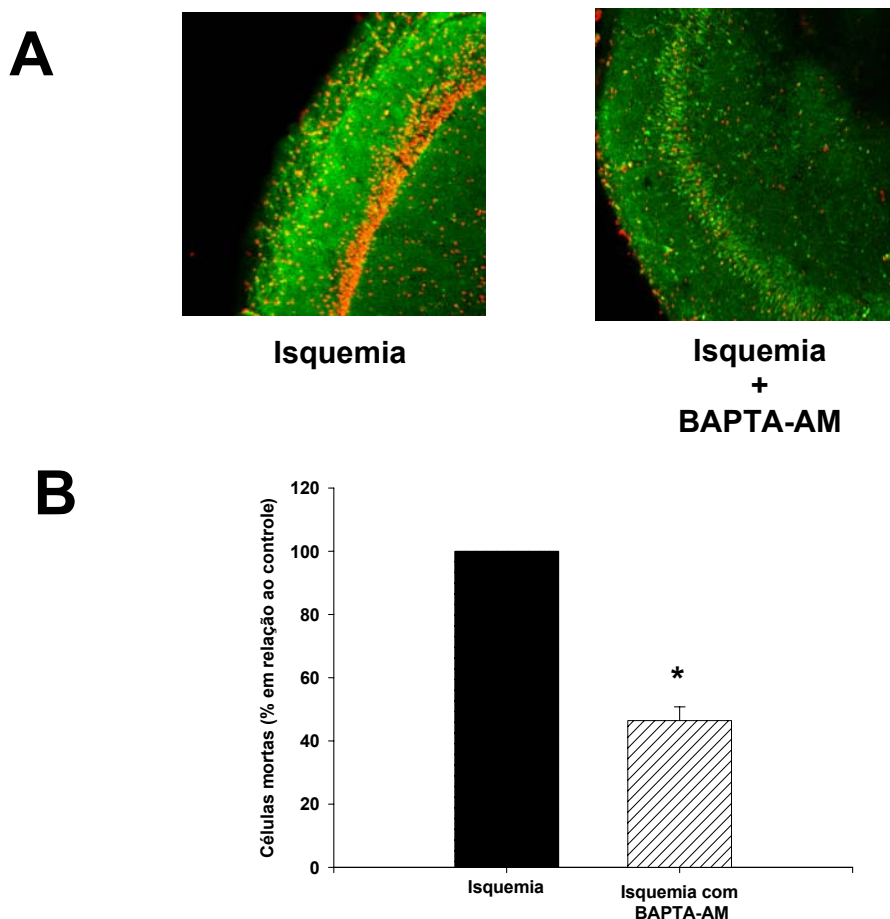


Figura 14: Efeito do BAPTA-AM no processo de isquemia.(A) *Imagem representativa das fatias de hipocampo após isquemia sem BAPTA-AM e após isquemia com BAPTA-AM. (B) Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo após isquemia.*

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo uma das câmaras contendo parte das fatias foi submetida a um processo de pré-incubação com uma solução contendo BAPTA-AM 100 μ M e a outra câmara sofreu o mesmo processo sendo que esta continha apenas ACSF. Em seguida as fatias foram perfundidas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O_2 e aerada com N_2). Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

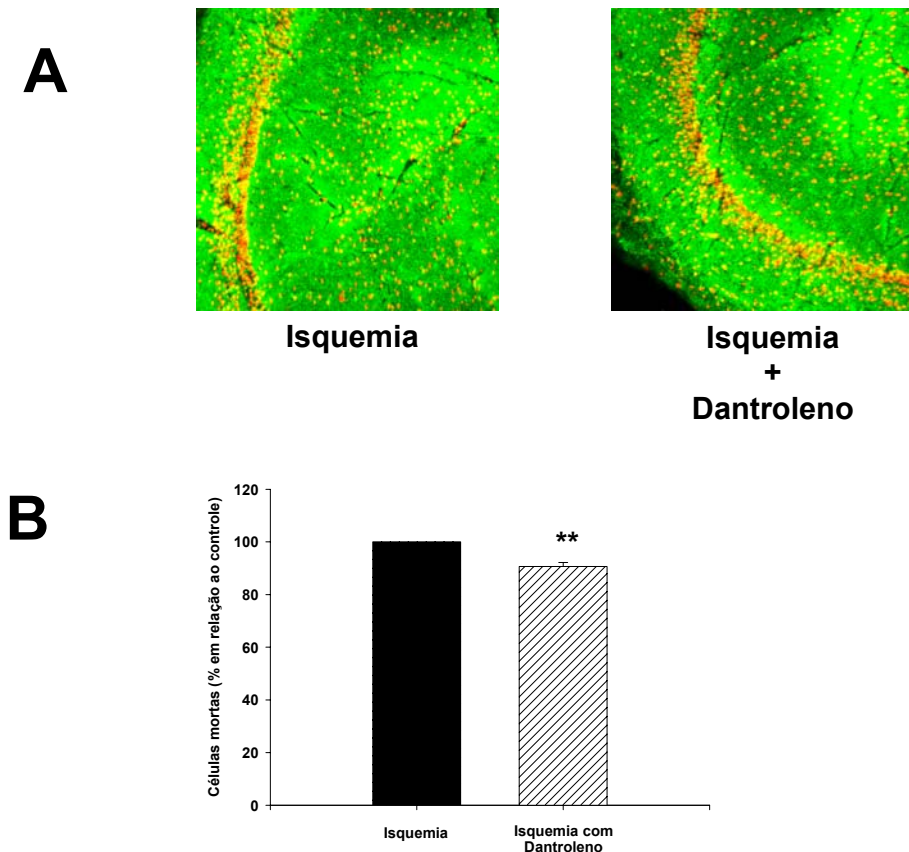


Figura 15: Efeito do dantroleno no processo de isquemia. (A) Imagem representativa das fatias de hipocampo após isquemia sem dantroleno e após isquemia com dantroleno. (B) Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo após isquemia.

** $p > 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo uma das câmaras contendo parte das fatias foi submetida a um processo de pré-incubação com uma solução contendo dantroleno 100µM e a outra câmara sofreu o mesmo processo sendo que esta continha apenas ACSF. Em seguida as fatias foram perfundidas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O₂ e aerada com N₂). Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

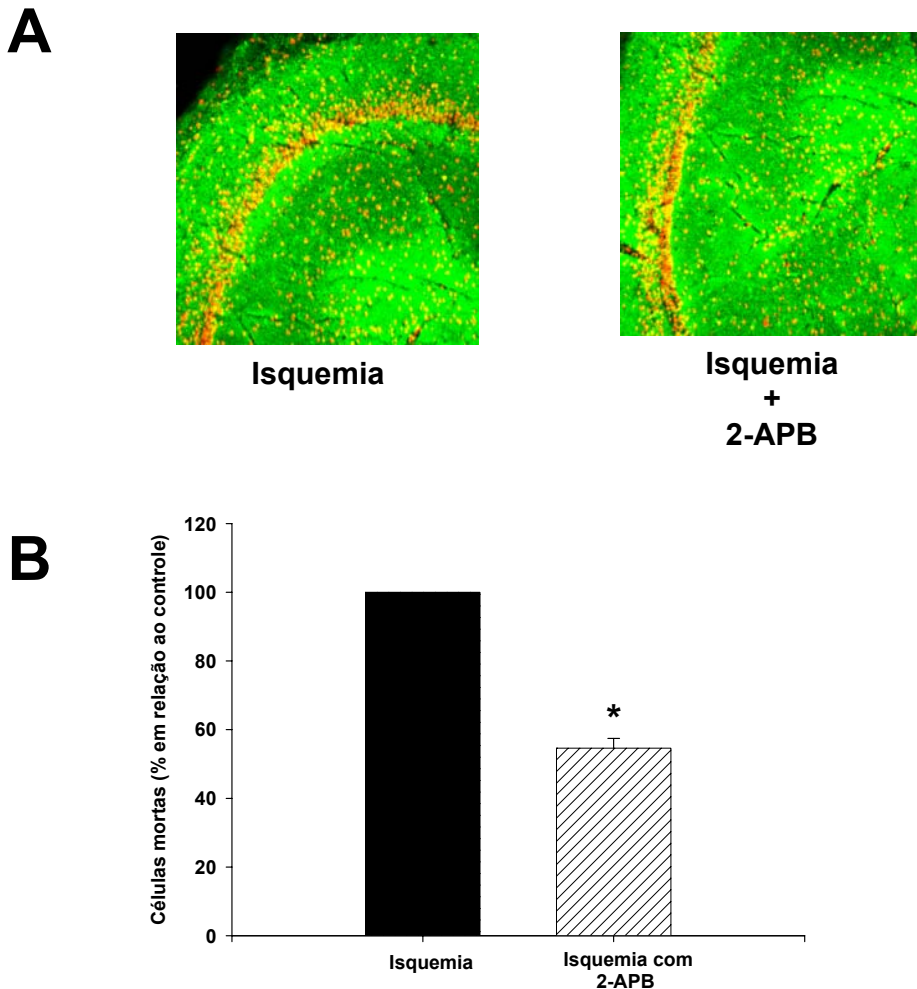


Figura 16: Efeito do 2-APB no processo de isquemia.(A) Imagem representativa das fatias de hipocampo após isquemia sem 2-APB e após isquemia com 2-APB. (B) Porcentagem de células mortas na região CA1 das fatias de hipocampo.

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após este processo uma das câmaras contendo parte das fatias foi submetida a um processo de pré-incubação com uma solução contendo 2-APB 100 μ M e a outra câmara sofreu o mesmo processo sendo que esta continha apenas ACSF. Em seguida as fatias foram perfundidas por uma solução isquêmica (privada de glicose e de O_2 e aerada com N_2). Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). Para obtenção de imagens no microscópio confocal, as fatias foram marcadas com calceína-AM e etídio homodímero por 30 min e lavadas durante 15 min. Foram realizados 7 experimentos independentes e em cada experimento foram analisadas 5 fatias de cada grupo.

4.6 LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO DURANTE O PROCESSO DE ISQUEMIA CEREBRAL:

Sabendo-se que os íons cálcio e a liberação de glutamato estão diretamente envolvidos no processo de morte celular durante o processo de isquemia cerebral, decidimos dosar a liberação de glutamato após os nossos experimentos para avaliar a eficácia dos nossos agentes neuroprotetores em reduzir a liberação deste neurotransmissor.

Utilizando fatias de córtex cerebral de ratos, medimos a liberação de glutamato utilizando vários agentes farmacológicos.

As amostras contendo as fatias de córtex foram mantidas em ACSF (com glicose e aerada com oxigênio) durante 1h 30 min para a recuperação do trauma mecânico. Em seguida, algumas amostras foram submetidas ao processo isquêmico com uma solução de ACSF (privadas de glicose e oxigênio) durante 10 min. As outras amostras permaneceram com ACSF (com glicose e oxigênio) durante todo o experimento. Houve uma liberação de glutamato maior nas fatias que foram submetidas ao processo isquêmico ($12,0 \text{ nM} \pm 0,32$) comparado com o controle ($7,0 \text{ nM} \pm 0,39$) (Figura 16).

A partir da padronização do nosso modelo experimental, investigamos o papel do cálcio extracelular neste processo isquêmico. As amostras contendo as fatias de córtex foram mantidas em ACSF (com glicose e aerada com oxigênio) durante 1h 30 min para a recuperação do trauma mecânico. Em seguida, algumas amostras foram pré incubadas durante 30 min com uma solução de ACSF contendo baixa concentração de cálcio (0.3mM) ou na presença de EGTA (0,5 mM), enquanto as outras permaneceram em solução ACSF normal. Após esta etapa as fatias foram

submetidas ao processo isquêmico com uma solução de ACSF (privadas de glicose e oxigênio) durante 10 min.

As amostras que foram previamente incubadas com uma solução contendo baixa concentração de cálcio (0,3mM) ou na presença de EGTA (0,5mM) apresentaram redução na liberação de glutamato ($8,32 \text{ nM} \pm 0,37$) e ($9,64 \text{ nM} \pm 0,38$) respectivamente comparado com as fatias que foram submetidas apenas a isquemia ($12,0 \text{ nM} \pm 0,39$) (Figura 17).

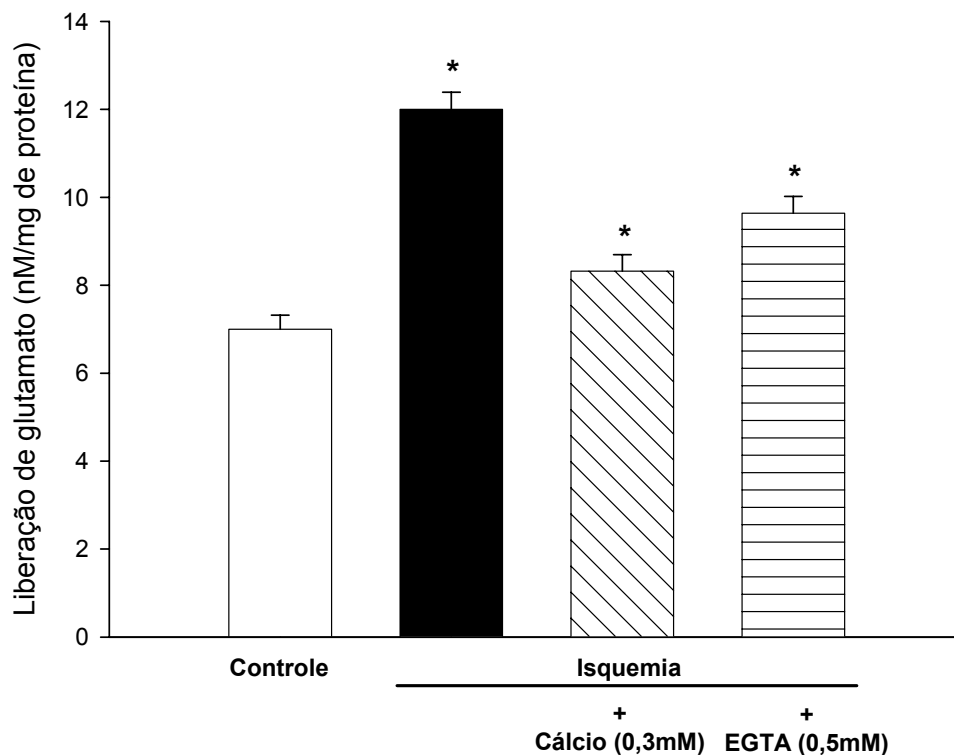


Figura 17: Efeito da redução de cálcio extracelular na liberação de glutamato no processo de isquemia. As fatias foram submetidas a solução isquêmica com baixa concentração de cálcio (0,3mM) e na presença de EGTA 0.5mM (quelante de cálcio externo).

* $p < 0,05$

As fatias de cortex foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após esse procedimento as fatias foram submetidas ao processo de pré-incubação solução ACSF normal, ACSF com cálcio (0,3mM) e ACSF com EGTA (0,5mM). Em seguida as fatias de hipocampo foram submetidas ao processo isquêmico por 10min por uma solução privada de glicose e de O_2 e aeradas com N_2 . Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). Após a realização do procedimento experimental, dosamos a liberação de glutamato.

Para avaliar o efeito dos canais de cálcio dependentes de voltagem na liberação de glutamato no processo de isquemia, utilizamos toxinas bloqueadoras desses canais já conhecidas (ω -conotoxina MVIIC 100 μ M e a ω -conotoxina GVIA 100 μ M). Foi observada uma redução na liberação de glutamato de $8,55 \pm 0,68$ e $9,03 \pm 0,74$ para ω -conotoxina MVIIC e conotoxina GVIA respectivamente quando comparadas com as fatias submetidas apenas a isquemia $12,68 \pm 0,41$ (Figura 17).

Após observarmos o efeito dessas toxinas na liberação de glutamato durante o processo de isquemia in vitro, realizamos os mesmos experimentos testando as toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer*. Foi observado uma redução na liberação de glutamato quando utilizamos o pool PhTx3 ($9,35 \text{ nM} \pm 0,85$), a toxina TX3-3 ($9,75 \text{ nM} \pm 1,04$) e a toxina ($8,47 \pm 0,96$) (Figura 18).

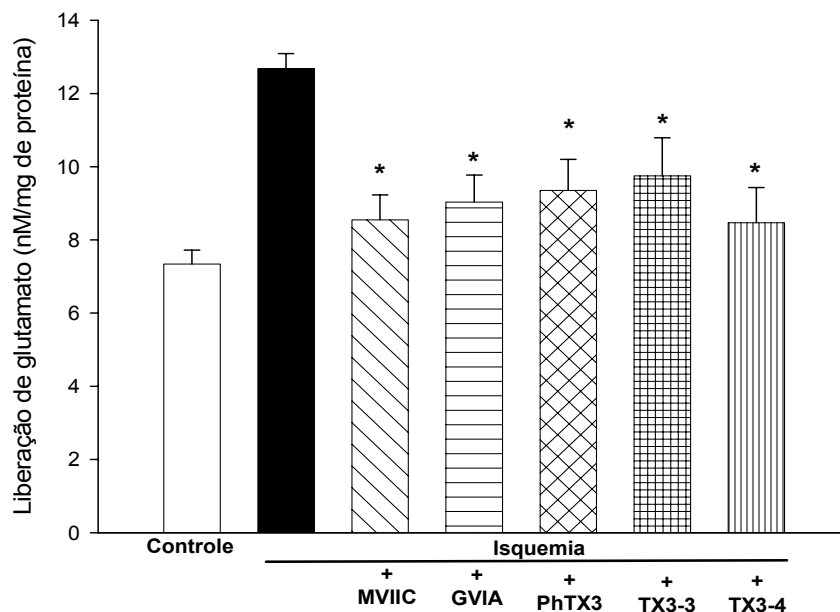


Figura 18: Efeito da ω -conotoxina MVIIC, ω -conotoxina GVIA, fração PhTX3, TX3-3 e TX3-4 na liberação de glutamato no processo de isquemia.

* $p < 0,05$

As fatias de córtex foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após esse procedimento as fatias foram submetidas ao processo de pré-incubação solução ACSF normal, ACSF com MVIIC, ACSF com GVIA, ACSF com PhTX3, ACSF com TX3-3 e TX3-4. Em seguida as fatias de córtex foram submetidas ao processo isquêmico por 10min por uma solução privada de glicose e de O_2 e aerada com N_2 . Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aerada com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). Após a realização do procedimento experimental, dosamos a liberação de glutamato.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DO PROCESSO APOPTÓTICO DURANTE O PROCESSO DE ISQUEMIA CEREBRAL IN VITRO:

Sabendo-se da participação do cálcio intracelular no processo de isquemia cerebral in vitro e a sua relação como a apoptose, investigamos a ação das ferramentas farmacológicas utilizadas para reduzir a concentração de cálcio no processo apoptótico.

Para quantificar o processo apoptótico utilizamos ensaios fluorimétricos capazes de detectar a quantidade de caspase-3.

Os primeiros experimentos realizados foram com bloqueadores de canais de cálcio externo (ω -conotoxina MVIIC, ω -conotoxina GVIA) e em seguida realizamos os experimentos com as toxinas da aranha Phoneutria nigriventer (PhTX3, TX3-3 e TX3-4). Não observamos redução do processo apoptótico quando utilizamos as toxinas descritas acima (203 ± 4.7 ; 210 ± 3.25 ; 212 ± 3.37 nM/mg de proteína), respectivamente comparado como seu controle (223 ± 4.7 nM/mg de proteína).

Em seguida, realizamos experimentos com os bloqueadores de cálcio interno (BAPTA-AM, 2-APB e dantroleno). Observamos redução significativa na atividade de caspase-3 com a utilização dessas drogas (115 ± 4.32 , 136 ± 5.6 , 157 ± 5.85 nM/mg de proteína) respectivamente, quando o resultado foi comparado com as fatias de hipocampo submetidas ao processo isquêmico sem adição de compostos testes (227 ± 5.4 nM/mg de proteína) (Figura 21).

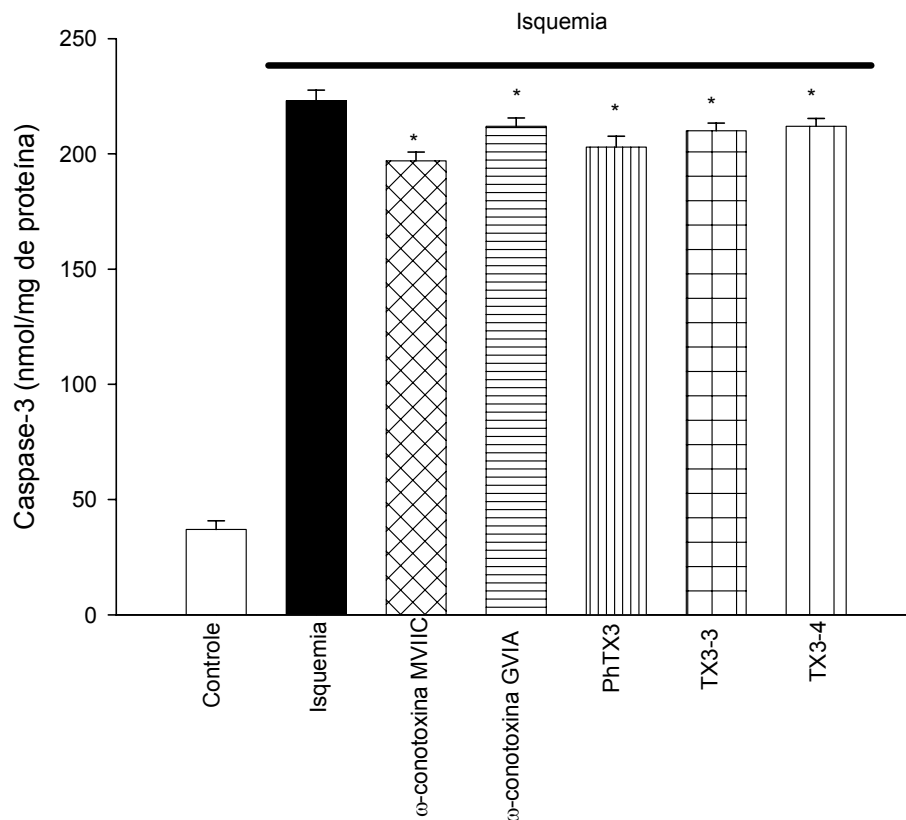


Figura 19: Efeito da ω -conotoxina MVIIC, ω -conotoxina GVIA, fração PhTX3, TX3-3 e TX3-4 na quantificação de caspase-3 no processo de isquemia.

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após esse procedimento as fatias foram submetidas ao processo de pré-incubação solução ACSF normal, ACSF com MVIIC, ACSF com GVIA, ACSF com PhTX3, ACSF com TX3-3 e TX3-4. Em seguida as fatias de hipocampo foram submetidas ao processo isquêmico por 10min por uma solução privada de glicose e de O_2 e aerada com N_2 . Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). No final desta etapa as fatias foram preparadas para o ensaio fluorimétrico e levadas ao espectrofluorímetro. Foram realizados 5 experimentos independentes em dias diferentes.

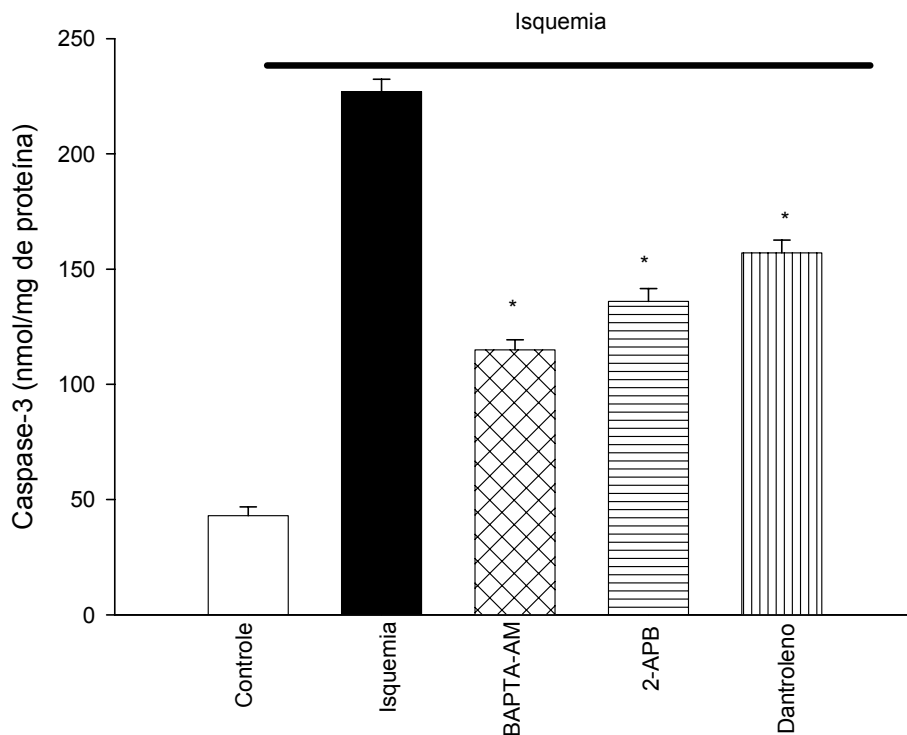


Figura 20: Efeito do BAPTA-AM, 2-APB e dantroleno na quantificação de caspase-3 no processo de isquemia.

* $p < 0,05$

As fatias de hipocampo foram perfundidas com solução ACSF com glicose e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h e 30 minutos para recuperação do trauma mecânico. Após esse procedimento as fatias foram submetidas ao processo de pré-incubação solução ACSF normal, ACSF com BAPTA-AM, ACSF com 2-APB, ACSF com dantroleno. Em seguida as fatias de hipocampo foram submetidas ao processo isquêmico por 10min por uma solução privada de glicose e de O₂ e aeradas com N₂. Após o processo isquêmico, ambas as fatias foram submetidas à recuperação por um período de 4 horas com solução ACSF com glicose e aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). No final desta etapa as fatias foram preparadas para o ensaio fluorimétrico e levadas ao espectrofluorímetro. Foram realizados 5 experimentos independentes em dias diferentes.

5. DISCUSSÃO

5.DISSCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL:

O modelo de fatias de hipocampo cerebral e de cultura celular *in vitro* utilizado em nossos experimentos apresenta várias vantagens sobre os modelos celulares *in vivo* para avaliar a eficácia terapêutica de novas substâncias. O custo e o tempo de execução dos experimentos são bem menores. O modelo é menos complexo e permite um controle melhor das variáveis para facilitar a investigação dos mecanismos de ação (GOLDBERG e cols, 1997).

O ensaio de viabilidade celular utilizado em modelos *in vitro* geralmente compreende análise dos aspectos funcionais e morfológicos (SCWARTZ e cols, 1995). Utilizamos a dupla marcação com etídio homodímero e calceína-AM. Essa marcação é visualizada por microscopia confocal em que podemos observar neurônios de 50-100 μ M em uma mesma fatia. A combinação de calceína e etídio homodímero permite a visualização simultânea de todas as células na fatia, tanto células vivas quanto células mortas, conseqüentemente podemos observar todas as populações neuronais da fatia. Essa dupla marcação é um método relativamente simples e rápido para avaliar a viabilidade neuronal em fatias de hipocampo com 400 μ M de espessura sem a necessidade de agentes fixativos, como utilizado em outros métodos bioquímicos (MONETTE e cols, 1998).

Podem ser utilizados outros métodos para avaliar a viabilidade neuronal em fatias cerebrais, como análises microscópicas convencionais, medidas bioquímicas e eletrofisiológicas (LIGENHOHL e cols, 1997; SMALL e cols, 1997; SMALL e cols, 1995). Análises morfológicas utilizando microscopia convencional baseiam-se nas características de visualização morfológica de células necróticas ou apoptóticas como núcleo picnótico, rupturas na membrana e condensação nuclear. Esse método

oferece dados morfológicos precisos, mas requer várias preparações do tecido como fixação, desidratação, marcação, inclusão em materiais específicos para realizar os cortes e o seccionamento. Após todo esse preparo do tecido, este é analisado por profissionais competentes para a contagem extremamente laboriosa de células mortas.

Outros métodos bioquímicos de viabilidade celular são utilizados, entre eles podemos citar o uso de marcadores da atividade mitocondrial, como o cloreto de trifeniltretazolium (TTC) (GLENNER e cols, 1969; STRAUS e cols, 1948), que forma um depósito nas células com mitocôndria ativa. O método TTC não oferece resolução suficiente para análise de informações morfológicas, além disso, é necessária a realização de fixação e seccionamento das fatias para análise. A liberação de lactato desidrogenase (BICKLER e cols, 1996; GROSS e cols, 1996; KOH e cols, 1987), consumo de glicose e O₂ (NISHIZAKI e cols, 1988; VANDERKOOI e cols, 1991) ou medida dos níveis de ATP (KAWAI e cols, 1989; NABETANI e cols, 1995; TANIMOTO e cols, 1987) também são utilizados. Esses métodos são utilizados em modelos de cultura celular e em modelos *in vivo* de doenças neurodegenerativas. Embora possam ser utilizados em fatias cerebrais, estes não são facilmente aplicados nesses modelos. Esses experimentos requerem uma elaboração minuciosa, além disso não possuem habilidade para monitorar simultaneamente populações neuronais vulneráveis e resistentes ao processo isquêmico em uma mesma fatia cerebral.

Medidas eletrofisiológicas dos potenciais pós sinápticos evocados (PPSE) dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo após estimulação das fibras colaterais de Schaffer da região CA3 do hipocampo são comumente utilizadas para determinar a viabilidade celular dos neurônios hipocámpais (ARMSTRONG e cols,

1991; FAIRCHILD e cols, 1988). Esse método é rápido e fácil comparado com os métodos bioquímicos, mas como a microscopia confocal, requer equipamento especializado.

A utilização de calceína-AM e etídio homodímero nos permitiu obter imagens das fatias cerebrais e também uma análise quantitativa das células mortas em cada experimento.

Para validar nosso modelo experimental, realizamos experimentos utilizando baixa concentração de cálcio (0,3 nM), EGTA (0,5 nM), quelante de cálcio externo e TTX (1 μ M), bloqueador de canais de sódio sensíveis a voltagem.

A elevação não controlada da concentração de cálcio ($[Ca^{2+}]$) é o tema central no processo de excitotoxicidade. Conseqüentemente, a estabilização intracelular da $[Ca^{2+}]$ vem sendo considerada o objetivo principal de várias pesquisas como método terapêutico para minimizar o dano cerebral provocado pela isquemia (MACDONALD e cols, 2006).

Em nossos experimentos reduzimos a concentração de cálcio extracelular com o objetivo de validar nosso modelo experimental. Para isso utilizamos uma solução contendo baixa concentração de cálcio (0,3 nM) e um quelante de cálcio externo, EGTA (0,5nM). Nós observamos que a redução de cálcio utilizando ambas as estratégias foram capazes de reduzir o dano neuronal em $35\pm 2.9\%$ e $45\pm 2.3\%$ respectivamente, não houve diferença significativa entre esses resultados, ou seja, esses dados conferiram o mesmo efeito neuroprotetor.

É interessante enfatizar que a concentração de EGTA (0,5 mM) que utilizamos em nossos experimentos é capaz apenas de reduzir a concentração de cálcio externo, ao contrário da concentração de EGTA (2,0 mM), capaz de quelar completamente o cálcio do meio externo. Nós optamos em utilizar essa

concentração de EGTA, porque já é descrito na literatura que a redução marcante de cálcio externo é capaz de promover a morte celular.

Esse paradoxo do cálcio, como é definido na literatura, foi descrito primeiramente em 1966 por Zimmerman e colaboradores. Estes pesquisadores realizaram experimentos em cardiomiócitos, em que estes eram expostos a baixas concentrações de cálcio. Eles observaram que nessas condições havia um aumento da concentração intracelular de sódio $[Na^+]$, seguido pelo aumento da $[Ca^{2+}]$ e culminando em morte celular.

Esse mesmo efeito paradoxal foi observado em culturas de neurônios hipocámpais (XIONG e cols, 2001) e corticais (CHINOUPoulos e cols, 2004).

Tfelt-Hansen e colaboradores em 2005 explicou esse efeito paradoxal da seguinte forma: A liberação excessiva de glutamato durante a isquemia causa uma forte ativação dos receptores NMDA. A entrada de cálcio através dos receptores NMDA e dos canais de cálcio dependentes de voltagem, depletam a $[Ca^{2+}]$ extracelular, levando a ativação dos canais não seletivos sensíveis a cálcio (CNSSC). A ativação desses canais permite a entrada de sódio, contribuindo ainda mais para a despolarização e conseqüentemente potencializando o processo de morte celular.

Outra ferramenta farmacológica utilizada em nossos experimentos para padronizar o nosso modelo experimental foi a tetrodotoxina (TTX), toxina bloqueadora de canais de sódio dependentes de voltagem.

Os canais de sódio dependentes de voltagem possuem um papel importante nos danos excitotóxicos. Os bloqueadores de canais de sódio inibem a despolarização neuronal, a liberação de glutamato, o influxo de sódio e conseqüentemente reduzem o influxo de cálcio pelos canais de cálcio dependentes

de voltagem, pelo receptor NMDA e pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (TAYLORC, CP e cols, 1995). Assim esses bloqueadores são considerados promissores para o tratamento da isquemia cerebral.

Vários bloqueadores de canais de sódio vêm sendo investigados em triagens clínicas com pouco sucesso. A lifarizine e o lubeluzole, bloqueadores de canais de cálcio e sódio dependentes de voltagem (SQUIRE e cols, 1996) provocaram hipotensão nos pacientes, assim o teste destes agentes foi suspenso (HICKENBOTTON e cols, 1998).

Nossos experimentos mostraram que a TTX produziu neuroproteção ($25\pm 2.6\%$) nas fatias de hipocampo in vitro, corroborando com os dados da literatura. Além disso, esses dados acrescentaram evidências de que o nosso modelo é realmente viável.

5.2. A FRAÇÃO PHTX3 E AS TOXINAS TX3-3 E TX3-4 DO VENENO DA ARANHA PHONEUTRIA NIGRIVENTER APRESENTARAM EFEITO NEUROPROTETOR SIGNIFICATIVO:

Após a validação do modelo experimental realizamos experimentos para avaliar o efeito neuroprotetor da fração PhTX3 da aranha *Phoneutria nigriventer*.

Toxinas que interferem em canais de cálcio podem ser utilizadas para modular a liberação de neurotransmissores em condições patológicas, tais como isquemia cerebral e dor (MILJALLICH e cols., 1995). Assim as toxinas do veneno da *Phoneutria nigriventer* que bloqueiam CCDV (PRADO e cols 1996; MIRANDA e cols, 1998; MIRANDA e cols 2001) podem oferecer uma nova fonte de drogas para intervenção terapêutica. O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* possui várias frações de polipeptídeos tóxicos, algumas destas possuem ações neurotóxicas

(REZENDE e cols 1991). Um desses componentes, designado, PhTx3, inibe a liberação de glutamato dependente de cálcio e o aumento da concentração de cálcio no citosol em resposta a despolarização por KCl (PRADO e cols 1996). A purificação da fração PhTx3, levou a seis isotoxinas designadas TX3-1 a TX3-6 (CORDEIRO e cols 1993). As isoformas TX3-3 e TX3-4 inibem a liberação de glutamato pelo bloqueio dos canais de cálcio do tipo –P/Q e também apresentam uma efetiva inibição da recaptação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em sinaptossomas, IC₅₀ de 0.32 e 7.9nM, respectivamente (MIRANDA e cols 1998 e MIRANDA e cols 2001). Recentemente foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa, que outra fração da PhTx3, a TX3-6 causa inibição dos canais de cálcio do tipo –N expressos em células HEK (VIEIRA e cols 2005). Assim, a fração purificada da PhTx3 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* pode ser considerada um bloqueador de canal de cálcio de amplo espectro que apresenta também ações específicas por inibir a recaptação de glutamato (REIS e cols 1999). Até o presente momento não há conhecimento de outra fração polipeptídica que apresente esses mesmos efeitos.

Nossos experimentos comprovaram o potente efeito neuroprotetor da fração PhTx3, está apresentou 82±4.1% de neuroproteção em fatias de hipocampo submetidos ao processo de isquemia in vitro. As outras toxinas testadas apresentaram efeito neuroprotetor significativamente menor quando comparado a fração PhTX3 (ω -conotoxina GVIA 32±2.3% e ω -conotoxina MVIIC 46±2.9%).

Nossos resultados mostraram que a neuroproteção induzida pela ω -conotoxina GVIA está de acordo com a relativa contribuição dos canais de cálcio do tipo N na transmissão sináptica no hipocampo, estes controlam 40% da liberação de glutamato (WU & SAGGAU, 1994). Por outro lado, a neuroproteção induzida pela ω -conotoxina MVIIC apresentou metade do valor encontrado por Small e cols 1997.

Esse efeito menor encontrado em nossos experimentos está de acordo com resultados anteriores publicados pelo nosso grupo de pesquisa em que as toxinas TX3-3 e TX3-4 presentes na fração PhTX3 foram mais eficientes que a ω -conotoxina MVIIC em inibir o aumento da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em sinaptossomas induzido pela despolarização com cloreto de potássio (MIRANDA e cols, 2001).

O efeito neuroprotetor produzido pelas toxinas TX3-3 e TX3-4 também foi bastante expressivo ($68\pm 4.2\%$ e $77\pm 3.8\%$), respectivamente. O fato da toxina Tx3-4 apresentar um maior efeito neuroprotetor que a toxina TX3-3 pode ser explicado pela sua ação no transportador de glutamato. Reis e cols em 1999, mostraram que a toxina TX3-4 atua na liberação de glutamato independentemente de cálcio através do transportador de glutamato. A liberação de glutamato independente de cálcio atua via a reversão do transportador na membrana plasmática, levando a um aumento de glutamato no meio extracelular (NICHOLLS e cols, 1987).

Durante a isquemia, ocorre acúmulo de glutamato liberado de forma independente de cálcio no meio extracelular, assim o uso de agentes que possam inibir o transportador de glutamato, como a TX3-4, podem ser de extrema importância como alvos terapêuticos.

Após estudarmos o efeito neuroprotetor da fração PhTX3 e das toxinas TX3-3 e TX3-4, resolvemos investigar se essas toxinas eram capazes de conferir neuroproteção após o processo de isquemia ter sido instalado. Obtivemos resultados satisfatórios com todas as toxinas testadas. Essas toxinas foram capazes de conferir neuroproteção até 1 hora após o evento isquêmico. Estudos anteriores realizados por Aryan Azimi-Zonooz em 2001 mostraram que a expressão dos canais de cálcio do tipo $-N$ é modificada após o processo de isquemia. Os canais de cálcio do tipo $-N$ estão localizados em áreas sinápticas no hipocampo e assim o bloqueio

desses canais desempenha importante papel na neuroproteção desses neurônios. Após o processo de isquemia há uma redução acentuada da expressão desses canais, e a neuroproteção exercida pela ω -conotoxina GVIA não é mais observada.

Até o momento, não foi relatado nenhum trabalho mostrando a expressão dos subtipos de canais de cálcio do tipo $-P/Q$ após o processo de isquemia cerebral. Mas de acordo com os resultados obtidos em nosso trabalho, podemos sugerir que parte do efeito neuroprotetor exercido pelas toxinas (fração PhTX3, TX3-3 e TX3-4) após o evento isquêmico pode ser devido a manutenção ou expressão aumentada dos canais de cálcio do tipo $-P/Q$.

5.3 O CÁLCIO INTRACELULAR PARTICIPA DO PROCESSO DE ISQUEMIA CEREBRAL IN VITRO

Uma das hipóteses para explicar a lesão isquêmica cerebral é a elevação excessiva do cálcio intracelular, que ativa vários processos biológicos levando à morte celular (KASS & LIPTON, 1986; CHOI, 1988). Esse aumento do cálcio intracelular na isquemia neuronal tem sua origem do meio extracelular, através da membrana plasmática. Sua entrada pela membrana plasmática ocorre por meio de canais de cálcio voltagem dependentes, canais de cálcio operados por ligante (como o receptor NMDA de glutamato), inibição da extrusão do Ca^{2+} pela Ca^{2+} ATPase devido à redução dos níveis de ATP (KASS & LIPTON, 1986), inibição do trocador Na^+-Ca^{2+} pela despolarização (NACHSHEN, SANCHEZ-ARMASS & WEINSTEIN, 1986). O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ pode também ter origem intracelular a partir dos estoques internos (HENZI & MACDERMOTT, 1992).

Em nosso trabalho, observamos através do ensaio de viabilidade celular que o cálcio presente em estoques internos estaria envolvido no processo de isquemia cerebral, pois observamos que a ferramenta farmacológica BAPTA-AM conferiu

neuroproteção as fatias de hipocampo. Além disso, observamos que o retículo endoplasmático, através dos receptores de IP3 eram responsáveis pela maior parte dessa neuroproteção. Esses dados foram descobertos através da utilização de bloqueadores específicos dos receptores encontrados no retículo endoplasmático, (dantroleno e 2-APB), bloqueadores dos receptores rianodina e IP3, respectivamente.

O dantroleno é utilizado clinicamente para tratamento de hipertermia maligna e síndrome maligna neuroléptica. Seu mecanismo é a inibição da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético, que ocorre nessas condições (WARD e cols., 1986). O dantroleno inibe seletivamente receptores de rianodina, e tem sido utilizado em muitos estudos para inibir a liberação de Ca^{2+} do retículo sarco-endoplasmático (EHRlich e KAFTAN, 1994; SIMPSON e cols, 1995).

Em algumas regiões cerebrais, como no giro dentado de ratos adultos, a ativação dos receptores NMDA pode engatilhar o processo de liberação de cálcio intracelular induzida por cálcio (LCIC) a partir de estoques sensíveis a rianodina do retículo endoplasmático, contribuindo de forma significativa para o processo de morte celular (FRANSEN e cols, 1991; SIMPSON e cols, 1993; LAZAREWICKS e cols, 1998). Hayashi e cols em 1997 mostraram o efeito neuroprotetor do dantroleno em cultura de neurônios cerebelares após o estímulo com glutamato, NMDA ou pela despolarização com cloreto de potássio. *In vivo*, o dantroleno exerceu efeito neuroprotetor quando administrado intracerebroventricular após isquemia em ratos (ZHANG e cols, 1993; WEI & PERRY, 1996). Por outro lado, Kross e cols em 1993, não encontraram efeito neuroprotetor do dantroleno após isquemia cerebral global utilizando cães como modelo experimental.

Recentes dados confirmam que o mecanismo pelo qual o dantroleno exerce seu efeito neuroprotetor pode ser complexo e este pode não estar diretamente relacionado aos receptores de rianodina. Wie e cols em 2000 demonstraram que a morte celular induzida por 3-hidroxidineurina em células PC12 e GT1-7 foi prevenida por dantroleno, e esta neuroproteção estava relacionada com o aumento nos níveis da proteína Bcl-2, um proeminente produto gênico anti-apoptótico. Esses autores sugeriram que o dantroleno pode exercer efeitos neuroprotetores por mecanismos que envolvem a auto regulação nos níveis e na função da proteína Bcl-2. Nossos dados corroboram com dados descritos acima, pois observamos primeiramente que o dantroleno não foi capaz de conferir neuroproteção através dos resultados obtidos com o ensaio de viabilidade celular, mas este foi capaz de reduzir a atividade de caspase-3 e conseqüentemente reduzir a morte apoptótica dependente de caspase.

Em outro experimento, utilizamos o 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB) que é uma substância permeável que inibe a liberação de Ca^{2+} induzida pelo IP3 (MARUYAMA e cols., 1997). Observamos em nossos resultados que os receptores de IP3 estão envolvidos no processo de neuroproteção.

Já é descrito na literatura que o cálcio interno está diretamente relacionado a morte celular por apoptose, assim resolvemos investigar o processo apoptótico no processo de isquemia cerebral in vitro.

A caracterização do tipo de morte celular no processo isquêmico é crucial para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas efetivas. Tradicionalmente a morte celular após a isquemia foi considerada necrótica, mas nas últimas décadas várias pesquisas revelaram que após poucas horas do evento isquêmico, os neurônios da penumbra isquêmica sofriam um dano transiente e reversível e em seguida apoptose. A apoptose é um processo dependente de energia que contribui

igualmente para a patogênese da isquemia (LINNIK e cols, 1993; CAHARRIAUT-MARLANGUE e cols, 1996; GUEGAN e cols, 1998).

A necrose é um fenômeno que atinge um grupo de células que são expostas a variações extremas das condições fisiológicas que, por fim, agridem a integridade da membrana plasmática (PROKURYAKOV e cols, 2003). Dentre as características mais marcantes da necrose estão a perda da homeostasia celular, alteração da permeabilidade de membrana com a perda do potencial de membrana, aumento de tamanho dos compartimentos celulares, com a destruição das organelas citoplasmáticas e baixa agregação da cromatina (ZAKERI e cols, 2002).

A apoptose, ou morte celular programada, é um mecanismo importante para o controle do número de células mortas durante a vida dos organismos multicelulares. A apoptose é fundamental para uma ampla variedade de processos biológicos incluindo: a renovação celular normal (“turnover”) nos diversos tecidos, o desenvolvimento embrionário, metamorfose e atrofia dependente de hormônios. A morte celular programada está envolvida em um grande número de condições patológicas dentre as quais destacam-se as injúrias neurológicas, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, síndrome da imunodeficiência adquirida e câncer (THOMPSON, 1995; ZIMMERMAN e cols, 2001; COHEN e cols, 1997; HORTA & YOUNG, 1999).

A apoptose é caracterizada por mudanças morfológicas e bioquímicas que ocorrem em duas fases. Na primeira, há comprometimento da célula para a morte e na segunda, há fase executora, caracterizada por alterações na estrutura celular. Dentre as principais características observadas estão o encolhimento da célula com formações de bolhas em sua superfície, perda do gradiente de potássio, perda da adesão celular, levando a célula a se desprender das outras da matriz extracelular.

A membrana e as organelas mantêm sua estrutura intacta e, inicialmente, não há alterações evidentes no citoplasma. Em seguida ocorre condensamento da cromatina e divisão do núcleo e citoplasma em vesículas (corpos apoptóticos) (ZIMMERMANN e cols, 2001).

O programa de apoptose dependente de caspases em mamíferos segue dois caminhos para disparar a via apoptótica. Um deles, chamado via intrínseca, depende da participação da mitocôndria (GREEN & REED, 1998), citocromo c (KLUCK e cols, 1991; YANG e cols, 1997; LI e cols, 1997; ZOU e cols, 1999) e várias proteínas dentre as quais membros da família Bcl-2 que possuem papéis críticos tanto na ativação quanto na inibição da morte celular (KELEKAR e cols, 1998; DESAGHER e cols, 1999; ZHA e cols, 1996; RAVAGNAN e cols, 2002). O outro caminho para ativar a apoptose em mamíferos é ativar os receptores de morte (tais como CD95 e receptor TNF). A ligação do ligante de CD95 ao receptor CD95 induz o agrupamento desses receptores e formação do complexo sinalizador indutor de morte. Esse complexo, através da molécula adaptadora FADD, recruta múltiplas moléculas de pró-caspase 8 que são capazes de se auto-ativar, por estarem muito próximas umas as outras (revisto por Hengartner, 2000).

Os neurônios possuem outra via apoptótica independente de caspases e dependentes de uma nova proteína apoptótica (AIF). O AIF é uma proteína de 67KDa, que reside na membrana interna da mitocôndria. Esta proteína é responsável pela condensação da cromatina e fragmentação do DNA (HONG e cols, 2004). A translocação do AIF da mitocôndria para o núcleo é detectado após 1 hora de reperfusão em modelo de isquemia cerebral *in vivo*. A translocação de AIF é sincronizada com a liberação de citocromo c da mitocôndria e precede a morte celular apoptótica com fragmentação do DNA (PLESNILA e cols, 2004).

O retículo endoplasmático e a mitocôndria são mediadores do processo apoptótico, e esses se comunicam através dos íons cálcio (WALTER & HAJOCZKY, 2005). Há um consenso geral na literatura que mostra que o cálcio liberado do retículo endoplasmático após o estímulo apoptótico se acumula na mitocôndria. Na presença do estímulo apoptótico, o cálcio liberado através dos receptores de IP3 pode ativar a sinalização apoptótica por induzir a mitocôndria a liberar fatores pró apoptóticos, incluindo, citocromo c (WALTER & HAJNOCKY, 2007).

Nossos resultados mostraram que as ferramentas farmacológicas que reduzem o cálcio intracelular (BAPTA-AM, dantroleno e 2-APB) atuavam provavelmente pela via descrita acima. Quando utilizamos essas ferramentas farmacológicas no ensaio de atividade para caspase-3, observamos que essas reduzem significativamente a atividade de caspase-3 e conseqüentemente a morte apoptótica. Assim podemos sugerir, que após o evento isquêmico, o cálcio intracelular, presente no retículo endoplasmático é liberado através dos receptores de IP3 e que este pool de cálcio é direcionado a mitocôndria. O acúmulo de cálcio na mitocôndria pode induzir essa organela a liberar fatores apoptóticos e induzir a ativação de caspase-3.

Realizamos os mesmos experimentos para dosar a atividade de caspase-3 utilizando os bloqueadores de canais de cálcio (ω -conotoxina GVIA e ω -conotoxina MVIIC) e as toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* (fração PhTX3, TX3-3 e TX3-4) e observamos que tanto os bloqueadores de canais de cálcio quanto as toxinas não foram capazes de reduzir a atividade de caspase-3. Diante desses resultados poderíamos pensar que as toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* poderiam não exercer influência sobre a morte apoptótica após o evento isquêmico, mas essas poderiam participar da morte apoptótica independente de caspase, através da

ativação do fator indutor de apoptose (AIF). Experimentos adicionais devem ser realizados para comprovar a participação das toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* no processo apoptótico.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO:

Diante dos nossos resultados é possível concluir que:

- O modelo experimental *in vitro* utilizado em nossos experimentos mostrou-se viável e de grande utilidade para a realização de testes com prováveis agentes neuroprotetores.
- As toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* apresentaram importante efeito neuroprotetor comparado com as toxinas animais já descritas na literatura.
- As toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* apresentaram efeito neuroprotetor até 1 hora após o evento isquêmico instalado.
- O cálcio intracelular liberado a partir dos estoques sensíveis a IP3 participa do processo de isquemia cerebral *in vitro*.
- A redução de cálcio intracelular (utilizando BAPTA-AM, dantroleno e 2-APB) está diretamente relacionado a redução da atividade de caspase-3 e conseqüentemente à morte celular apoptótica.
- As toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* (fração PhTX3, TX3-3 e TX3-4) não foram capazes de reduzir a atividade de caspase-3.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-HAMID, K. M. & TYMIANSKI, M. Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglycemia or to excitotoxins. **J. Neurosci.**, v.17, p. 3538-3553, 15-5-1997.
2. AMES, A., III, LI, Y. Y., HEHER, E. C., & KIMBLE, C. R. Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na⁺ transport. **J.Neurosci.**, v.12, p. 840-853, 1992
3. ARAÚJO, DAM., CORDEIRO, MN., DINIZ, CR.,BEIRÃO, PS. Effects of a toxic fraction, PhTX2 from the spider Phoneutria nigriventer on the sodium current. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology**, v.347, p.205-208.
4. ARUNDINE-HAMID, K.M & TYMIANSKI, M. Enhanced vulnerability to NMDA toxicity in sublethal traumatic neuronal injury in vitro. **Journal Neurotrauma**, v.20 (12), p.1377-1395, 1992.
5. BARBOUR, B., BREW, H., & ATTWELL, D. Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. **Nature**, v.335, p.433-435, 1988.
6. BERGMAN, L., VAN DER MEULEN, J. H. P., LIMBURG, M., E HABBEMAN, J.D.F. Costs of medical care alter first-ever stroke in the Netherlands, **Stroke**, v.26, p. 1830-1836, 1996.

7. BERRIDGE, M. J. Neuronal calcium signaling. **Neuron**, v.21, p.13-26, 1998.
8. BERRIDGE, M. J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. **Cell Calcium**, v.32, p. 235-249, 2002.
9. BERRIDGE, M. J., BOOTMAN, M. D., & RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat.Rev.Mol.Cell Biol.**, v.4, p. 517-529, 2003.
10. BHARDWAJ A, BRANNANT T, MARTINEZ-TICA J, WEINBERG J. Ischemia in the dorsal hippocampus is associated with acute extracellular release of dopamine and norepinephrine. **Journal Neural Transm. Gent. Sect.**, v.80 (3), p.195-201, 1990.
11. BISHARA, N. B., MURPHY, T. V., & HILL, M. A. Capacitative Ca(2+) entry in vascular endothelial cells is mediated via pathways sensitive to 2 aminoethoxydiphenyl borate and xestospongine C. **Br.J.Pharmacol.**, v.135, p. 119-128, 2002.
12. BLOCK, F. & SCHWARZ, M. The b-wave of the electroretinogram as an index of retinal ischemia. **Gen.Pharmacol.** v.30, p.281-287, 1998.
13. BOOTMAN, M. D., COLLINS, T. J., MACKENZIE, L., RODERICK, H. L., BERRIDGE, M. J., & PEPPIATT, C. M. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. **FASEB J.**, v.16, p. 1145-1150, 2002.

14. BOSSE E, BOTTLENDER R, KLEPPISH T, HESCHELERJ, WELLING A, HOFFMAN F, FLOCKERZIV. Stable and functional expression of the calcium channel alpha 1 subunit from smooth muscle in somatic cell lines. **EMBO**, v.11(6), p.2033-2038,1998.
15. BOUVIER, M., SZATKOWSKI, M., AMATO, A., & ATTWELL, D. The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. **Nature**, v.360, p.471-474, 1992.
16. BOWERSOX SS & LUTHER R. Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom *Conus magus*. **Toxicon**, v.36 (11), p.1651-1658, 1998.
17. BOYCOTT, B. B. & WASSLE, H. The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. **J.Physiol**, v.240, p.397-419, 1974.
18. BOZYCZKO-COYNE, D., MCKENNA, B. W., CONNORS, T. J., & NEFF, N. T. A rapid fluorometric assay to measure neuronal survival in vitro. **J.Neurosci.Methods**, v.50, p. 205-216, 1993.
19. BRASILV & VELLARD J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. **Memb. Inst. Butantan**, v.2, p.1-70.
20. BREW, H. & ATTWELL, D. Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. **Nature**, v.327, p.707-709, 25-6-1987.

21. CARAFOLI, E. & BRINI, M. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. **Curr.Opin.Chem.Biol**, v.4, p. 152-161, 2000.
22. CASSOLA, AC., JAFFE, H., FALES, HM., CASTRO AFECHE, S., MAGNOLI, F., CIPOLLA-NETO, J. Omega-Phoneutoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider Phoneutria nigriventer. **Pflugers Arch**, v.436, p.545-552, 1998
23. CATTERALW, EPSTEIN PN. Ion channels. **Diabetologia**, v.35 suppl 2,p.523-533, 1992.
24. CHEN, Q. X., PERKINS, K. L., CHOI, D. W., & WONG, R. K. Secondary activation of a cation conductance is responsible for NMDA toxicity in acutely isolated hippocampal neurons. **J.Neurosci.**, v.17, p. 4032-4036, 1-6-1997.
25. CHOI, D. W., KOH, J. Y., & PETERS, S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. **J.Neurosci.**, v.8, p. 185-196, 1988.
26. CLARK, B. A. & MOBBS, P. Voltage-gated currents in rabbit retinal astrocytes. **Eur.J.Neurosci.**, v.6, p. 1406-1414,1994.
27. COLLINS, T. J., LIPP, P., BERRIDGE, M. J., & BOOTMAN, M. D. Mitochondrial Ca(2+) uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca(2+) signals. **J.Biol.Chem.**, v.276, p. 26411-26420, 2001.

28. CONTI, F. & WEINBER, R. J. Shaping excitation at glutamatergic synapses. **Trends Neurosci**, v. 22(10), p. 451-8, 1999.
29. CORDEIRO, MN., FIGUEIREDO, SG., VALENTIM, AC., DINIZ, CR., EICKSTED, RD., GOROY, J., RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of TX3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon**, v. 31, p.35-42, 1993.
30. COSTA, SK., MORENO RA., ESQUISATTO, LC, JULIANO, L., BRAIN SD, DE NUCCI., ANTUNES, E. Role of kinins and sensory neurons in the rat pleural leukocyte migration induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. **Neuroscience Lett.**, v.318, p.158-162.
31. DACHEUX, R. F. & RAVIOLA, E. Functional anatomy of the neural retina. Philadelphia, 1994. *apud* RYAN, SJ. **Retina**. St. Louis, v.3rd, p. 32-53, 2001.
32. DANBOLT, NC. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.** 65 (1):1-105
33. DE FLORA A, FRANCO L, GUIDA L, BRUZZONE S, ZOCCHI E. Extracellular CD-38-catalyzed synthesis and intracellular (Ca²⁺)-mobilizing activity of cyclic ADP-ribose. **Cell Biochem. Biophys.**, v.28(1), p.45-62, 1998.
34. DINIZ, CR., CORDEIRO, MN., JUNIOR, LR., KELLY, P., FISCHER,S., REIMANN, F., OLIVEIRA, EB., RICHARDSON, M. The purification and amino acid sequence of lethal neurotoxic TX1 from the venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer*. **FEBS Lett**, v.266, p.251-253, 1990.

35. DUFFY, S. & MACVICAR, B. A. In vitro ischemia promotes calcium influx and intracellular calcium release in hippocampal astrocytes. **J.Neurosci.**, v.16, p. 71-81, 1996.
36. DUKER, J. S. & BROWN, G. C. Recovery following acute obstruction of the retinal and choroidal circulations. A case history. **Retina**, v.8, p. 257-260, 1988.
37. ECHEVARRIA, W., LEITE, M. F., GUERRA, M. T., ZIPFEL, W. R., & NATHANSON, M. H. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. **Nat.Cell Biol.**, v.5, p. 440-446, 2003.
38. EHRLICH, B. E., KAFTAN, E., BEZPROZVANNAYA, S., & BEZPROZVANNY, I. The pharmacology of intracellular Ca(2+)-release channels. **Trends Pharmacol.Sci.**, v.15, p. 145-149, 1994.
39. EICKTEDT, VRD. Considerações sobre a sistemática das espécies amazônicas de Phoneutria (Araneai, Ctenidae). **Brazil Zoologia**, v.1, p.183-1969.
40. ELIASOF, S. & WERBLIN, F. Characterization of the glutamate transporter in retinal cones of the tiger salamander. **J.Neurosci.**, v.13, p. 402-411, 1993.
41. ENGELHARD, K., WERNER, C., HOFFMAN, WE., MATHEUS, B., BLOBNER, M., KOCHS, E. The effect of sevoflurane and propofol on cerebral

- neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats. **Anesth Analg.** v.97 (4), p.1155-1161.
42. ESCOUBAS, P., DIOCHOT, T., CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**, v .82(9-10), p.893-907, 2000.
43. FAGNI, L., CHAVIS, P., ANGO, F., BOCKAERT, J. Complex interactions between mGLURs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. **Trends Neurosci.** 2000, v.23(2):80-8
44. FAURE, G. natural inhibitors of toxic phospholipases A(2). **Biochimie**, v. 82 (9-10), p.833-840, 2000.
45. FLECKENSTEIN, A., JANKE, J., DORING, H. J., & LEDER, O. Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload-a new principle in cardiac pathophysiology. **Recent Adv.Stud.Cardiac.Struct.Metab**, v.4, p. 563-580, 1974.
46. FISCHER, RS., MAYBERG, HS., FROST, JJ. Neuroprotectors and glucose metabolism in epilepsy as study by PET scanning. **Epilepsy Res Suppl**, v.9, p.351-359, 1992
47. FISKUM, G. Mitochondrial damage during cerebral ischemia. **Ann Emerg Med**, v.14(8), p.810-815.

48. FONTANA, M.D & VITAL-BRASIL, O. Mode of action Phoneutria nigriventer spider venom at the isolated phrenic nerve diaphragm of the rat. **Brazi. J. Med. Biol. Research**, v.18, p.557-565.
49. FRANDSEN, A., SCHOUSBOE, A. Mobilization of dantrolene-sensitive intracellular calcium pools is involved in the cytotoxicity induced by quisqualato and N-methyl-D-aspartate but not by 2-amino-3- (3-hydroxy-5 methylisoxazols-4-propionate) and kainite in cultured cerebral cortical neurons. **PNAS**, v. 89(7), p.2590-2594, 1992.
50. FYKSE, E. M. & FONNUM, F. Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. **Neurochem.Res.**, v.21, p. 1053-1060, 1996.
51. GARCIA, M. L., USACHEV, Y. M., THAYER, S. A., STREHLER, E. E., & WINDEBANK, A. J. Plasma membrane calcium ATPase plays a role in reducing Ca(2+)-mediated cytotoxicity in PC12 cells. **J.Neurosci.Res.**, v.64, p. 661-669, 2001.
52. GAUGAIN, B., BARBET, J., OBERLIN, R., ROQUES, B. P., & LE PECQ, J. B. DNA bifunctional intercalators. I. Synthesis and conformational properties of an ethidium homodimer and of an acridine ethidium heterodimer. **Biochemistry**, v.17, p. 5071-5078,1978.
53. GERT, TH., HAUTVAST, R. W. M., DE JONGSTE, M. J., e KORF, J., Neuroanatomy of cardiac activity regulating circuitry; a transneuronal viral tracing study in the rat., **Eur. J. Neuroscience**, 8 (1997) 101-113.

54. GOMEZ, MV., KALAPOTHAKIS, E., GUATIMOSIM, C., PRADO, MA. Phoneutria nigriventer venom: a cocktail of toxins that affect ions channels. **Cell Mol. Neurobiol**, v.22, p.579-588, 2002.
55. GRISHIN, E. Polypeptide neurotoxins from spider venoms. **Eur J. Biochem**, v.264, p.276-280, 1999.
56. HALLENBECK, JM., DUTKA, A.J. Background review and current concepts of reperfusion injury. **Arch. Neurol**, v.47(11), p.1245-54.
57. HAKAMATA, Y., NAKAI, J., TAKESHIMA, H., & IMOTO, K. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. **FEBS Lett.**, v.312, p. 229-235, 9-11-1992.
58. HARRIS, R. J., SYMON, L., BRANSTON, N. M., & BAYHAN, M. Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischaemia. **J.Cereb.Blood Flow Metab**, v.1, p. 203-209, 1981.
59. HENZI, V. & MACDERMOTT, A. B. Characteristics and function of Ca(2+)- and inositol 1,4,5-trisphosphate-releasable stores of Ca²⁺ in neurons. **Neuroscience**, v.46, p. 251-273, 1992.
60. HOFFMANN, M., PELLIGRINO, D., WERNER, C., KOCHS, E., ALBRECH, RF, SCHULTEAM ESCH, J. Ketamine decrease plasma catecholamines and improve outcome from incomplete cerebral ischemia in rats. **Anesthesiology**, v. 76(5), p. 755-762, 1992.

61. HOLLMANN, M & HEINEMMANS. Cloned glutamate receptors. **Annu Rev. Neuroscience**, v.17, p.31-108, 1994.
62. HOLLMANN, M., MARON, C., HEINEMANS, S. N- glycosylations site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GLUR1. **Neuron**, v.13(6):1331-43.
63. JACKSON H, PARKS, TN. Spider toxins: recent applications in neurobiology. **Annu. Rev. Neuroscience**, v.12, p.405-414, 1989.
64. KALAPOTHAKIS E., PENAFORTE, CL., BEIRÃO, PSL., ROMANO-SILVA, MA., CRUZ, JS, PRADO, MAM., GUIMARÃES, PEM., GOMEZ, MV., PRADO, VF. Cloning of cDNAs encoding neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon**, v.36, p. 1843-1850, 1999.
65. KANAI, Y., STELZNER, M., NUSSBERGER, S., KHAWAJA, S., HEBERT, S. C., SMITH, C. P., & HEDIGER, M. A. The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter. Insights into structure and mechanism of transport. **J.Biol.Chem.**, v.269, p. 20599-20606,1994.
66. KASS, I. S. & LIPTON, P. Mechanisms involved in irreversible anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice. **J.Physiol**, v.332, p. 459-472, 1982.
67. KASS, I. S. & LIPTON, P. Calcium and long-term transmission damage following anoxia in dentate gyrus and CA1 regions of the rat hippocampal slice. **J.Physiol**, v.378, p. 313-334, 1986.

68. KOIKE, T., MARTIN, D.P., JOHNSON, F.M. JR. Role of Ca^{2+} channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic factor deprivation: evidence that levels of internal Ca^{2+} determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *PNAS*, v.86(16), p. 6421-6425, 1989.
69. KNOLLEMA, S., KNIGGE, M.F., JANSEN, H.M.L., GERT, H.T., KORF, J., MINDERHOUD, J. M., E MEYBOOM-DE JONG, B., Het cerebrovasculair accident in de praktijk, **Patient care**, v.22, p. 21-32, 1995.
70. KRISTIAN, T. & SIESJO, B. K. Calcium in ischemic cell death. **Stroke**, v.29, p. 705-718, 1998.
71. LEE, J. M., ZIPFEL, G. J., & CHOI, D. W. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. **Nature**, v.399, p. A7-14, 1999.
72. LIMBRICK, D. D., Jr., PAL, S., & DELORENZO, R. J. Hippocampal neurons exhibit both persistent Ca^{2+} influx and impairment of Ca^{2+} sequestration/extrusion mechanisms following excitotoxic glutamate exposure. **Brain Res.**, v.894, p. 56-67, 2001.
73. LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol Rev.**, v.79, p. 1431-1568, 1999.
74. LOBNER, D. & LIPTON, P. Intracellular calcium levels and calcium fluxes in the CA1 region of the rat hippocampal slice during in vitro ischemia:

- relationship to electrophysiological cell damage. **J.Neurosci.**, v.13, p. 4861-4871, 1993.
75. LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon**, v.26, p. 759-772.
76. MARC, R. E. & LAM, D. M. Uptake of aspartic and glutamic acid by photoreceptors in goldfish retina. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v.78, p. 7185-7189, 1981.
77. MARTONE, M. E., ALBA, S. A., EDELMAN, V. M., AIREY, J. A., & ELLISMAN, M. H. Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in rat neostriatum. **Brain Res.**, v.756, p. 9-21,1997.
78. MARUYAMA, T., KANAJI, T., NAKADE, S., KANNO, T., & MIKOSHIBA, K. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. **J.Biochem.(Tokyo)**, v.122, p. 498-505, 1997.
79. MCPHERSON, P. S. & CAMPBELL, K. P. The ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. **J.Biol.Chem.**, v.268, p. 13765-13768,1993.
80. MIRANDA, DM., ROMANO-SILVA, MA., KALAPOTHAKIS, E., DINIZ, CR., CORDEIRO, MN., SANTOS, TM., PRADO, MA., GOMEZ, MV. Phoneutria nigriventer toxins block thapsigargin-induced Ca²⁺ influx in synaptosomes. **Neuroreport**, v.9, p.1371-1373, 2001.

81. MONETTE, R., SMALL, D. L., MEALING, G., & MORLEY, P. A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. **Brain Res. Brain Res. Protoc.**, v.2, p. 99-108, 1998.
82. NACHSHEN, D. A., SANCHEZ-ARMAS, S., & WEINSTEIN, A. M. The regulation of cytosolic calcium in rat brain synaptosomes by sodium-dependent calcium efflux. **J. Physiol.**, v.381, p. 17-28, 1986.
83. NAITO, S. & UEDA, T. Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles. **J. Biol. Chem.**, v.258, p. 696-699, 1983.
84. NICOTERA, P., LEIST, M., & MANZO, L. Neuronal cell death: a demise with different shapes. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.20, p. 46-51, 1999.
85. NOWYCKY, M. C. & THOMAS, A. P. Intracellular calcium signaling. **J. Cell Sci.**, v.115, p. 3715-3716, 2002.
86. OLNEY, J. W. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v.28, p. 455-474, 1969.
87. OLNEY, J. W., FULLER, T., & DE GUBAREFF, T. Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate treated rats. **Brain Res.**, v.176, p. 91-100, 1979.

88. OLNEY, J. W. Excitotoxin-mediated neuron death in youth and old age. **Prog.Brain Res.**, v.86, p. 37-51, 1990.
89. OSBORNE, N. N., LARSEN, A., & BARNETT, N. L. Influence of excitatory amino acids and ischemia on rat retinal choline acetyltransferase-containing cells. **Invest Ophthalmol.Vis.Sci.**, v.36, p. 1692-1700, 1995.
90. OSBORNE, N. N., UGARTE, M., CHAO, M., CHIDLOW, G., BAE, J. H., WOOD, J. P., & NASH, M. S. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. **Surv.Ophthalmol.**, v.43 Suppl 1, p. S102-S128, 1999.
91. OSBORNE, N. N., WOOD, J. P., CUPIDO, A., MELENA, J., & CHIDLOW, G. Topical flunarizine reduces IOP and protects the retina against ischemia-excitotoxicity. **Invest Ophthalmol.Vis.Sci.**, v.43, p. 1456-1464, 2002.
92. O' BRIEN, RJ., LAU, LF., HUGANIR, RL. Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses. **Current Opinion Neurobiology**, v. 8(3), p. 364-369.
93. PAREKH, A. B. Store-operated Ca²⁺ entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. **J.Physiol**, v.547, p. 333-348, 2003.
94. PARMAENTIER, ML., PIN, JP., BOCKART, J., GRAI, Y. Cloning and functional expression of a Drosophila metabotropic glutamate receptor

expressed in the embryonic CNS. **Journal Neuroscience**, v. 16(21), p. 6687-6894, 1998.

95. PASCHEN, W. Calcium neurotoxicity. **Journal Neurochemistry**, v. 72(6), p.2625-2626, 1999.

96. PASCHEN, W. Role of calcium in neuronal cell injury with subcellular compartment involved. **Brain Research Bulletin**, v. 53(4), p.409-413, 2000.

97. PASCHEN, W. Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. **Cell Calcium**, v. 34(4-5), p. 369-383, 2003.

98. PULSINELLI, W., The ischemic penumbra in stroke. **Sci. Am. Sci. Med.**, 2 (1995) 16-25

99. QUINONES-HINOJOSA, A., AMES, A., III, MALEK, J. Y., & MAYNARD, K. I. An in vitro rabbit retina model to study electrophysiologic and metabolic function during and following ischemia. **J.Neurosci.Methods**, v.90, p. 107-115, 1999.

100. RAJENDRA, W., ARMUGAM, A., JEYASECLAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, v. 44(1), p. 1-17.

101. REIS, HJ, PRADO, MAM., KALAPOTHAKIS, E., CORDEIRO, MN., DINIZ, CR., DE MARCO, LA., GOMEZ, MV., ROMANO-SILVA, MA. Inhibition of

glutamate uptake by a polypeptide toxin (Phoneutriatoxin3-4) from the spider *Phoneutria nigriventer*. **Biochem. Journal**, v.343, p. 413-418, 1999.

102. REIS, HJ.,, MASSENSINI, AR., PRADO, MA., GOMEZ, RS., GOMEZ, MV., ROMANO-SILVA, MA. Calcium channels coupled to depolarization-evoked glutamate release in the myenteric plexus of guinea pig ileum. **Neuroscience**, v. 101, p. 237-242.
103. RINTOUL, G. L., RAYMOND, L. A., & BAIMBRIDGE, K. G. Calcium buffering and protection from excitotoxic cell death by exogenous calbindin-D28k in HEK 293 cells. **Cell Calcium**, v.29, p. 277-287, 2001.
104. RICCI, S., CELANI, M. G., LA ROSA, F., VITALI, R., DUCA, E., FERRAGZU, R., PAOLOTTI, M., SEPPOLINI, D., CAPUTO., e CHIURULLA, C. A community based study of incidence and risk factors and outcome of transient ischaemic attacks in Umbria, Italy, **J. Neurol.**, 238 (1991) 87-90
105. ROMANO-SILVA, M.A., RIBEIRO-SANTOS, R., RIBEIRO, AM., GOMEZ, MV., DINIZ, CR., CORDEIRO, MN., BRAMMER, MJ. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca^{2+} entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTx2 and potassium depolarization. **Biochem. Journal**, v. 296, p.313-319.,1993.
106. ROTHMAN, S. M. Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. **Science**, v.220, p. 536-537,1983.

107. SANCHEZ-PRIETRO, J. e GONZALEZ, P. Occurrence of a large Ca^{2+} -independent release of glutamate during anoxia in isolated nerve terminals (synaptossomas). **J. Neurochemistry** v.50(4) 1322-4,1996.
108. SATTLER, R. & TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. **Mol.Neurobiol.**, v.24, p. 107-129, 2001.
109. SCHANNE, F. A., KANE, A. B., YOUNG, E. E., & FARBER, J. L. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. **Science**, v.206, p. 700-702,1979.
110. SCHAMBACHER, FL., LEE, CK., WILSON, IB., HOWELL, DE., ODELL, GV. Purification and characterization of tarantula, *Dugesia hentzi* (Girard) venom hyaluronidase. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 44(2), p. 389-396.
111. SCHENBERG, W & PEREIRA LIMA, FA. Pharmacology of the polypeptides from the venom of the spider *Phoneutria*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 33, p. 627-638, 1966.
112. SWARTZ, KJ, MACKINNON, R. An inhibitor of the the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chile an tarantula. **Neuron**, v. 15(4), p.941-949, 1997.

113. SWARTZ, KJ., MACKINNON, R. Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels. **Neuron**, v. 18(4), p.675-682, 1998.
114. SWARTZ, KJ, MACKINNON, R. Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. **Neuron**, v. 18(4), p. 665-673, 1998.
115. SCHNITZER, J. Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. **Neurosci.Lett.**, v.78, p. 29-34, 1987.
116. SCHONTHAL, A., SUGARMAN, J., BROWN, J. H., HANLEY, M. R., & FERAMISCO, J. R. Regulation of c-fos and c-jun protooncogene expression by the Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v.88, p. 7096-7100, 1991.
117. SCHWARTZ, E. A. & TACHIBANA, M. Electrophysiology of glutamate and sodium co-transport in a glial cell of the salamander retina. **J.Physiol**, v.426, p. 43-80, 1990.
118. SIEMKOWICZ, E. & HANSEN, A. J. Brain extracellular ion composition and EEG activity following 10 minutes ischemia in normo- and hyperglycemic rats. **Stroke**, v.12, p. 236-240, 1981.
119. SIESJO, B. K., EKHOLM, A., KATSURA, K., THEANDRER, S. Acid-base changes during complete brain ischemia. **Stroke**. V.21(11) : III 194-9, 1991

120. Siesjo BK, 1992a. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I. Pathophysiology. **J. Neurosurgery**. 77, 169-184.
121. Siesjo, B. K., 1992b. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II. Mechanisms and drug treatment. **J. Neurosurgery**. 77, 337-354.
122. Siesjo, B. K., Cell damage in the brain: a speculative synthesis. **J. Cereb. Blood Flow Metabolic.**, (1981) 155-185.
123. SILVER, I. A. & ERECINSKA, M. Intracellular and extracellular changes of [Ca²⁺] in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. **J.Gen.Physiol**, v.95, p. 837-866, 1990.
124. SIMPSON, P. B., CHALLISS, R. A., & NAHORSKI, S. R. Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. **Trends Neurosci.**, v.18, p. 299-306, 1995.
125. STELL, W. K. The structure and morphologic relations of rods and cones in the retina of the spiny dogfish, *Squalus*. **Comp Biochem.Physiol A**, v.42, p. 141-151, 1-5-1972. *apud* RYAN, SJ. Retina. St. Louis, v.3rd, p. 32-53, 2001.
126. TABB, J. S. & UEDA, T. Phylogenetic studies on the synaptic vesicle glutamate transport system. **J.Neurosci.**, v.11, p. 1822-1828, 1991.
127. TACHIBANA, M. & KANEKO, A. Differences in glutamate-induced response properties between photoreceptors and horizontal cells. **Neurosci.Res.Suppl**, v.8, p. S59-S67, 1988.

128. TAKAHASHI, K., LAM, T. T., EDWARD, D. P., BUCHI, E. R., & TSO, M. O. Protective effects of flunarizine on ischemic injury in the rat retina. **Arch.Ophthalmol.**, v.110, p. 862-870, 1992.
129. TAKEI, K., STUKENBROK, H., METCALF, A., MIGNERY, G. A., SUDHOF, T. C., VOLPE, P., & DE CAMILLI, P. Ca²⁺ stores in Purkinje neurons: endoplasmic reticulum subcompartments demonstrated by the heterogeneous distribution of the InsP₃ receptor, Ca(2+)-ATPase, and calsequestrin. **J.Neurosci.**, v.12, p. 489-505, 1992.
130. TAMBOURGI, DV., MAGNOLI, FC., VAN DEN BERG, CW., MORGAN, BP., DE ARAÚJO, PS., ALVES, EW., DA SILVA, WD. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia*. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 251(1), p. 366-373, 1993.
131. TAYLOR, C. P. & NARASIMHAN, L. S. Sodium channels and therapy of central nervous system diseases. **Adv.Pharmacol.**, v.39, p. 47-98, 1997.
132. TRUMP, B. F. & BEREZESKY, I. K. Calcium-mediated cell injury and cell death. **FASEB J.**, v.9, p. 219-228, 1995.
133. VAN HAESSENDONCK, E. & MISSOTTEN, L. Glutamate-like immunoreactivity in the retina of a marine teleost, the dragonet. **Neurosci.Lett.**, v.111, p. 281-286, 6-4-1990.

134. VERKHRATSKY, A., ORKAND, R. K., & KETTENMANN, H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. **Physiol Rev.** , v.78, p. 99-141, 1998.
135. VIGNES, M., BLEAKMAN, D., LODGE, D., COLLINGRIDGE, G.L. The synaptic activation of the GluR5 subtype of kainite receptor in area CA3 of the rat hippocampus
136. WALD, G. Visual pigments and vitamins A of the clawed toad, *Xenopus laevis*. **Nature**, v.175, p. 390-391, 1955.
137. WANG, C., NGUYEN, H. N., MAGUIRE, J. L., & PERRY, D. C. Role of intracellular calcium stores in cell death from oxygen-glucose deprivation in a neuronal cell line. **J.Cereb.Blood Flow Metab**, v.22, p. 206-214, 2002.
138. WARD, A., CHAFFMAN, M. O., & SORKIN, E. M. Dantrolene. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and an update of its use in muscle spasticity. **Drugs**, v.32, p. 130-168, 1986.
139. YANG, J. H. & WU, S. M. Characterization of glutamate transporter function in the tiger salamander retina. **Vision Res.**, v.37, p. 827-838, 1997.
140. YAU, K. W. & NAKATANI, K. Cation selectivity of light-sensitive conductance in retinal rods. **Nature**, v.309, p. 352-354, 24-5-1984.

141. YOUNG, H. M. & VANEY, D. I. Rod-signal interneurons in the rabbit retina: 1. Rod bipolar cells. **J.Comp Neurol.**, v.310, p. 139-153,1991.
142. YOUNG, R. W. Visual cells and the concept of renewal. **Invest Ophthalmol.Vis.Sci.**, v.15, p. 700-725, 1976. *apud* RYAN, SJ. Retina. St. Louis, v.3rd, p. 32-53, 2001.
143. ZEEVALK, G. D. & NICKLAS, W. J. Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg²⁺ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. **J.Neurochem.**, v.59, p. 1211-1220, 1992.
144. ZIPFEL, G. J., BABCOCK, D. J., LEE, J. M., & CHOI, D. W. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. **J.Neurotrauma**, v.17, p. 857-869, 2000.

8. ANEXOS