

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

**LIBERAÇÃO SINAPTOSSOMAL DE GLUTAMATO INDUZIDA PELA
FRAÇÃO Bc2 DO VENENO DA ANÊMOMA DO MAR *Budonosoma caissarum***

Paola Virginia Miguez Blanco

Florianópolis, 1998

“LIBERAÇÃO SINAPTOSSOMAL DE GLUTAMATO PELA FRAÇÃO BC₂
DO VENENO DA ANEMONA DO MAR (*Bunodosoma caissarum*)”

PAGLA VIRGÍNIA MIGUES BLANCO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

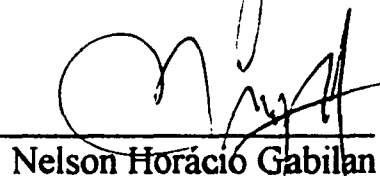
MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento.

Orientador

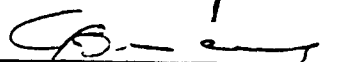

Nelson Horácio Gabilan

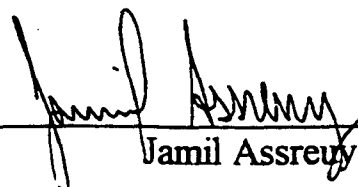
Coordenador do Curso


Nelson Horácio Gabilan

Banca Examinadora


Nelson Horácio Gabilan (Presidente)


Carlos Alberto Gonçalves


Jamil Assreuy

**LIBERAÇÃO SINAPTOSSOMAL DE GLUTAMATO INDUZIDA PELA
FRAÇÃO Bc2 DO VENENO DA ANÊMOMA DO MAR *Budonosoma caissarum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Nelson H. Gabilan

Co-orientadores: Prof. Dr. Rodrigo B. Leal
Prof. Dr. Mauro Nicolau

Florianópolis, 1998

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson H. Gabilan, pela orientação e sugestões.

Ao Prof. Dr. Rodrigo B. Leal pela sua contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mauro Nicolau, por me aceitar no início como Orientador.

À Profª. Ana Lúcia S. Rodrigues por sua valiosa contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Marco A. Romano-Silva, do Departamento de Farmacologia (UFMG) por suas importantes sugestões e pelo uso do seu Laboratório para a realização de parte deste trabalho.

À Michela Mantovani por sua colaboração durante a fase experimental.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto, do Departamento de Farmacologia (UFSC) por permitir o uso do Cintilador líquido.

À CAPES pela Bolsa de Mestrado.

Aos Docentes do Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento, UFSC.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Transmissão sináptica.....	1
1.2. Transmissão glutamatérgica.....	2
1.3. Toxinas envolvidas na liberação de neurotransmissores.....	5
1.3.1. Toxinas que modificam correntes iônicas.....	5
1.3.2. Toxinas que agem diretamente no mecanismo de exocitose.....	6
1.4. Toxinas de anêmona do mar.....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1. Drogas e Reagentes	10
2.2. Equipamentos.....	10
2.3. Animais.....	11
2.4. Obtenção da fração Bc2.....	11
2.5. Preparação de sinaptossomas.....	11
2.6. Ensaio de liberação de [³ H]glutamato.....	12
2.7. Dosagem de glutamato por fluorimetria.....	13
2.8. Determinação da concentração de Na ⁺ intrasinaptossomal.....	14
2.9. Determinação da concentração de Ca ²⁺ intrasinaptossomal.....	15
2.10. Dosagem de lactato desidrogenase (LDH).....	16
2.11. Dosagem de proteína.....	17
2.12. Análise estatística dos resultados.....	17
3. RESULTADOS.....	18
3.1. Liberação de [3H]glutamato por Bc2: dependência da concentração e do tempo de incubação.....	18
3.2. Efeito de Bc2 na liberação de LDH.....	18

3.3. Liberação de glutamato por KCl em sinaptossomas pré-incubados com Bc2.....	22
3.4. Efeito da esfingomielina na liberação de [³ H]glutamato induzida por Bc2.....	22
3.5. Efeito da TTX na liberação de [³ H]glutamato induzida por Bc2.....	22
3.6. Liberação de [³ H]glutamato induzida por Bc2 na presença de PEG 1500.....	23
3.7. Efeito do EGTA na liberação de [³ H]glutamato induzida por Bc2.....	23
3.8. Liberação de glutamato induzida por Bc2. Comparação com ionóforos e KCl.....	23
3.9. Efeito do dihidrokainato na liberação de [³ H]glutamato induzida por Bc2.....	27
3.10. Efeito de Bc2 na concentração de Ca ²⁺ intrasinaptossomal.....	27
3.11. Efeito de Bc2 na concentração de Na ⁺ intrasinaptossomal.....	31
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	34
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	41

ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio intrasinaptossomal
CPM	Cintilação por minuto
DHK	Dihidro-kainato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido tetra-acético etilenoglicol bis-(β-amino-etil-éter)
Fura 2-AM	Fura 2-acetoxi metil-éster
GABA	Ácido gama amino-butírico
GDH	Glutamato desidrogenase
HEPES	Ácido Hidroxi-etil-piperazina-etanosulfônico
KRH	Krebs Ringer Hepes
LDH	Lactato desidrogenase
α-LTX	Alfa latrotoxina
[Na ⁺] _i	Concentração intrasinaptossomal de sódio
PEG	Polietilenoglicol
SBFI-AM	Sódio benzofuran isoftalato acetoximetil-éster
SSTH	Solução salina tamponada com Hepes
SNC	Sistema nervoso central
TTX	Tetrodotoxina

ABSTRACT

Toxins from natural sources have shown to be useful tools for the investigation of synaptic transmission. Sea anemone venom contains many polypeptide toxins, including cytolysins and neurotoxins. The present study was undertaken to investigate the effects of Bc2, a cytolytic fraction from the venom of the sea anemone *Budonosoma caissarum*, on glutamate release, as well as the effect of Bc2 on free cytoplasmic Ca^{2+} and Na^+ concentration in rat brain synaptosomes. Glutamate release was measured by isotopic and fluorimetric assay. Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Na}^+]_i$ were monitored continuously in Fura-2 or SBFI-loaded synaptosomes, respectively. The results showed that Bc2 (2-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) stimulated glutamate release in a dose dependent manner. Bc2 was not lytic to synaptosomes as inferred by LDH assay and by the fact that KCl was able to induce glutamate release from synaptosomes previously incubated with Bc2. Bc2-induced glutamate release in the absence of extracellular Ca^{2+} was greater than that observed in the presence of Ca^{2+} . Sphingomyelin blocked the glutamate release induced by Bc2 suggesting the involvement of a cytolysin in the Bc2-induced glutamate release. The stimulatory effect of Bc2 was also observed in the presence of tetrodotoxin or dihydrokainate, indicating that the voltage sensitive Na^+ channels or glutamate transporter are not involved. Bc2 increased the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Na}^+]_i$ in a biphasic pattern. These effects persisted in the presence of both gadolinium and tetrodotoxin, suggesting that voltage-sensitive Ca^{2+} and Na^+ channels are not involved, respectively. Whereas Bc2 was more potent than KCl, ionomycin and gramicidin in stimulating glutamate release, it was equipotent as KCl and less potent than ionomycin in increasing $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Taken together, these data suggest that elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Na}^+]_i$ and the stimulatory effect on glutamate release by Bc2 are not coupled events. No definitive evidence about the mechanism underlying the stimulatory effect of Bc2 on the glutamate release is available as yet. However, a direct interaction with exocytosis machinery cannot be ruled out.

RESUMO

Toxinas naturais tem sido utilizadas como ferramentas no estudo na transmissão sináptica. O veneno de anêmonas do mar contém várias toxinas polipeptídicas, como citolisinas e neurotoxinas. Este estudo foi desenvolvido para investigar os efeitos de Bc2, uma fração citolítica do veneno da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* sobre a liberação de glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Também foi estudada a ação de Bc2 na concentração intrasinaptossomal de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) e de Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$). A liberação de glutamato foi determinada por análise isotópica e por fluorimetria. A concentração de Ca^{2+} e Na^+ intrasinaptossomal foi monitorada com Fura-2 e SBFI, respectivamente. Bc2 provocou a liberação de glutamato de modo dependente da dose. Bc2 não provocou a lise dos sinaptossomas, comprovado pela não liberação citosólica de LDH e também porque KCl induziu liberação de glutamato em sinaptossomas previamente incubados com Bc2. A liberação de glutamato induzida por Bc2 foi maior na ausência do que na presença de Ca^{2+} . O efeito de Bc2 foi completamente abolido por esfingomiéline, sugerindo que este efeito foi mediado por uma citolisina. A liberação de glutamato ocorreu na presença de tetrodotoxina ou dihidrokainato, indicando que os canais de Na^+ e o transportador de glutamato não participam neste efeito. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e $[\text{Na}^+]_i$ foram aumentadas por Bc2, sem serem inibidos por gadolínio ou tetrodotoxina, sugerindo que os canais de Ca^{2+} e de Na^+ não estão envolvidos neste efeito. Bc2 foi mais potente do que KCl, ionomicina e gramicidina em liberar glutamato sinaptossomal. Entretanto, Bc2 aumentou a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de modo similar a KCl, mas foi menos potente do que a ionomicina. Assim, os resultados sugerem que o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e $[\text{Na}^+]_i$ e a liberação de glutamato provocadas por Bc2 não são eventos acoplados. Deste modo, ainda não há evidências definitivas sobre o mecanismo pelo qual Bc2 estimula a liberação de glutamato. Uma interação direta sobre o mecanismo de excitação não pode ser descartada.

1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso é um sistema dinâmico, altamente complexo onde bilhões de células interagem e processam informação formando uma intrincada e vasta rede de comunicação. Devido a alta complexidade deste sistema, muitos de seus aspectos ainda não são bem conhecidos. Nas últimas décadas, vários aspectos do processamento da informação tem sido esclarecidos, onde a transmissão sináptica é um evento chave.

Muitos progressos no estudo da transmissão sináptica têm sido possíveis devido à capacidade de certas drogas de interferir em algumas das etapas deste processo. A maioria destas drogas, são neurotoxinas naturais (compostos encontradas na natureza), tanto de origem vegetal como animal (Rosenthal & Meldolesi, 1989).

1.1. Transmissão sináptica

A transmissão sináptica consiste num processo em que um neurônio se comunica com outro ou com uma célula efetora por meio de zonas de contato especializadas denominadas sinapses. Dois processos são utilizados com este objetivo: a transmissão elétrica e a transmissão química. Na sinapse elétrica os neurônios estão acoplados por junções abertas (estruturas tubulares protéicas que conectam diretamente o citoplasma de duas células), as quais permitem o livre movimento de íons de uma célula para outra. Este tipo de transmissão tem a vantagem de ser muito rápida, porém a sua eficácia não pode ser alterada ou modulada. Na sinapse química, as células pré- e pós-sinápticas estão separadas por um espaço (fenda sináptica), com distância de cerca de 50 μm . Uma alteração no potencial elétrico do terminal pré-sináptico induz a liberação de uma substância química (neurotransmissor). Esta se difunde através da fenda

sináptica e interage com o receptor na membrana pós-sináptica, abrindo ou fechando um canal iônico, ou ativando ou inibindo um sistema enzimático. O processo é finalizado com a captação ou metabolização do neurotransmissor e/ou modificação do número ou atividade dos receptores (Kandel et al., 1991; Cooper et al., 1996).

Uma variedade de substâncias atuam como neurotransmissores. Estas incluem aminas como acetilcolina, noradrenalina e serotonina; aminoácidos como glutamato e ácido gama amino butírico (GABA); gases como óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO); e neuropeptídeos como substância P, bradicinina e outros (Erulkar, 1994).

O enfoque principal deste trabalho será sobre o glutamato.

1.2. Transmissão glutamatérgica

O glutamato é o principal mediador da transmissão sináptica excitatória, incluindo a transmissão excitatória rápida e a potenciação de longa duração (LTP). Este aminoácido está presente em alta concentração no sistema nervoso central (Fonnum, 1984; Lodge & Schoepp, 1993). Deste modo, o glutamato está envolvido nas funções cognitivas, motoras e sensoriais e na diferenciação neuronal (Barnes & Henley, 1992). O glutamato também participa na gênese de uma ampla variedade de lesões neurotóxicas agudas e degenerativas crônicas do SNC, como a doença de Alzheimer e a doença de Huntington (Choi et al., 1987; Manev et al., 1989; Barnes & Henley, 1992)

No cérebro, o glutamato é sintetizado no terminal nervoso por ação da glutaminase que catalisa a deaminação de glutamina, a qual é sintetizada nas células gliais e transportada ao terminal nervoso. Também pode ser formado por transaminação de α -cetoglutarato, proveniente do ciclo de Krebs, pela enzima transaminase glutâmico oxaloacético (Nicholls, 1994).

Dentro do terminal nervoso, parte do glutamato é estocado em vesículas sinápticas. Estas captam o glutamato através de transporte ativo obtido por um gradiente

eletroquímico de prótons gerado por uma ATP-ase que bombeia prótons para o interior da vesícula (Nicholls & Attwell, 1990; Sudhof, 1995). As vesículas carregadas de glutamato ficam ancoradas na zona ativa, próxima à membrana sináptica. Após a ancoragem, elas sofrem um processo de maturação (“priming”), onde várias proteínas das vesículas e da membrana do terminal se organizam formando o complexo sináptico, que torna estas vesículas prontas para o processo de exocitose. Quando um potencial de ação alcança o terminal, ocorre um influxo de Ca^{2+} através de canais sensíveis a voltagem, que inicia a fusão das vesículas maduras (“primed”) com a membrana plasmática, com a subsequente liberação do glutamato na fenda sináptica. Após a liberação, as vesículas sinápticas vazias são internalizadas e recicladas para serem carregadas novamente de neurotransmissor. Este ciclo das vesículas sinápticas é regulado por uma cascata (sequência) de interações entre proteínas da membrana vesicular e da membrana plasmática (Nicholls & Attwell, 1990; Sudhof, 1995).

Muitas dessas proteínas tem sido identificadas, mas ainda não está claro o papel de cada uma delas. Um modelo que melhor se aproxima dos principais eventos moleculares que mediam a exocitose tem sido proposto. A maturação da vesícula (“priming”) envolve basicamente o arranjo de duas proteínas da membrana plasmática, a syntaxina e a SNAP-25, junto com uma proteína da vesícula sináptica, sinaptobrevina. Este complexo serve como receptor para a proteína α -SNAP, que por sua vez permite a ligação de NSF, que então rompe o complexo por hidrólise de ATP permitindo a hemifusão da vesícula. Logo depois, a sinaptotagmina atua como sensor de Ca^{2+} completando o processo de fusão mediante a interação com a syntaxina e outras proteínas e fosfolípidos da membrana plasmática, resultando na liberação do conteúdo das vesículas na fenda sináptica (Sudhof, 1995, Greengard et al., 1993).

O glutamato liberado interage com seus receptores na membrana pós-sináptica, produzindo uma resposta celular que depende do tipo de receptor. Os receptores glutamatérgicos podem ser divididos em dois grandes grupos: os ionotrópicos - canais iônicos cuja ativação é regulada pela ligação do glutamato; e os metabotrópicos - acoplados a produção de segundos mensageiros (Schoepp et al., 1990; Monyer et al.,

1992; Nakanishi, 1992). Também são encontrados receptores no terminal pré-sináptico do tipo metabotrópico (Herrero et al., 1992).

A transmissão é finalizada pela recaptação do glutamato por um transportador localizado na membrana plasmática de neurônios e células gliais, sendo a maior parte captado por estas últimas, que o convertem a glutamina. No equilíbrio termodinâmico, o transportador co-transporta Na^+ e glutamato do meio extracelular para o citoplasma em troca de K^+ . Desta maneira, a concentração de glutamato extracelular se mantém na ordem de micromolar, mesmo em presença de concentrações milimolares de glutamato citoplasmático (Kanner & Schuldiner, 1987; Nicholls & Attwell, 1990).

Vários subtipos de transportadores de glutamato têm sido caracterizados e podem ser bloqueados por dihidrokainato (Levi & Raiteri, 1993). O transportador de glutamato, em algumas situações em que o gradiente eletroquímico de Na^+ é colapsado, atua no sentido contrário, provocando um efluxo de glutamato citoplasmático, não armazenado em vesículas, independente de Ca^{2+} (Nicholls et al., 1987; Levi & Raiteri, 1993). Este mecanismo de liberação de glutamato não vesicular é o principal responsável do efluxo de glutamato excitotóxico que ocorre em condições de privação de energia (Nicholls & Atwell, 1990).

Vários estudos de liberação de glutamato, assim como de outros neurotransmissores, tem sido realizados utilizando sinaptossomas como modelo experimental (Turner & Dunlap, 1995; Brown & Nijar, 1995; Ashton & Dolly, 1997, Rodriguez et al., 1997). Os sinaptossomas são preparações subcelulares do tecido nervoso, que correspondem ao terminal nervoso sináptico destacado do axônio (De Robertis et al., 1962; Gray & Whittaker, 1962). Uma vez preparados, os sinaptossomas permanecem viáveis por várias horas, mantendo todas as propriedades do neurônio intacto, exceto a reposição de proteínas e componentes da membrana pelo processo de transporte axonal lento. A importância destas preparações é que elas representam o sistema mais simples que retém todo o sistema de captação, síntese, armazenamento e liberação de neurotransmissores (Nicholls, 1989).

1.3. Toxinas envolvidas na liberação de neurotransmissores

Uma grande variedade de toxinas afetam a liberação de neurotransmissores, interagindo diretamente com o sistema de excitação ou com algumas das etapas anteriores que desencadeiam este evento (Adams & Swanson, 1996). A ação de toxinas em correntes iônicas e no processo de excitação, bem como seus efeitos na liberação de neurotransmissores serão discutidas a seguir.

1.3.1. Toxinas que modificam correntes iônicas

Várias toxinas afetam a liberação de neurotransmissores interagindo com canais de Na^+ dependentes de voltagem, presentes na membrana plasmática do terminal nervoso. As toxinas alcalóides veratridina e batrachotoxina, e neurotoxinas de venenos de anêmona de mar e de escorpião, inibem a fase de inativação de canais de sódio (Levi et al., 1980; Meves et al., 1986; French et al., 1986; Salgado & Kem, 1992). Desta forma, a entrada de Na^+ decorrente da abertura persistente destes canais, despolariza a membrana do terminal causando liberação de neurotransmissores. De modo contrário, a tetrodotoxina e a saxitoxina inibem os canais de Na^+ dependentes de voltagem, inibindo a liberação de neurotransmissores (Nakamura et al., 1965; Johansen & Kleinhaus, 1987).

Outro grupo de toxinas estimula a liberação de neurotransmissores, bloqueando diferentes subtipos de canais de K^+ . Por exemplo, a dendrotoxina, isolada do veneno de cobra *Dendroaspis angusticeps* e algumas toxinas do veneno das anêmonas do mar *Budonosoma granulifera* e *Stichodactyla helianthus* bloqueiam a ativação dos canais de K^+ dependentes de voltagem tipo A, cujo papel é a terminação dos potenciais de ação (Halliwell et al., 1986; Aneiros et al., 1993; Pennington et al., 1996). A inibição desses canais prolonga a duração e induz potenciais de ação, devido à abertura espontânea dos canais de Na^+ dependentes de voltagem. Os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} , outro subtipo de canais de K^+ , também são afetados por várias toxinas, como a apamina,

extraída do veneno de abelha *Apis mellifera*, resultando em bloqueio da hiperpolarização, que ocorre após um trem de potenciais de ação (Haberman, 1977).

Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, desempenham um papel fundamental na neurotransmissão, já que o influxo de Ca^{2+} através deles desencadeia a exocitose das vesículas carregadas com neurotransmissor. Algumas toxinas interagem com diferentes subtipos de canais de Ca^{2+} , ocasionando bloqueio ou ativação dos mesmos. As ω -conotoxinas isoladas de veneno de caracol do gênero *Conus* (Gray et al., 1988), ω -agatoxinas extraídas de veneno da aranha *Agenelopsis aperta* (Pocock & Nicholls, 1992) e Tx3-3, obtida do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (Prado et al., 1996), inibem a liberação de neurotransmissores bloqueando diferentes subtipos desses canais. Ao contrário, a maitotoxina isolada do dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* (McClure et al., 1980) e a β -leptinotarsina extraída do besouro *Leptinotarsa haldemoni* (Freedman et al., 1984) estimulam a liberação de neurotransmissores ativando estes canais.

Além dessas toxinas que interagem com canais iônicos já existentes na membrana plasmática, foram também identificadas outros compostos que formam poros *de novo* na membrana plasmática, seletivamente permeáveis a determinados íons. Por permitir a entrada de íons como Ca^{2+} e Na^+ , estas toxinas podem ser utilizadas como ferramentas biológicas para induzir e estudar a liberação de neurotransmissores. Destes compostos, também chamadas de ionóforos, as mais utilizadas são a ionomicina que forma poros que permitem a entrada de Ca^{2+} (Pocock & Nicholls, 1992) e a gramicidina formadora de poros permeáveis a Na^+ (Romano-Silva et al., 1994a; Basudev et al., 1995).

1.4.2. Toxinas que agem diretamente no mecanismo de exocitose

Várias das proteínas envolvidas no ciclo das vesículas sinápticas que mediam a exocitose são alvo da ação de toxinas (Sudhof, 1995). As toxinas botulínica e tetânica, bloqueadoras da liberação de neurotransmissores, inibem a exocitose das vesículas

sinápticas. Isto ocorre através da proteólise de diferentes proteínas que participam da formação do complexo sináptico-protéico (sinaptobrevina/VAMPs, syntaxina, SNAP-25), essenciais para a exocitose (Schiavo et al., 1994).

A α -latrotoxina obtida do veneno da aranha *Latrodectus mactans* estimula a liberação massiva de neurotransmissores, interagindo com a proteína da vesícula sináptica, sinaptotagmina, que é essencial para a fusão dessa organela com a membrana plasmática. Aparentemente, esta toxina se liga a uma proteína acceptora acoplada a proteína G na membrana plasmática do terminal, e este complexo toxina-acceptor se associa com a sinaptotagmina. Essa interação permitiria a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática (Petrenko et al., 1991; Shoji-Kasai et al., 1994; Surkova, 1994; Krasnoperov et al., 1997).

Alguns aspectos da neurotransmissão podem ser estudados utilizando como ferramentas toxinas como as descritas anteriormente. Muitas das etapas da liberação de neurotransmissores mencionadas, foram elucidadas graças à utilização dessas toxinas. Desta maneira, a procura de novas toxinas com uma possível ação na neurotransmissão, constitui um passo necessário para a maior compreensão deste evento. Uma rica fonte de substâncias biologicamente ativas com potencial uso como ferramenta no estudo da transmissão sináptica é o veneno das anêmonas do mar (Turk, 1991; Macek, 1992).

1.4. Toxinas de anêmona do mar

O veneno das anêmonas de mar contém várias toxinas polipeptídicas com diferentes atividades biológicas: neurotóxica, cardiotoxica, citolítica-hemolítica e inibidora de proteases (Galletis & Norton, 1990; Turk, 1991; Minagawa et al. 1997; Diochot et al., 1998).

De acordo com o tamanho estas toxinas podem ser separadas em dois grupos. O primeiro grupo consiste de toxinas de 46 a 49 aminoácidos com peso molecular entre 3.000 a 5.000 Da (Norton, 1991). Estas toxinas interagem com canais de Na^+ ou K^+ ,

como já mencionado anteriormente e demonstraram ação neurotóxica e cardiotoxica. Várias destas toxinas têm sido isoladas e sequenciadas (Salgado & Kem, 1992; Gendeh et al., 1997; Salinas et al., 1997; Benzinger et al., 1998; Tudor et al., 1998).

O outro grupo compreende polipeptídeos de 160 a 230 aminoácidos e peso molecular entre 15.000 e 20.000 Da (Macek, 1992; Pungercar et al., 1997). Em membranas naturais e artificiais, estas toxinas tem mostrado capacidade de formar poros seletivos para cátions (Varanda & Finkelstein, 1980; Chanturya et al., 1990; Zorec et al., 1990, Belmonte et al., 1993; Tejuca et al., 1996; de los Rios et al., 1998). Uma característica comum destas toxinas, denominadas de citolisinas ou hemolisinas, devido a uma potente atividade lítica sobre eritrócitos, é que elas são inibidas por esfingomiéline, um fosfolípido geralmente encontrado na membrana plasmática de várias células (Macek, 1992; Suput, 1994). Tem sido proposto que a ação citolítica-hemolítica ocorre devido a um choque osmótico, causado pela capacidade das toxinas de formar canais iônicos *de novo*, que permitem o influxo de cátions (Zorec et al., 1990).

Outros efeitos tem sido descritos para estas citolisinas, tais como atividade cardiotônica (Galettis & Norton, 1990), histaminolítica (Elliot et al., 1986) e agregação plaquetária (Teng et al., 1988).

Malpezzi et al. (1991) demonstrou a presença de atividade hemolítica no veneno da anêmona do mar *Budonosoma caissarum*, uma espécie encontrada somente no litoral brasileiro. A purificação parcial de citolisinas desta anêmona do mar, resultou em três frações com atividade citolítica, Bc1, Bc2 e Bc3. As propriedades bioquímicas da principal e mais potente fração citolítica, Bc2, foram caracterizadas (Gabilan, 1992). Outro estudo também revelou a presença de neurotoxinas de baixo peso molecular neste veneno, que foram caracterizadas e sequenciadas (Malpezzi et al., 1993). Em estudo recente, Bc2 também demonstrou atividade de aumento da permeabilidade vascular em vários tecidos de ratos. (Muniz, 1998)

Existem poucos trabalhos mostrando a ação de citolisinas de anêmonas do mar em neurônios. A equinatoxina, uma citolisina obtida da anêmona do mar *Actinia equina* causa despolarização de fibras nervosas mielinizadas (Suput, 1994). Também foi

demonstrada que as citolisinas Hmg I e Hmg II, isoladas da anêmona do mar *Heteractis magnifica*, inibiram a captação de GABA e colina em sinaptossomas (Khoo et al., 1995).

Embora estes trabalhos tenham resultados envolvendo citolisinas e células nervosas, nenhum estudo foi realizado sobre a ação de citolisinas de anêmonas do mar na liberação de neurotransmissores. Várias observações induzem a possibilidade de que as citolisinas de anêmonas do mar poderiam agir neste evento:

1. as citolisinas são proteínas formadoras de poros que permitem o influxo de Ca^{2+} e Na^+ (Zorec et al., 1990), dois íons envolvidos na neurotransmissão.

2. várias citolisinas, como a equinatoxina, induzem a exocitose de granulócitos e trombócitos (Suput, 1994).

Estas evidências sugerem que as citolisinas de anêmonas do mar poderiam interferir também no processo de exocitose em neurônios.

Com base nestas considerações, foi estudado o efeito da fração citolítica Bc2 da anêmona do mar *Budonosoma caissarum* sobre a liberação de glutamato, principal neurotransmissor das sinapses do SNC, em sinaptossomas de córtex de ratos. Também foi verificado o efeito de Bc2 sobre a concentração de Ca^{2+} e Na^+ intrasinaptossomal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Drogas e Reagentes

Percoll, Sacarose, HEPES, ditioneitol (DTT), Ácido etilendiaminotetracético (EDTA), Triton X-100, L-glutamato, Ácido etilenglicol-bis β -aminoetil-eter tetracético (EGTA), Esfingomielina, tetrodotoxina (TTX), Polietilenglicol 1500 (PEG 1500), Fura-2 acetoximetil-éster (Fura-2), Sódio benzofurano isoftalato acetoximetil-éster (SBFI), Glutamato desidrogenase (EC 1.4.1.3), Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADP^+), Dihidroquinato (DHK), ionomicina, gramicidina e gadolínio, foram obtidos da Sigma Chemical Co., MO, USA.

Outros reagentes de qualidade P.A. foram obtidos da Merck S.A. Indústrias Químicas, Brasil.

“Kit” de Dosagem de lactato desidrogenase (LDH), da Doles Laboratório Ltda, Brasil

Líquido de cintilação foi adquirido da SARDI, SP, Brasil.

[^3H]glutamato (atividade específica 53 Ci/mmol) foi obtido da Amersham International (UK).

2.2. Equipamentos

Centrífuga refrigerada Hitachi, Cintilador líquido Packard, Espectrofluorímetro PTI.

2.3. Animais

Foram usados ratos Wistar adultos, de ambos os sexos, com peso entre 200 e 250 g, provenientes do Biotério Central da UFSC. Os ratos foram mantidos com água e ração *ad libitum* com ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

2.4. Obtenção da fração Bc2

As anêmonas do mar da espécie *Budonosoma caissarum* foram coletadas na praia da Armação, Florianópolis, SC. A extração do veneno foi realizada pela imersão de 5 a 7 animais em água destilada (500 mL), durante cerca de 2 horas, como descrito por Aneiros et al. (1993). Depois de retirados os animais, a solução contendo veneno e muco liberado pelas anêmonas do mar foi filtrado através de papel filtro para remover partículas do corpo e areia, em temperatura de 10°C. O filtrado foi alíquotado e liofilizado. O veneno liofilizado (5 mg de proteína) foi redissolvido em água destilada e fracionado por cromatografia em coluna (1,5 x 100 cm) de gel Biogel P-2. A coluna foi eluída com água destilada, num fluxo de 3 ml/hora. Cada fração foi coletada e a atividade hemolítica (citólítica) testada sobre eritrócitos de carneiros a 5% (Gabilan, 1992). A fração citolítica correspondente a Bc2 foi reunida e liofilizada.

2.5. Preparação de sinaptossomas

Os sinaptossomas foram obtidos de acordo com o método descrito por Dunkley et al. (1988). Ratos foram mortos por decapitação com uma guilhotina e os cérebros rapidamente removidos. O córtex cerebral foi dissecado e homogeneizado em 10 volumes de solução de sacarose (0,32 M) e EDTA (1 mM). O homogenato foi centrifugado a 1.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado sobre

gradientes descontínuos de Percoll (3, 7, 15 e 23 %) e centrifugado a 40.000 x g por 10 minutos a 4°C. As frações sinaptossomais obtidas nas interfaces 7%-15% e 15%-23% foram lavadas por duas vezes por centrifugação a 27.000 x g por 10 minutos a 4°C com 4 mL de solução salina tamponada com HEPES (SSTH), mantida sob oxigenação e resfriada com gelo. A solução SSTH possuía a seguinte composição, em mM: HEPES 27; NaCl 133; KCl 2,4; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1 e glicose 12. O pH da solução foi ajustada para 7,4 com NaOH 1 N.

2.6. Ensaio de liberação de [³H]glutamato

O ensaio de liberação de glutamato marcado foi adaptado do método descrito por Lynch & Voss (1990). O “pellet” sinaptossomal obtido acima foi ressuspendido em 900 µL de SSTH, numa concentração final de 10 mg/mL de proteína. Nesta preparação sinaptossomal foram adicionados 100 µL de solução de [³H]glutamato, contendo 2 µCi de [³H]glutamato (atividade específica 53 Ci/mmol) e glutamato não radioativo (concentração final de 5 x 10⁻⁷ M). A preparação foi incubada por 15 minutos a 37°C.

Após a incubação, alíquotas de 140 µL de sinaptossomas (1,4 mg de proteína) foram colocados sobre filtros Millipore HV Durapore (0,45 µm) e lavados com 10 vezes 1 mL de SSTH sob vácuo, a temperatura ambiente (25°C). Este volume de tampão é utilizado para descartar o excesso de glutamato (neurotransmissor não captado) e alcançar o nível de liberação basal de glutamato. Os sinaptossomas foram incubados durante 30 segundos com 1 mL de Bc2, em diferentes condições experimentais. A seguir, os sinaptossomas foram lavados por filtração à vácuo com 3 vezes de 1 mL de SSTH oxigenado a temperatura ambiente. Os filtrados foram coletados em frascos de cintilação líquida (20 mL) para determinar o [³H]glutamato liberado (extrasinaptossomal) no meio de incubação. Os filtros também foram colocados em frascos para medidas no cintilador. A cada frasco foi adicionado 8 mL de líquido de cintilação.

A contagem da radioatividade (cpm) contida nos filtros e nos filtrados foi

realizada num cintilador líquido. A quantidade de [³H]glutamato liberado foi calculada como porcentagem do total, da seguinte maneira:

$$[{}^3\text{H}]\text{glutamato liberado (\%)} = \frac{\text{cpm no filtrado}}{\text{cpm no filtrado} + \text{cpm no filtro}} \times 100$$

O efeito da concentração de Bc2 foi estudado, variando de 2 a 20 µg/mL de Bc2. Com o objetivo de estudar o efeito do tempo de incubação, Bc2 foi incubado com a preparação sinaptossomal em tempos de 15 a 180 segundos.

Para verificar se a liberação de glutamato é dependente de Ca²⁺, Bc2 foi incubada na presença da solução de SSTH-sem cálcio, contendo 2 mM de EGTA. Com a finalidade de caracterizar o efeito de Bc2 na liberação de glutamato, a fração foi incubada com: esfingomiéline (500 µg/mL), um inibidor da atividade das citolisinas de anêmona do mar (Macek, 1992); tetrodotóxina (5 µM), um inibidor dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem (Nakamura et al., 1965) e polietilenoglicol PEG 1500 (30 mM), um protetor osmótico que inibe a atividade hemolítica de várias citolisinas (Belmonte et al., 1993; Macek et al., 1994).

2.7. Dosagem de glutamato por fluorimetria

A cinética de liberação de glutamato foi monitorada de modo contínuo pelo aumento da fluorescência, devido à produção de NADPH na presença da enzima glutamato desidrogenase (GDH) e NADP⁺ (Nicholls et al., 1987; Romano-Silva et al., 1994a). O glutamato liberado pelos sinaptossomas é convertido pela glutamato desidrogenase a α-cetoglutarato, com a concomitante redução do NADP⁺ a NADPH. Esta reação produz um aumento da fluorescência que pode ser registrada num espectrofluorímetro (Nicholls et al., 1987).

Os sinaptossomas foram ressuspensos em 1200 µL de solução Krebs-Ringer HEPES (KRH) com a seguinte composição, em mM: NaCl 124; KCl 4; MgSO₄ 1,2; HEPES 25; glicose 10. O pH foi ajustado a 7,4 com NaOH 5 N.

Duzentos microlitros da suspensão sinaptossomal (concentração de 10 mg/mL de proteína) foram incubados durante 30 minutos a 35°C. Em seguida, foram diluídos em 1200 µL de KRH e incubados mais 30 minutos. Após a incubação, os sinaptossomas foram centrifugados a 1.000 x g por 15 segundos. O precipitado foi dissolvido em 2 mL de KRH e transferido para uma cubeta de espectrofluorímetro. A fluorescência foi monitorada a 475 nm de emissão e 360 nm de excitação. O ensaio foi realizado com a temperatura mantida a 37°C sob agitação. Aos 30 segundos do início do registro da fluorescência, 2 µL de CaCl₂ (concentração final de 1 mM) foi adicionado na cubeta. Cinco microlitros de NADP⁺ (1 mM de concentração final) e 24 µL de GDH (50 unidades) foram adicionados nos tempos de 90 e 120 segundos, respectivamente. No tempo de 300 segundos, foram adicionados um dos seguintes compostos: 4 µL de Bc2 (10 µg/mL de proteína), KCl (33 mM), ionomicina (10 µM) ou gramicidina (2 µM). Após 800 segundos de reação foi adicionado um padrão de glutamato de concentração conhecida, para calibrar a fluorescência do NADPH. O registro da fluorescência continuou até alcançar 900 segundos.

Quando necessário, a quantidade total de glutamato liberado foi calculada como a diferença entre a quantidade de glutamato liberado no final do registro e a liberação basal (antes da adição do estímulo).

2.8. Determinação da concentração de Na⁺ intrasinaptossomal

A concentração de Na⁺ citosólico foi determinada monitorando a fluorescência do marcador SBFI-AM (sodium-binding benzofuran isophthalate acetoxymethyl-ester) que se liga ao sódio livre (Kongsamut & Nachshen, 1988), conforme descrito por Romano-Silva et al. (1994a).

Os sinaptossomas foram ressuspensos em 1200 µL de solução de KRH-colina, onde o cloreto de sódio foi substituído, em quantidade equimolar por cloreto de colina. Aliquotas de 200 µL da suspensão sinaptossomal (10 mg/mL de proteína) foram

incubadas com 4 μL de SBFI-AM (2 μM) por 30 minutos a 35°C, para permitir a captação do marcador. Em seguida, a preparação sinaptossomal foi diluída em 1200 μL de KRH-colina e incubada por mais 30 minutos a 35°C. Após a incubação, os sinaptossomas foram lavados por centrifugação a 1.000 x g por 15 segundos, para eliminar o SBFI não captado. O precipitado foi dissolvido em 2 mL de KRH e transferido para uma cubeta no espectrofluorímetro. A emissão fluorimétrica do SBFI foi registrada a 500 nm usando uma excitação alternante entre 330 e 370 nm. O registro foi realizado durante 630 segundos. Após 30 segundos de iniciado o ensaio, 2 μL de CaCl_2 (concentração final de 1 mM) foi adicionado na cubeta e em seguida, no tempo de 120 segundos, 4 μL de Bc2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína). Para estudar a participação dos canais de Na^+ dependentes de voltagem, foi adicionado TTX (5 μM), 60 segundos antes da adição de Bc2. No final do registro, foi realizada a calibração da fluorescência do SBFI através da adição de 2 μL de gramicidina (2 μM). Esta fluorescência foi considerada como máxima, já que a gramicidina favorece a entrada massiva de Na^+ , através da formação de poros permeáveis para este íon (Romano-Silva et al., 1994a).

2.9. Determinação da concentração de Ca^{2+} intrasinaptossomal

A concentração de Ca^{2+} citosólico livre foi determinada monitorando a fluorescência do Fura-2 AM (acetoximetil-éster), conforme descrito por Romano-Silva et al. (1994b). Este composto é um quelante de cálcio, que emite fluorescência quando se liga ao Ca^{2+} (Grynkiewicz et al., 1985).

Os sinaptossomas foram resuspenso em 1200 μL de KRH. Aliquotas de 200 μL da suspensão sinaptossomal (10 mg/mL de proteína) foram incubadas com 1 μL de Fura 2-AM (5 μM) por 30 minutos a 35°C, para permitir a captação do marcador. A seguir, os sinaptossomas foram diluídos em 1200 μL de KRH-colina e incubados por mais 30 minutos a 35 °C. Após a incubação, os sinaptossomas foram lavados por centrifugação a 1.000 x g, por 15 segundos para eliminar o Fura-2 não captado. O

precipitado foi dissolvido em 2 mL de KRH e transferido para uma cubeta de espectrofluorímetro. A emissão fluorimétrica do Fura-2 foi monitorada durante 630 segundos, a 500 nm usando uma excitação que alternava entre 330 e 370 nm. Após 30 segundos do início do registro fluorimétrico, 2 μL de CaCl_2 (1 mM, concentração final) foi adicionado na cubeta. No tempo de 120 segundos foi acrescentado 4 μL de Bc2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína), KCl (33 mM) ou ionomicina (10 μM). Quando necessário, gadolínio (100 μM), um bloqueador inespecífico de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Romano-Silva et al., 1994b) foi adicionado 60 segundos antes de Bc2. Para calibrar o registro, a máxima fluorescência foi obtida pela adição de 20 μL de SDS (10 %), aos 510 segundos. O SDS provoca a lise dos sinaptossomas e permite que todo o Ca^{2+} do meio se ligue ao Fura-2. O ajuste do valor mínimo foi obtido com a adição de 40 μL de EGTA (concentração final de 2 mM), um quelante de Ca^{2+} , no tempo de 560 segundos.

2.10. Dosagem de lactato desidrogenase (LDH)

Este ensaio foi realizado para avaliar a integridade dos sinaptossomas, pois a enzima LDH é considerada um marcador citosólico (Lazarovici & Lelkes, 1992).

Os sinaptossomas foram incubados com Bc2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína) ou Triton (1,5%) durante 15 minutos a 37°C. Após a incubação, os sinaptossomas foram centrifugados a 10.000 x g por 15 segundos. A dosagem de LDH liberado foi quantificada no sobrenadante (20 μL) utilizando as instruções descritas no “kit” de determinação de LDH. O sobrenadante (20 μL) foi incubado por 5 minutos a 37°C com 200 μL de sacarose 1,18 M, 500 μL da solução de substrato (lactato 0,1 M, o-fenantrolina 5 mM em Tris-Cl 0,2 M) e 20 μL de sulfato de ferro amoniacal 12 mM. A seguir, foi adicionado 20 μL de NAD-FMS e a amostra incubada por 5 minutos a temperatura de 37°C. A reação foi interrompida pela adição de HCl 0,1 M e a

absorbância das amostras determinada num espectrofotômetro a 510 nm. A quantidade de LDH liberado pela incubação dos sinaptossomas com Triton foi considerado como 100%.

2.11. Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (1951) ou Peterson (1977).

2.12. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada através de ANOVA de uma ou duas vias, seguido pelo teste do raio múltiplo de Duncan, quando apropriado.

As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Liberação de [³H]glutamato por Bc2: dependencia da concentração e do tempo de incubação

Bc2 estimulou a liberação de [³H]glutamato de modo dependente da dose (Figura 1). A máxima liberação de glutamato foi obtida na concentração de 10 µg/mL de Bc2, não sendo observado um aumento significativo em concentrações mais altas.

A dependência do tempo na liberação de glutamato induzida por Bc2 (10 µg/mL) foi testada variando os períodos de incubação. A Figura 2 mostra que após uma incubação de apenas 15 segundos, Bc2 já aumentou a liberação de glutamato em relação ao respectivo controle. A máxima liberação do neurotransmissor ocorreu a partir de 30 segundos. Pode ser observada, que a liberação espontânea teve um grande aumento após 60 e 180 segundos, quando comparado com o tempo de incubação de 15 e 30 segundos (Figura 2). Desta maneira, o tempo de 30 segundos de incubação foi escolhido para realizar os ensaios, uma vez que foi suficiente para produzir o efeito máximo de Bc2, com o mínimo de liberação espontânea.

3.2. Efeito de Bc2 na liberação de LDH

A ruptura da preparação sinaptossomal foi analisada, através da dosagem da liberação extracelular da enzima lactato desidrogenase (LDH), um marcador citosólico.

A Figura 3 mostra que os sinaptossomas incubados por 15 minutos com Bc2 (10 µg/mL de proteína), não mostraram um aumento significativo da liberação de LDH, em relação ao controle. O resultado indica que a fração Bc2 não provocou a lise da

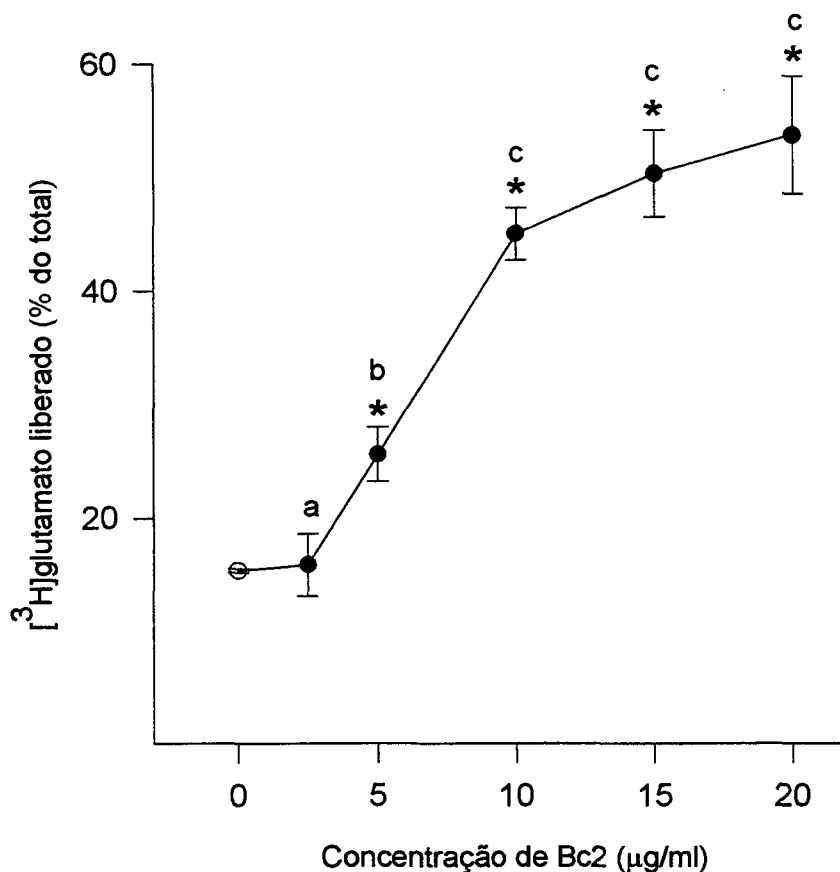


Figura 1. Curva dose-resposta da liberação de glutamato induzida por Bc2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Sinaptossomas (14 mg de proteína) obtidos como descrito em Material e Métodos, foram incubados por 15 minutos a 37°C com [³H]glutamato. Sinaptossomas radiomarcados (1,4 mg de proteína) foram colocados sobre filtros Millipore (0,45 µm) e lavados 10 vezes 1 mL com solução salina tamponada com Hepes (SSTH), sob vácuo a temperatura ambiente. Os sinaptossomas foram incubadas durante 30 segundos em ausência (o) ou presença (●) de Bc2 nas concentrações de 2, 5, 10, 15 e 20 µg/mL. O glutamato liberado no meio de incubação foi separado dos sinaptossomas por filtração à vácuo. Os sinaptossomas foram lavados 3 vezes 1 mL de SSTH e o filtrado coletado junto com o meio de incubação. A contagem da radioatividade nos filtros e nos filtrados foi realizada por cintilação líquida. Os resultados representam a média de três experimentos ± E.P.M. Valores marcados com diferentes letras são significativamente diferentes entre si, e os marcados com a mesma letra não são diferentes. *Resultados estatisticamente diferentes do controle (o) ($p < 0,05$) por ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan.

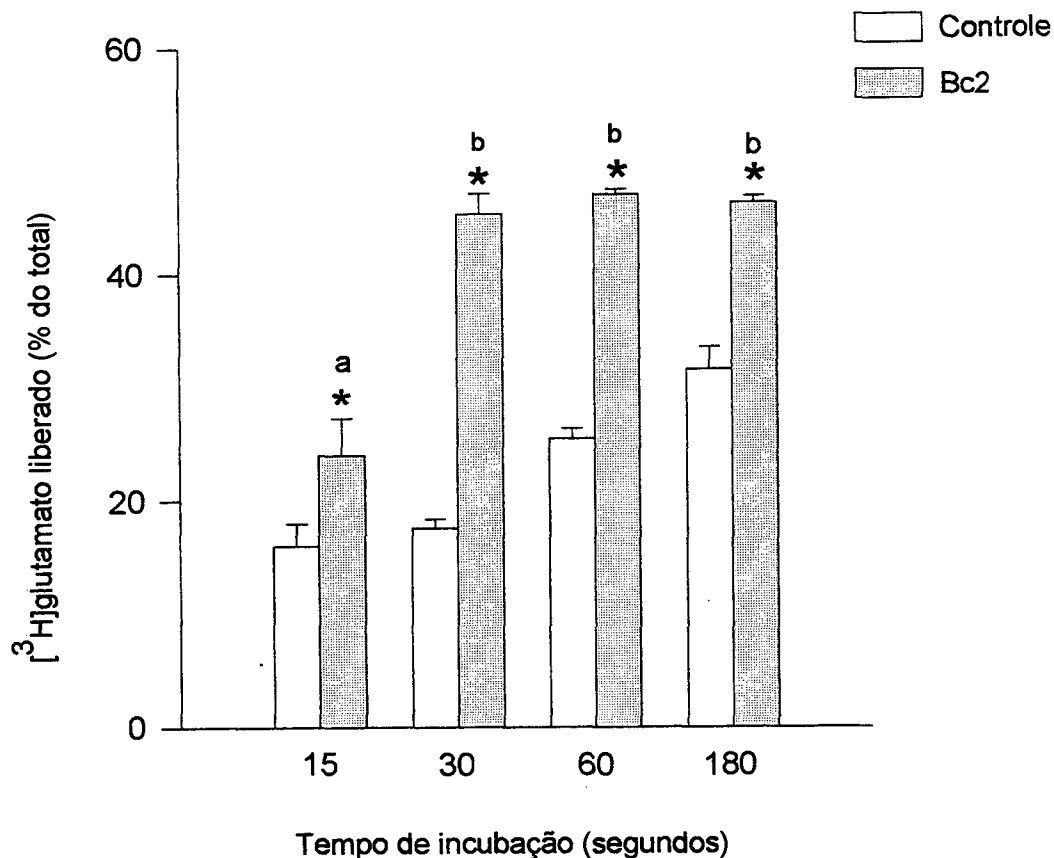


Figura 2. Influência do tempo de incubação na liberação de [³H]glutamato induzida por Bc2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Sinaptossomas foram tratados como descrito na Figura 1 e incubados na ausência (controle) e na presença de Bc2 (10 µg/mL) nos tempos indicados. Os resultados representam a média de três experimentos ± E.P.M. Valores marcados com diferentes letras são significativamente diferentes entre si e os marcados com a mesma letra não são diferentes. *Resultados estatisticamente diferentes do respectivo controle ($p < 0,05$) por ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan

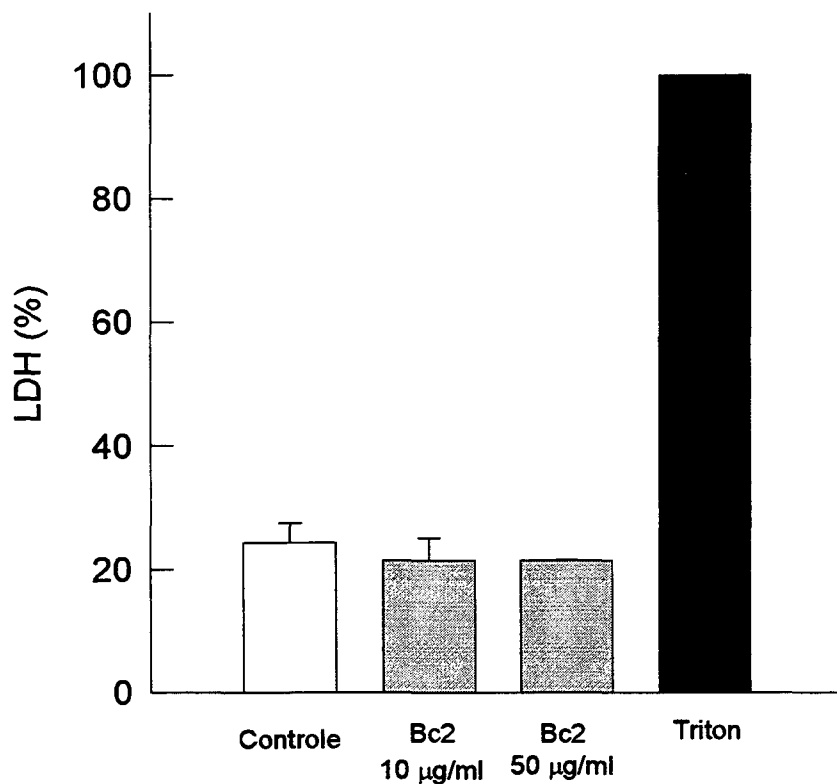


Figura 3. Liberação de LDH em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos incubados com Bc2. Sinaptossomas foram incubados na ausência (controle) ou na presença de Bc2 nas concentrações indicadas durante 15 minutos a 37°C. Os sinaptossomas foram centrifugados a 10.000 x g por 15 segundos. A dosagem de LDH liberado foi quantificada no sobrenadante (20 µL) utilizando um “kit” de determinação de LDH. A porcentagem de LDH liberado foi expressa em relação ao conteúdo total, calculado pela lise dos sinaptossomas com Triton (1,5 %). Os resultados representam a média ± EPM de 3 experimentos

membrana sinaptossomal.

3.3. Liberação de glutamato por KCl em sinaptossomas pré-incubados com Bc2

Este experimento foi realizado para verificar a integridade funcional dos sinaptossomas tratados com Bc2. A liberação de [³H]glutamato induzida por KCl (33 mM) foi testada em sinaptossomas pré-incubados por 30 segundos com Bc2.

KCl ainda foi capaz de induzir a liberação de [³H]glutamato em sinaptossomas previamente incubados com Bc2 (Figura 4). O efeito foi da mesma magnitude do que o observado em sinaptossomas não incubados com a fração citolítica Bc2, sugerindo que os sinaptossomas ainda permaneciam funcionais.

3.4. Efeito da esfingomielina na liberação de [³H]glutamato induzida por Bc2

Para estudar se a liberação de glutamato provocada por Bc2 é mediada por uma citolisina, foi testado o efeito da esfingomielina na liberação de [³H]glutamato estimulada por Bc2. A Figura 5 mostra que na presença de esfingomielina, Bc2 não provocou qualquer aumento na liberação de [³H]glutamato. A esfingomielina incubada com os sinaptossomas não afetou a liberação basal de glutamato. Este resultado sugere que a liberação de glutamato seria mediada por uma citolisina e não por algum outro componente presente em Bc2.

3.5. Efeito de TTX na liberação de [³H]glutamato induzida por Bc2

O envolvimento de canais de Na⁺ dependentes de voltagem na liberação de [³H]glutamato, foi testada verificando o efeito da fração Bc2 na presença de TTX.

A adição de TTX não modificou a liberação de glutamato induzida por Bc2, (Figura 5), sugerindo que os canais de Na^+ dependentes de voltagem não participam neste efeito. TTX não alterou a liberação basal de [^3H]glutamato.

3.6. Liberação de [^3H]glutamato evocada por Bc2 na presença de PEG 1500

Para investigar se o glutamato estaria sendo liberado através de poros formados pela fração citolítica na membrana sinaptossomal, polietilenoglicol (PEG) 1500 foi incubado junto com Bc2. A adição de PEG 1500 não modificou a liberação de glutamato induzida por Bc2 (Figura 5). Comparado ao controle, PEG 1500 não provocou efeito na liberação de [^3H]glutamato. Estes dados sugerem que não houve saída inespecífica de [^3H]glutamato através de poros na membrana dos sinaptossomas.

3.7. Efeito de EGTA na liberação de [^3H]glutamato induzida por Bc2

A dependência de Ca^{2+} na liberação de [^3H]glutamato induzida por Bc2 foi estudada, incubando os sinaptossomas na presença ou na ausência de Ca^{2+} (meio contendo EGTA 2 mM). Na ausência de Ca^{2+} (presença de EGTA), a liberação de [^3H]glutamato induzida por Bc2 foi significativamente maior (Figura 6). Portanto, a ação de Bc2 parece ser independente de Ca^{2+} extracelular. Ao mesmo tempo, a liberação de glutamato evocada por KCl foi totalmente inibida na presença de EGTA.

3.8. Liberação de glutamato induzida por Bc2: comparação com ionóforos e KCl

A cinética da liberação de glutamato induzida por Bc2 foi realizada através de um contínuo monitoramento fluorimétrico da liberação do neurotransmissor. A Figura 7 mostra que Bc2 provocou uma rápida liberação de glutamato nos primeiros 100

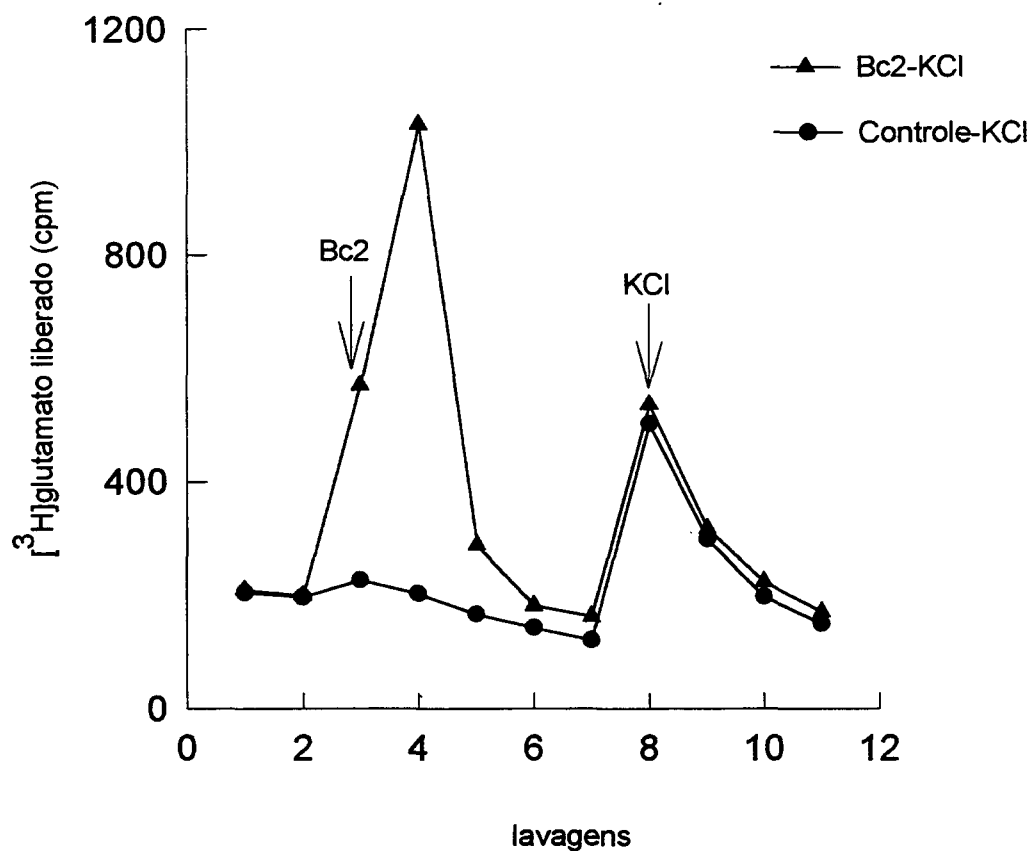


Figura 4. Liberação de $[^3\text{H}]$ glutamato induzida por KCl em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos previamente incubados com Bc2. Sinaptossomas marcados com $[^3\text{H}]$ glutamato e tratados como indicado na Figura 1 foram incubados por 30 segundos na ausência ou na presença de Bc2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente foram lavados sob filtração à vácuo e incubados com KCl (40 mM) por 30 segundos. Os filtrados contendo o glutamato liberado a cada lavagem, foram coletados separadamente. Os resultados correspondem a um experimento representativo. As setas indicam a adição das amostras

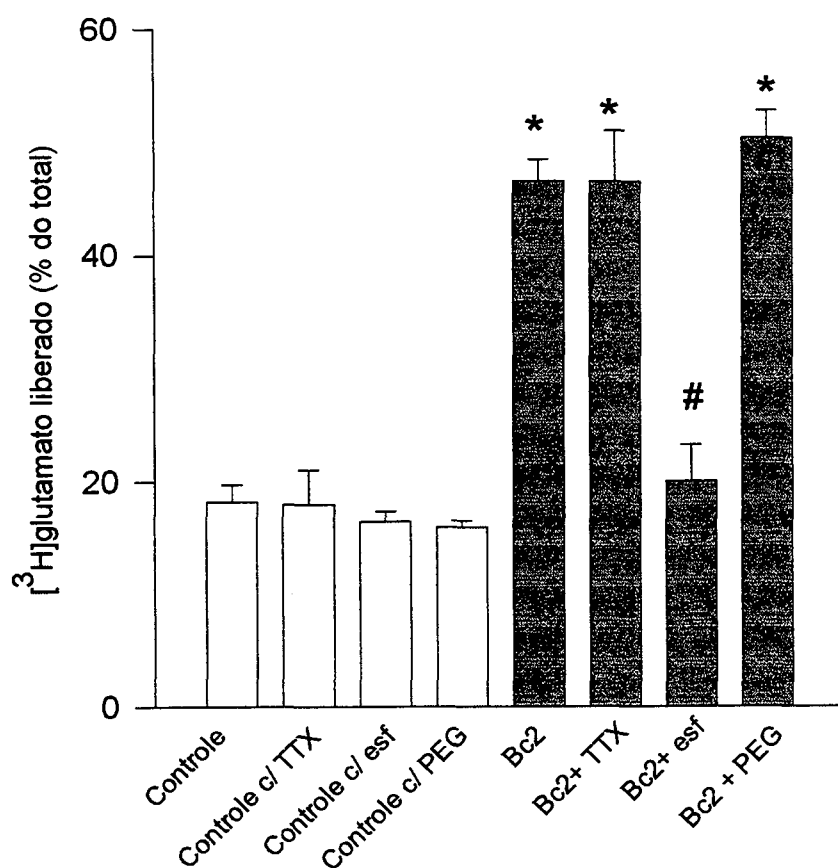


Figura 5. Efeito de TTX, esfingomielina ou PEG 1500 na liberação de [³H]glutamato induzida por Bc2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Sinaptossomas marcados com [³H]glutamato e tratados como indicado na Figura 1, foram incubados por 30 segundos em ausência (controle) ou presença de Bc2 (10 µg/mL) em meio com ou sem TTX (5 µM), esfingomielina (500 µg/mL) ou polietilenoglicol, PEG 1500 (30 mM). Os resultados representam a média de três experimentos ± E.P.M. *Resultados estatisticamente diferentes do controle (p<0,01). # Resultados estatisticamente diferente de Bc2 (p<0,01) por ANOVA de uma via seguida do test de Duncan.

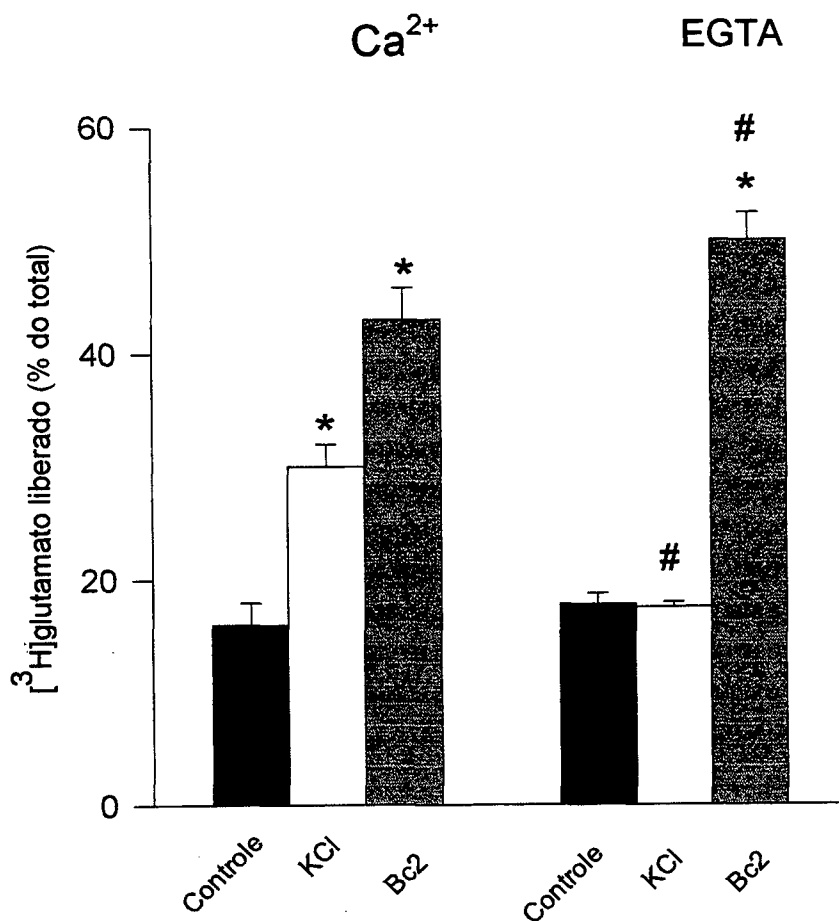


Figura 6. Efeito de EGTA na liberação de [³H]glutamato induzida por Bc2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Sinaptossomas marcados com [³H]glutamato e tratados como indicado na Figura 1 foram incubados por 30 segundos na ausência (controle) ou na presença de Bc2 (10 µg/mL) ou KCl (40 mM), em meio com Ca²⁺ ou em meio sem Ca²⁺ e presença de EGTA. Os resultados representam a média de três experimentos ± E.P.M. *Resultados estatisticamente diferentes do respectivo controle (p<0,01). # Resultados estatisticamente diferentes da respectiva condição na presença de Ca²⁺ (p<0,05) por ANOVA de duas vias seguida do test de Duncan.

segundos, seguida de uma fase estacionária. O perfil de liberação de glutamato foi similar ao provocado pela despolarização com KCl, que também mostrou um padrão bifásico. No entanto, a primeira fase da resposta ao KCl foi bastante mais lenta do que a induzida por Bc2.

A liberação de glutamato provocada por Bc2 foi também comparada com a liberação evocada pelo ionóforos, como a ionomicina (10 μ M) e a gramicidina (2 μ M), ambas em concentrações saturantes. Pode ser observado na Figura 7 que a curva de liberação de glutamato pela gramicidina é diferente da causada por Bc2, ocorrendo esta numa taxa mais baixa e constante. Entretanto, a ionomicina mostrou um padrão similar, na liberação de glutamato mas foi menos potente do que Bc2.

3.9. Efeito do dihidrokainato na liberação de glutamato evocada por Bc2

Para testar o possível envolvimento do transportador de glutamato na liberação evocada por Bc2, a liberação deste neurotransmissor foi monitorada na presença de dihidrokainato (DHK).

Como está mostrado na Figura 8, dihidrokainato não modificou a liberação do neurotransmissor induzida por Bc2, sugerindo que este efeito não é mediado pelo transportador de glutamato.

3.10. Efeito de Bc2 na concentração de Ca^{2+} intrasinaptossomal

Bc2 provocou um rápido aumento na concentração intrasinaptossomal de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), seguido de uma fase estacionária, como está mostrado na Figura 9. A magnitude da resposta de Bc2 foi similar à produzida por KCl, entretanto esta provocou um aumento mais rápido do $[Ca^{2+}]_i$. A ionomicina, um ionóforo para Ca^{2+} , mostrou um resultado diferente, com um aumento constante e maior do Ca^{2+} intrasinaptossomal.

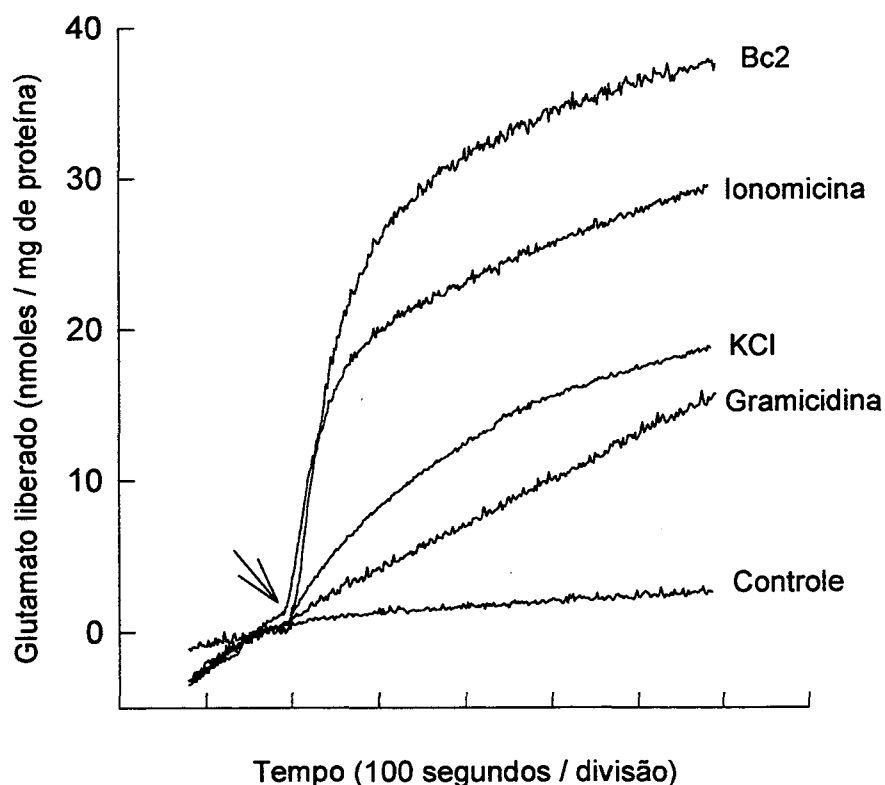


Figura 7. Cinética da liberação de glutamato endógeno induzida por Bc2, comparação com KCl e ionóforos. Sinaptossomas obtidos como descrito em Material e Métodos foram colocados numa cubeta de espectrofluorímetro e a liberação de glutamato sinaptossomal foi monitorada pelo aumento da fluorescência do NADPH (excitação 360 nm e emissão a 475 nm). CaCl_2 (1 mM), NADP⁺ (1mM) e glutamato desidrogenase (50 unidades) foram adicionados na cubeta nos tempos de 30, 90 e 120 segundos respectivamente, Aos 300 segundos de iniciado o registro (↓) foi adicionado Bc2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou KCl (33 mM) ou gramicidina (2 μM) ou ionomicina (10 μM) ou meio controle. Cada resultados representa a média de três experimentos. O aumento total de glutamato liberado induzido por Bc2 foi estatisticamente diferente ao aumento induzido por KCl ($p < 0.01$) por ANOVA de uma via seguida do test de Duncan.

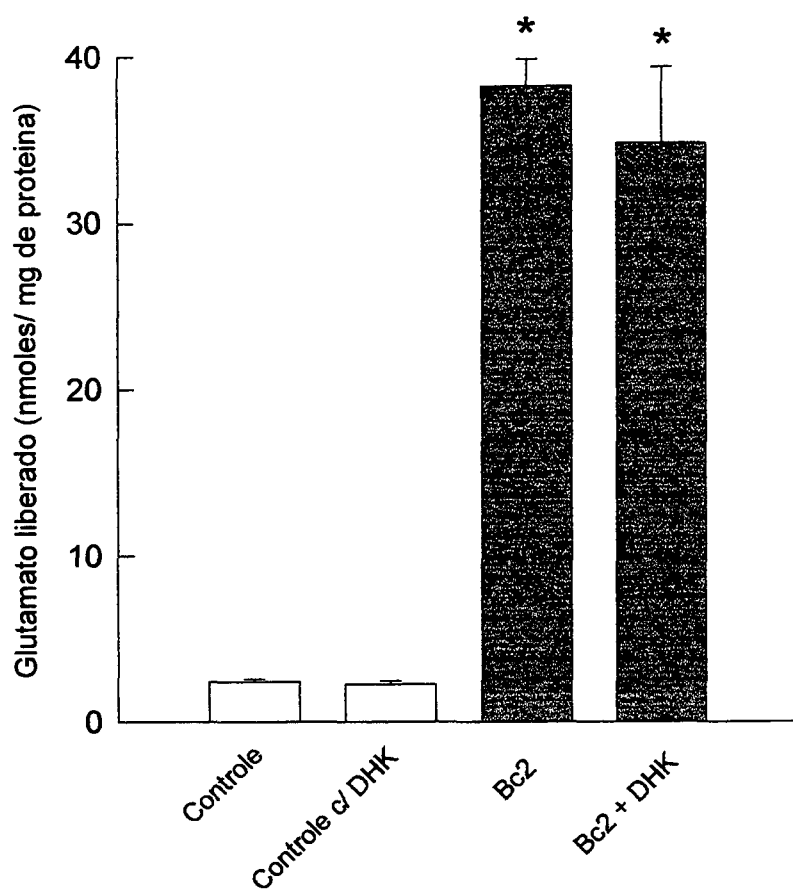


Figura 8. Efeito do dihidrokainato na liberação de glutamato induzida por Bc2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. A liberação de glutamato sinaptossomal foi monitorada como indicado na Figura 6. Dihidrokainato (1 mM) ou meio controle foi adicionado aos 240 segundos do início do registro e 60 segundos após foram adicionados Bc2 (10 µg/mL) ou meio controle. Os resultados representam a média ± EPM do glutamato total liberado, de três experimentos. *Resultados estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,01$) por ANOVA de uma via seguida do test de Duncan.

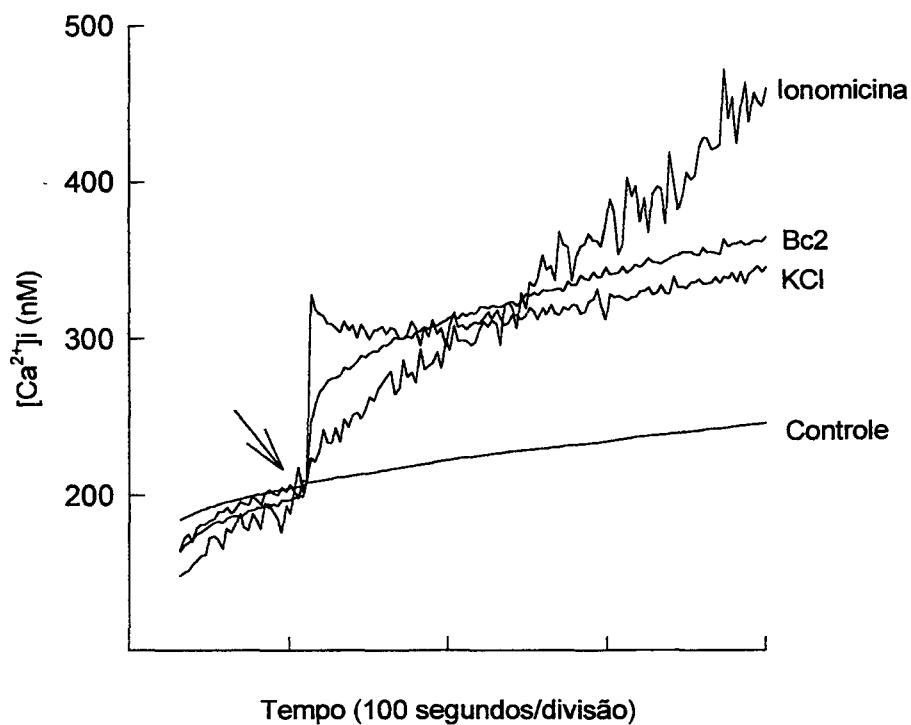


Figura 9. Efeito de Bc2 na concentração de Ca^{2+} intrasinaptosomal em córtex cerebral de ratos. Sinaptossomas obtidos como descrito em Material e Métodos foram incubados por 1 hora a $35^{\circ}C$ com Fura-2 AM ($5 \mu M$). Sinaptossomas marcados com Fura-2 foram colocados numa cubeta de espectrofluorímetro e a emissão fluorimétrica foi registrada durante 630 segundos a 500 nm usando uma excitação de 330/370 nm. $CaCl_2$ (1mM) foi adicionado à preparação sinaptosomal aos 30 segundos do início do registro. No tempo de 120 segundos foram adicionados: Bc2 ($10 \mu g/mL$) ou KCl (33 mM) ou ionomicina ($10 \mu M$) ou meio controle. Os resultados representam a média de três experimentos. O aumento total da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por Bc2 foi estatisticamente diferente do controle ($p < 0.01$) por ANOVA de uma via seguido do test de Duncan.

A Figura 10 mostra que o aumento do $[Ca^{2+}]_i$ evocada por Bc2 não foi inibida pela adição de gadolínio, um bloqueador inespecífico de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, indicando que esses canais não estão envolvidos no efeito de Bc2.

3.11. Efeito de Bc2 na concentração de Na^+ intrasinaptossomal

Um rápido incremento na $[Na^+]_i$ foi induzido por Bc2 (10 $\mu\text{g/mL}$), alcançando uma concentração máxima logo nos primeiros 100 segundos, sem posterior aumento significativo (Figura 11). Esta resposta não foi alterada pela adição de TTX. Assim, o resultado sugere a não participação dos canais de Na^+ dependentes de voltagem no aumento de $[Na^+]_i$ induzido por Bc2.

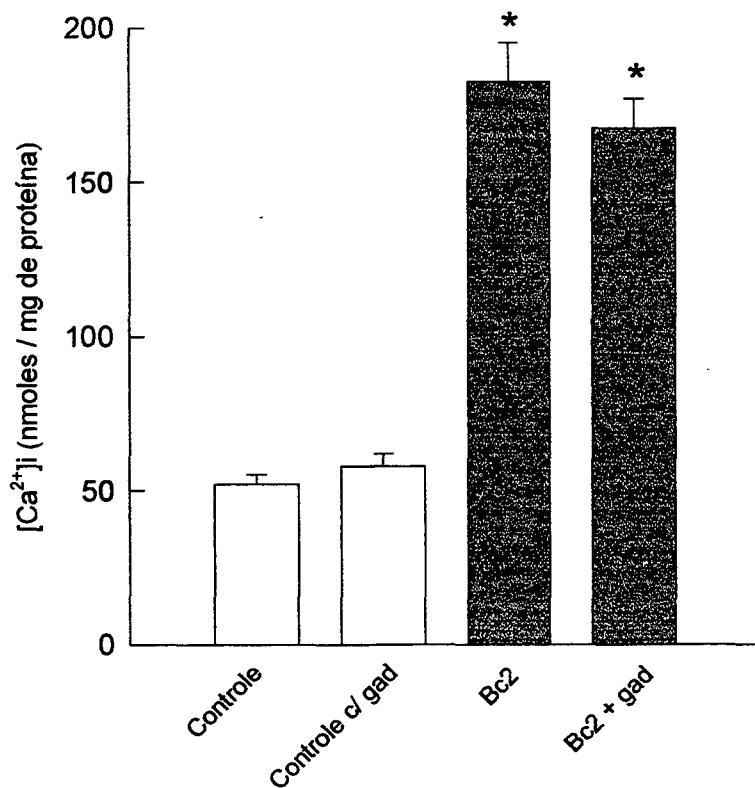


Figura 10. Efeito do gadolínio no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por Bc2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. O registro da concentração de $[Ca^{2+}]_i$ foi realizado como descrito na Figura 8. Gadolínio ($100 \mu M$) foi adicionado no tempo de 60 segundos e Bc2 ($10 \mu g/mL$) ou meio controle foi adicionado 60 segundos após o gadolínio. Os resultados representam a média \pm EPM da quantidade total de $[Ca^{2+}]_i$ de três experimentos. *Resultados estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,01$) por ANOVA de uma via seguida do test de Duncan.

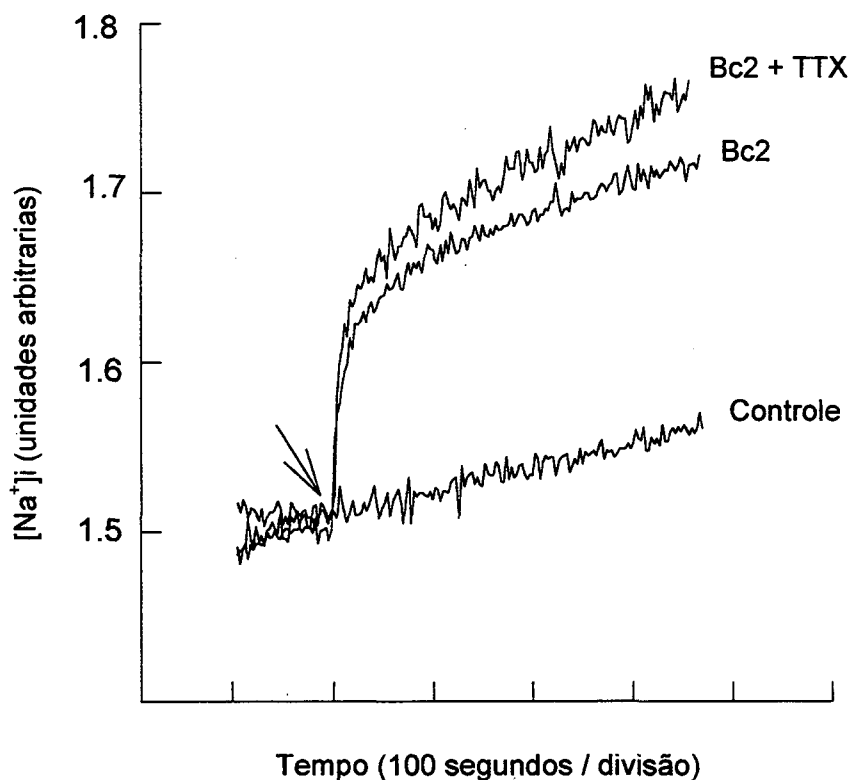


Figura 11. Aumento da concentração citosólica de Na⁺ induzida por Bc2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Sinaptossomas obtidos como descrito em Material e Métodos foram resuspendidas em solução de KRH-colina e incubados por 1 hora a 35°C com SBFI-AM (2 μM). Sinaptossomas marcados com SBFI-AM foram transferidos para uma cubeta num espectrofluorímetro e a emissão fluorimétrica foi registrada durante 630 segundos a 500 nm usando uma excitação de 330/370 nm (emissão a 500 nm e excitação a 330/370 nm). CaCl₂ (1mM) foi adicionado à preparação sinaptossomal aos 30 segundos do início do registro. No tempo de 60 segundos foi adicionado TTX (5 μM) ou meio controle e aos 120 segundos foi adicionado Bc2 (10 μg/mL) ou meio controle. Os resultados representam a média de três experimentos. O aumento total de [Na⁺]_i induzido por Bc2 foi estatisticamente diferente do controle ($p < 0,01$) por ANOVA de uma via seguida do test de Duncan.

4. DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que Bc2, uma fração citolítica isolada da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* provoca a liberação de glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. A atividade citolítica de anêmonas do mar em vários tipos celulares, é bloqueada pela esfingomielina e tem sido proposto que este fosfolípido seria o receptor para a ligação das citolisinas na membrana plasmática (Macek, 1992; Varanda & Finkelstein, 1980; Belmonte et al., 1993). Os resultados mostraram que a pré-incubação de Bc2 com esfingomielina bloqueia totalmente o efeito sobre a liberação de glutamato. Este dado sugere que a atividade presente em Bc2 que provoca a liberação de glutamato é uma citolisina e tem afinidade pela esfingomielina. Deste modo, a liberação de glutamato parece ser mediada por uma citolisina e não por outro componente de Bc2.

A atividade citolítica presente em anêmonas do mar tem sido atribuída a um choque osmótico causado pela formação de poros de aproximadamente 1 nm, formados pela inserção e agregação oligomérica das toxinas em membranas naturais e artificiais (Macek et al., 1994; Tejuca et al., 1996; De los Rios et al., 1998). A liberação de glutamato poderia ser explicada como uma simples consequência da lise sinaptossomal, pois este efeito pode ser observado em eritrócitos, fibroblastos e outras células (Macek, 1992). No entanto, as concentrações utilizadas de Bc2 não provocaram a liberação de LDH, sugerindo que não houve uma ruptura da membrana sinaptossomal. Esta dado é reforçado pelo fato de que KCl foi ainda capaz de induzir liberação de glutamato em sinaptossomas previamente incubados com Bc2. Deste modo, podemos afirmar que Bc2 não provoca lise sinaptossomal e nenhum dano irreversível no sistema de liberação de neurotransmissores. Mesmo sem provocar a lise da membrana, a citolisina poderia estar causando a formação de poros, que permitiriam a saída de glutamato. PEG 1500, é um composto que bloqueia os poros formados pelas citolisinas de anêmonas do mar e inibe a hemólise (Belmonte et al., 1993; Macek et al., 1994; Khoo et al., 1995). Entretanto, Bc2

continou estimulando a liberação de glutamato, mesmo na presença de PEG 1500. Estes dados estão consistentes com os obtidos por Khoo et al. (1995). Estes autores mostraram que citolisinas de anêmonas do mar, ao mesmo tempo que provocaram hemólise, inibiram a captação de GABA e de colina em sinaptossomas. Este efeito nos sinaptossomas não foi acompanhado de liberação de LDH e nem foi inibido por PEG.

A ausência de efeito lítico nos sinaptossomas detectada em nosso trabalho e no de Khoo et al (1995) poderia ser devido à composição da membrana sinaptossomal. A composição das membranas de eritrócitos de diferentes animais resulta em diferentes sensibilidades das citolisinas de anêmonas do mar (Gabilan, 1992). A composição e o tamanho das vesículas lipídicas artificiais afeta a susceptibilidade à lise por citolisinas de anêmonas do mar (Macek et al., 1994). Belmonte et al. (1993) demonstraram que concentrações de equinatoxina que lisavam eritrócitos, não afetaram vesículas lipídicas contendo esfingomiélin. Os autores sugeriram que poderiam existir diferentes aceptores com diferentes afinidades para as citolisinas em distintos tipos celulares. Essa hipótese poderia explicar a ausência de efeito lítico em sinaptossomas expostos a concentrações que provocaram a lise de eritrócitos.

Os canais de Na^+ e K^+ dependentes de voltagem regulam a liberação de neurotransmissores (Janiszewski, 1990; Aldrich, 1993; Harvey et al., 1994). Estes poderiam ser um possível alvo da ação de Bc2, já que é comum a presença de toxinas que interagem nesse tipo de canais nos venenos de anêmonas do mar (Pennington et al., 1996; Castillo et al., 1996; Gendeh et al., 1997; Diochot et al., 1998; Tudor et al., 1998). A toxina ATX-II da anêmona do mar *Anemonia sulcata* provoca a liberação de glutamato através de sua interação com canais de Na^+ dependentes de voltagem, sendo este efeito bloqueado pela TTX (Abita et al., 1977). Porém, a liberação de glutamato induzida por Bc2 não foi bloqueada por TTX. Assim, os canais de Na^+ dependentes de voltagem, parecem não contribuir na liberação de glutamato evocada por Bc2. A 4-aminopiridina (4-AP) e a dendrotoxina induzem a liberação de neurotransmissores pelo bloqueio dos canais de K^+ tipo A (K^+_{A}), sendo este efeito também inibido por TTX (Harvey et al., 1994; Nicholls, 1994; Morales-Villagrán & Tapia, 1996). Isto ocorre

porque 4-AP e dendrotoxina despolarizam a membrana, pois a entrada espontânea de Na^+ através dos canais dependentes de voltagem não é compensada pela saída de K^+ pelos canais K^+_{A} . A TTX bloqueia a entrada espontânea de Na^+ , inibindo o efeito despolarizante de AP-4 ou dendrotoxina. Deste modo, a liberação de glutamato induzida por Bc2 não sendo bloqueada por TTX, descarta também o possível envolvimento dos canais de K^+_{A} na ação de Bc2.

Os resultados também mostraram que Bc2 incrementa a concentração de Ca^{2+} e Na^+ intrasinaptossomal. O gadolínio, um bloqueador inespecífico de canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem (Romano-Silva et al., 1994b) não afetou o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ induzido por Bc2, sugerindo que este efeito não é devido à entrada de Ca^{2+} por esses canais. O aumento de Na^+ evocado por Bc2 também não foi inibido pelo bloqueador de canais Na^+ dependentes de voltagem, TTX, o que descarta a possibilidade de entrada de Na^+ por esses canais. O aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ e de $[\text{Na}^+]_{\text{i}}$ poderia ser atribuído à formação de poros permeáveis a íons na membrana. Vários trabalhos descreveram que as citolisinas de anêmonas do mar formam canais seletivos a cátions na membrana plasmática (Zorec et al., 1990; Belmonte et al., 1993; Macek et al., 1994; Tejuca et al., 1996). Portanto, é bastante provável que o aumento no $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ e no $[\text{Na}^+]_{\text{i}}$ provocado por Bc2, seja devido a um influxo desses íons através de canais iônicos formados *de novo* na membrana plasmática pela citolisina. Michaels (1979) e Zorec et al. (1990) demonstraram que os canais formados pelas citolisinas de anêmona de mar possuem um tempo de vida de poucos segundos, indicando um processo rapidamente reversível. De modo contrário, Varanda & Finkelstein (1980) obtiveram canais que permaneciam abertos, sugerindo um efeito irreversível das citolisinas. Os resultados do nosso trabalho estão de acordo os obtidos por Michaels (1979) e Zorec et al. (1990). A cinética da elevação de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ e $[\text{Na}^+]_{\text{i}}$, mostrou um rápido aumento, seguido de uma fase estacionária e parece indicar a formação de canais que se fecham rapidamente.

A exocitose vesicular, evento chave na liberação de neurotransmissores pode ser desencadeada pelo influxo de Ca^{2+} na zona de ancoragem das vesículas sinápticas (Nicholls & Atwell, 1990; Sudhof, 1995). A evidência de que Bc2 induz aumento no

$[Ca^{2+}]_i$, permite supor que Bc2 induz liberação de glutamato como consequência deste influxo de íons. No entanto, em meio de incubação contendo EGTA e sem cálcio, a liberação de glutamato evocada por Bc2 não foi inibida, ao contrário, foi ainda maior. Assim, o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ causado por Bc2 não pode explicar seu efeito sobre a liberação de glutamato, indicando que esses dois eventos não estariam acoplados. Além disso, o efeito de Bc2 pode ser comparado com a resposta obtida pela ionomicina, que forma poros seletivos para Ca^{2+} na membrana plasmática e desse modo induz a liberação de glutamato (Pocock & Nicholls, 1992). O aumento de $[Ca^{2+}]_i$ induzido pela ionomicina foi bem maior do que o aumento induzido por Bc2, mas esta provocou maior liberação de glutamato do que a ionomicina. É importante salientar que, se Bc2 estivesse ativando algum mecanismo independente de Ca^{2+} extracelular, seria igualmente esperado que houvesse um componente dependente de Ca^{2+} , já que Bc2 aumenta $[Ca^{2+}]_i$ na mesma magnitude que KCl, e este aumento é suficiente para produzir liberação de glutamato. Esta aparente contradição, poderia ser explicada pelo fato de que a despolarização causada por KCl determina um influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem concentrados na zona ativa onde as vesículas sinápticas estão prontas para a exocitose (Nicholls, 1994). No entanto, a entrada de Ca^{2+} provocado por Bc2 parece ocorrer através de canais formados *de novo* em toda a membrana do terminal. Assim, mesmo que o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ provocado por KCl e Bc2 dentro do terminal seja similar, é provável que a concentração do Ca^{2+} na zona ativa provocada por Bc2 seja bastante menor quando comparada com a estimulada por KCl, não sendo suficiente para induzir a exocitose. Esta explicação está de acordo com vários autores, que mostraram a associação entre o sítio do influxo de Ca^{2+} e a liberação de neurotransmissores (Borst & Sakmann, 1996; Prado et al., 1996; Stanley, 1997).

Quanto à potenciação da liberação de glutamato detectada em ausência de Ca^{2+} , parece sugerir que o Ca^{2+} atuaria antagonizando parcialmente o mecanismo pelo qual Bc2 libera glutamato. Estudos anteriores com citolisinas mostraram que o efeito lítico destas é parcialmente inibido na presença de altas concentrações de Ca^{2+} (Bashford et al., 1984; Pasternak et al., 1985; Bashford et al., 1988; Macek et al., 1994). Macek et al.

(1994) sugeriram, sem apresentar evidências diretas do mecanismo, uma possível ligação do Ca^{2+} a um sítio específico da toxina, que inibiria a inserção desta na membrana.

A liberação de glutamato induzido por Bc2 de modo independente de Ca^{2+} e o fato de Bc2 aumentar o $[\text{Na}^+]_i$, poderiam sugerir que este neurotransmissor não seria liberado do “pool” vesicular e sim a partir do “pool” citoplasmático. É conhecido que o incremento na concentração de Na^+ intracelular pode ocasionar a liberação do glutamato citoplasmático por reversão da ação do transportador de glutamato de maneira independente de Ca^{2+} (Nicholls et al., 1987; Levi & Raiteri, 1993). Isto parece não ter ocorrido, devido às seguintes considerações: (1) a liberação de glutamato não foi inibida pelo bloqueador do transportador dihidrokainato. (2) a cinética de liberação de glutamato provocada por Bc2 foi diferente da descrita na literatura por agentes capazes de reverter a ação do transportador de glutamato, como a veratridina e KCl (Nicholls & Sihra, 1986; Sanchez-Prieto et al., 1987; Prado et al., 1996). Enquanto a liberação de glutamato evocada por Bc2 foi rápida, atingindo um “plateau” no primeiro minuto, a liberação independente de Ca^{2+} através do transportador causada por veratridina e por KCl é um processo lento e contínuo (Nicholls & Sihra, 1986; Sanchez-Prieto et al., 1987; Prado et al., 1996).

A liberação de glutamato independente de Ca^{2+} extracelular induzida por Bc2 poderia ser atribuída a um aumento do Ca^{2+} proveniente dos depósitos intracelulares. No entanto, trabalhos anteriores mostraram que o Ca^{2+} proveniente dos reservatórios internos não é eficiente para liberar neurotransmissores, devido ao fato de que este não é liberado na zona ativa (McMahon & Nicholls, 1991). Os resultados mostram que Bc2 aumentou o $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e $[\text{Na}^+]_i$, mas estes eventos não podem explicar o seu efeito na liberação de glutamato.

Portanto, todas as argumentações parecem ser contrárias à simples explicação de que o mecanismo de ação de Bc2 na liberação de glutamato ocorre via formação de poros na membrana plasmática. Trabalhos mais recentes com a equinatoxina II, indicam que algumas atividades farmacológicas não dependem da formação de poros (Suput, 1994) e que provavelmente envolva mecanismos mais complexos dependendo da

membrana alvo. Sem apresentar evidências diretas, este autor sugeriu um mecanismo via proteína G, para explicar a indução de exocitose em granulócitos e trombócitos pela equinatoxina II. Também Khoo et al. (1995) demonstraram que outro mecanismo diferente da formação de poros está envolvido no efeito da equinatoxina e das magnificalisina I e II na ação inibitória sobre a captação de GABA e colina.

Considerando estas afirmações, uma hipótese a ser levantada é que o mecanismo de ação de Bc2 poderia envolver uma ação direta no mecanismo de exocitose. A exocitose das vesículas sinápticas é regulada por interações entre proteínas da membrana plasmática com proteínas das vesículas sinápticas (Sudhof, 1995). Trabalhos anteriores tem mostrado que α -latrotoxina (LTX) uma potente neurotoxina que causa liberação massiva de neurotransmissores se liga a um receptor pré-sináptico acoplado a uma proteína G. Esta interage com a sinaptotagmina e provoca a exocitose das vesículas sinápticas, mesmo em ausência de Ca^{2+} (Rosenthal & Meldolesi, 1989; Petrenko et al., 1991; Surkova, 1994; Capogna et al., 1996; Krasnoperov et al., 1997). Existem semelhanças entre a liberação de liberação de glutamato induzida por Bc2 e a evocada por LTX: 1) LTX tem atividade formadora de poros na membrana plasmática, mas esta não está acoplada à liberação de neurotransmissores (Surkova, 1994); 2) a estimulação da liberação de neurotransmissores é rápida, sendo que a maior parte ocorre durante os primeiros 30 segundos (Rosenthal & Meldolesi, 1989), 3) a resposta induzida por LTX é bastante maior do que a induzida por KCl (Rosenthal & Meldolesi, 1989); 4) a liberação de neurotransmissores é independente de Ca^{2+} extracelular (Capogna et al. 1996; Petrenko et al., 1991). Considerando estas características comuns, pode ser sugerida uma interação de Bc2 diretamente com o mecanismo de exocitose. Outra toxina que também tem atividade formadora de poros, a pardaxina, estimula a liberação de neurotransmissores por uma ação direta sobre a exocitose e não como consequência da entrada de íons (Lazarovici & Lelkes, 1992).

Este é o primeiro trabalho mostrando o efeito de uma citolisina de anêmona do mar sobre a liberação de neurotransmissores. Outros estudos posteriores, incluindo purificação e sequenciamento da toxina, estudos de "binding" e a possível ação direta na

exocitose serão necessários para a elucidação do mecanismo de liberação de glutamato induzida por Bc2. A compreensão deste mecanismo poderia permitir a utilização desta toxina como ferramenta farmacológica nos estudos de transmissão sináptica.

CONCLUSÕES

A fração citolítica Bc2 provoca a liberação sinaptossomal de glutamato de maneira independente de Ca^{2+} extracelular e sem causar lise dos sinaptossomas. A liberação de glutamato parece não pela saída inespecífica de glutamato através de poros na membrana.

Bc2 aumenta a $[\text{Na}^+]_i$ e $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sem a participação de canais de Ca^{2+} ou de Na^+ dependentes de voltagem, provavelmente através da formação de poros na membrana. A liberação de glutamato induzida por Bc2 não pode ser atribuída ao aumento de $[\text{Na}^+]_i$ e $[\text{Ca}^{2+}]_i$, indicando que o mecanismo envolvido nesta ação é independente da atividade formadora de poros. O efeito de Bc2 na liberação de glutamato também parece não envolver canais de Na^+ , nem K^+ dependentes de voltagem.

Este trabalho não fornece evidências definitivas sobre o mecanismo responsável pelo efeito estimulatório de Bc2 na liberação de glutamato. No entanto, uma possível ação direta na exocitose não pode ser descartada.

5. REFERÊNCIAS

- ABITA, J.P.; CHICHEPORTICHE, R.; SCHWEITZ, H. & LADZUNSKI, M. (1977) Effects of neurotoxins (veratridine, sea anemone toxin, tetrodotoxin) on transmitter accumulation and release by nerve terminals in vitro. *Biochemistry* 16, 1838-1844.
- ADAMS, M.E. & SWANSON, G. (1996) *Trends Neurosci. (Neurotoxins Supplement)*. Elsevier, Cambridge.
- ALDRICH, R. (1993) Potassium channels. Advent of a new family. *Nature* 362, 107-108.
- ANEIROS, A.; GARCIA, I.; MARTÍNEZ, J.R.; HARVEY, A.L.; ANDERSON, A.; MARSHALL, D.L.; ENGSTOM, A.; HELLMAN, U. & KARLSSON, E. (1993) A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Budonosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1157, 86-92
- ASHTON, A. C. & DOLLY, J. O. (1997) Microtubules and microfilaments participate in the inhibition of synaptosomal noradrenaline release by tetanus toxin. *J. Neurochem.* 68, 649-658.
- BASHFORD, C.L.; ALDER, G.M.; PATEL, K. & PASTERNAK, C.A. (1984) Common action of certain viruses, toxins, and activated complement: pore formation and its prevention by extracellular Ca^{2+} . *Biosci. Rep.* 4, 797-806.
- BASHFORD, C.L.; MENESTRINA, G.; HENKART, P.A. & PASTERNAK, C.A. (1988) Cell damage by cytolysin. Spontaneous recovery and reversible inhibition by divalent cations. *J. Immunol.* 141, 3965-3974.
- BASUDEV, H.; ROMANO-SILVA, M.A.; BRAMMER, M.J. & CAMPBELL, I.C. (1995) Effects of sodium on PKC translocation; relationship to neurotransmitter release. *Neuroreport* 6, 809-812.
- BARNES, J.M. & HENLEY, J.M. (1992) The molecular biology of excitatory amino acid receptors. *Prog. Neurobiol.* 39, 113-133.
- BELMONTE, G.; PEDERZOLLI, C.; MACEK, P. & MENESTRINA, G. (1993) Pore formation by the sea anemone cytolysin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. *J. Membr. Biol.* 131, 11-22.

- BENZINGER, G.R.; KYLE, J.W.; BLUMENTHAL, K.M. & HANCK, D.A. (1998) A specific interaction between the cardiac sodium channel and site-3 toxin anthopleurin B. *J. Biol. Chem.* 273, 80-84.
- BORST, J.G.G. & SAKMANN B. (1996) Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse. *Nature* 383, 431-434.
- BROWN, J. A. & NIJJAR, M. S. (1995) The release of glutamate and aspartate from rat brain synaptosomes in response to domoic acid (amnesic shellfish toxin) and kainic acid. *Mol. Cell. Biochem.* 151, 49-54.
- CAPOGNA, M., GAHWILER, B. H. & THOMPSON, S.M. (1996). Calcium-independent actions of alpha-latrotoxin on spontaneous and evoked synaptic transmission in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 76, 3149-3158.
- CASTILLO, C.; PIERNAVIEJA, C. & RECIO-PINTO, E. (1996) Anemone toxin unmasks two conductance states in neuronal sodium channels. *Brain Res.* 733, 231-242.
- COOPER, J.R.; BLOOM, F.E. & ROTH, R.H. (1996) Amino acid transmitters. In *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, p. 126-193. Oxford University Press, New York.
- CHANTURYA, A.; SHATURSKIJ, O.I.; LISHKO, V.K.; MONTASTYMAYA, M.M. & KOZLOWSKAYA, E.P. (1990) Sea anemone toxin (*Radianthus macrodactylus*) interaction with bilayer lipid membranes. *Biol. Membr.* 7, 763-769.
- CHOI, D.W.; MAULUCCI-GEDDE, M. & KRIEGSTEIN, A.R. (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7, 357-368.
- DE LOS RIOS, V.; MANCHENO, J.M.; LANIO, M.E.; ONADERRA, M & GAVILANES, J.G. (1998) Mechanism of the leakage induced on lipid model membranes by the hemolytic protein sticholysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Eur. J. Biochem.* 252, 284-289
- DE ROBERTIS, E.; DE IRALDI, A.P.; ARNAIZ, G.R.L. & SALGANICOFF, L. (1962) Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in rat brain, isolation and subcellular distribution of acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* 9, 23-35.
- DIOCHOT, S.; SCHWEITZ, H.; BERESS, L. & LAZDUNSKI, M. (1998) Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. *J. Biol. Chem.* 273, 6744-6749.

DUNKLEY, P.R.; HEATH, J.; HARRISON, S.M.; JARVIE, P.E.; GLENFIELD, P.J. & ROSTAS, J.A.P. (1988) A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res.* 441, 59-71.

ELLIOT, R.C.; KONYA, R.S. & VICKNESHWARA, K. (1986) The isolation of a toxin from the sea anemone, *Stoichactis kenti*. *Toxicon* 24, 117-122.

ERULKAR, S.D. (1994) Chemically mediated synaptic transmission: an overview. In *Basic Neurochemistry*. p. 181-209. Ed. Siegel, G. J., Raven Press, New York.

FRENCH, R.J.; WORLEY, J.F.; BLAUSTEIN, M.B.; ROMINE, W.O.; TAM, K.K. & KRUEGER, B.K. (1986) Gating of batrachotoxin activated sodium channels in lipid bilayers. In *Ion channel reconstitution*. Ed. Miller, C. p. 363-383.

FONNUM, F. (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42, 1-11.

FREEDMAN, S.B.; MILLER, R.J.; MILLER, D.M. & TINDALL, D.R. (1984) Interactions of maitotoxin with voltage-sensitive calcium channels in cultured neuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4582-4585.

GABILAN, N.H. (1992) Purificação parcial de toxinas da anêmona de mar *Budonosoma caissarum* Correa 1964-Estudo das propriedades da atividade hemolítica. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

GALLETIS, P. & NORTON, R.S. (1990) Biochemical and pharmacological studies of the mechanism of action of Tenebrosin-c, a cardiac stimulatory and hemolytic protein from the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Toxicon* 28, 695-706.

GENDEH, G.S.; YOUNG, L.C.; DE MEDEIROS, C.L.C.; JEYASEELAN, K.; HARVEY, A.L. & CHUNG, C.M. (1997) A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning, and functional expression. *Biochemistry* 36, 11461-11471.

GRAY, W.R.; OLIVERA, B.M. & CRUZ, L.J. (1988) Peptide toxins from venomous conus snails. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 665-700.

GRAY, E.G. & WHITTAKER, V.P. (1962) The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopy study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anatomy* 96, 79-88.

GREENGARD, P.; VALTORTA, F.; CZERNIK, J. & BENFENATI, F. (1993) Synaptic vesicle phosphoprotein and regulation of synaptic function. *Science*, 259, 780-785.

- GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M. & TSIEN, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3444.
- HALLIWELL, J.V.; OTHMAN, I.B.; PELCHEN-MATHEUS, A. & OLIVER-DOLLY, J. (1986) Central action of dendrotoxin: selective reduction of a transient K⁺ conductance in hippocampus and binding to localized acceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 493-497.
- HABERMANN, E. (1977) Neurotoxicity of apamin and MCD peptide upon central application. *Naunyn-Schmie. Arch. Pharmacol.* 300, 189-191.
- HARVEY, A.L.; ROWAN, E.G.; VATANPOUR, H.; FATEHI, M.; CASTANEDA, O. & KARLSSON, E. (1994) Potassium channel toxins and transmitter release. *Ann. NY Acad. Sci.* 710, 1-9.
- HERRERO, I.; MIRAS-PORTUGAL, M.T. & SANCHEZ-PRIETO, J. (1992) Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. *Nature* 460, 163-166.
- JANISZEWSKI, L. (1990) The action on the voltage-gated sodium channel. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 42, 581-588.
- JOHANSEN, J. & KLEINHAUS, A.L. (1987) Saxitoxin differentiates between two types of Na⁺-dependent potentials in the Retzius cell of Hirudinid leeches. *J. Exp. Biol.* 131, 351-363.
- KANDEL, E.; SCHWARTZ, J. & JESSEL, T. (1991) *Principles of Neural Science*. Elsevier.
- KANNER, B.I. & SCHULDINER, S. (1987) Mechanism of transport and storage of neurotransmitter. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22, 1-38.
- KHOO, H.E.; LIM, J.P.C. & TAN, C.H. (1995) Effects of sea anemone (*Heteractis magnifica* and *Actinia equina*) on synaptosomal uptake of GABA and choline. *Toxicon* 33, 1365-1371.
- KONGSAMUT, S. & NASCHEN, D.A. (1988) Measurement of the cytosolic sodium ion concentration in rat brain synaptosomes by a fluorescence method. *Biochim. Biophys. Acta* 940, 241-246.

KRASNOPEROV, V.G.; BITTNER, M.A.; BEAVIS, R.; KUANG, Y.; SALNIKOW, K.V.; CHEPURNY, O.G.; LITTLE, A.R.; PLOTNIKOV, A.N.; WU, D.; HOLZ, R.W. & PETRENKO, A.G. (1997) α -Latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor. *Neuron* 18, 925-937.

LAZAROVICI, P. & LELKES, P.I. (1992) Pardaxin induces exocytosis in bovine adrenal medullary chromaffin cells independent of calcium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, 1317-1326.

LEVI, G. & RAITERI, M. (1993) Carrier-mediated release of neurotransmitter. *Trends Neurosci.* 16, 415-419.

LEVI, G.; GALLO, V. & RAITERI, M. (1980) A reevaluation of veratridine as a tool for studying the depolarization-induced release of neurotransmitters from nerve endings. *Neurochem. Res.* 5, 281-295.

LYNCH, M.A. & VOSS, K.L. (1990) Arachidonic acid increase inositol phospholipid metabolism and glutamate release in synaptosomes prepared from hippocampal tissue. *J. Neurochem.* 55, 215-221.

LODGE, D. & SCHOEPP, D.D. (1993) Excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci. Receptor nomenclature supplement* 14, 20-25.

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, AL. & RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

MACEK, P. (1992) Polypeptide cytolytic toxins from the sea anemones (*Actinaria*). *FEMS Microbiol. Immunol.* 105, 121-130.

MACEK, P.; BELMONTE, G.; PEDERZOLLI, C. & MENESTRINA, G. (1994) Mechanism of action of equinatoxin, a cytolytic from the sea anemone *Actinia equina* L. belonging to the family of actinoporins. *Toxicology* 87, 205-227.

MALPEZZI, E.L.A. & FREITAS, J.C. (1991) Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 24, 1245-1249.

MALPEZZI, E.L.A.; FREITAS, J.C.; MURAMOTO, K. & KAMIJA, H. (1993) Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* 31, 853-864.

MANEV, H., FAVARON, M., GUIDOTTI, A. & COSTA, E. (1989) Delayed increase of Ca^{2+} influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol. Pharmacol.* 36, 106-112.

- MEVES, H.; SIMMARD, J.M. & WATT, D.D. (1986) Interactions of scorpion toxin with the sodium channels. *Ann. NY Acad. Sci.* 479, 113-132.
- McCLURE, W.O., ABBOTT, B.C., BAXTER, D.E.; HSIAO, T.H.; SATIN, L.S.; SIGER, A. & YOSHINO, J.E. (1980) Leptinotarsin: a presynaptic neurotoxin that stimulates release of acetylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1219-1223.
- McMAHON, H.T. & NICHOLLS, D.G. (1991) Transmitter glutamate release from isolated nerve terminals, evidence for biphasic release and triggering by localized Ca^{2+} . *J. Neurochem.* 56, 86-94.
- MICHAELS, D.W. (1979) Membrane damage by a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*. *Biochim. Biophys. Acta* 555, 67-78.
- MINAGUAWA, S.; ISHIDA, M.; SHIMAKURA, K.; NAGASHIMA, Y. & SHIOMI, K. (1997) Isolation and amino acid sequence of two Kunitz-type protease inhibitors from the sea anemone *Anthopleura* aff. *xanthogrammica*. *Comp. Biochem. Physiol. B. (Biochem. Mol. Biol.)* 118, 381-386.
- MONYER, H.; SPRENGEL, R.; SCHOEPFER, R.; HERB, A.; HIGUCHI, M.; LOMELI, H.; BURNASHEV, N.; SAKMANN, B. & SEEBURG, P.H. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256, 1217-1221.
- MORALES-VILLAGRÁN, A. & TAPIA, R. (1996) Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum *in vivo*. *Neurochem. Int.* 28, 35-40.
- MUNIZ, D. (1998) Estudo da atividade biológica do extrato bruto e da fração hemolítica da anêmona de mar *Budonosoma caissarum*. Dissertação de Mestrado em Neurociências e Comportamento. Universidade Federal de Santa Catarina.
- NAKAMURA, Y.; NAKAMIJA, S. & GRUNFEST, H. (1965) The action of tetrodotoxin on electrogenic components of squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* 48, 985-996.
- NAKANISHI, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implication for brain function. *Science* 258, 597-603.
- NICHOLLS, D.G. & SIHRA, T.S. (1986) Synaptosomes possess an exocytotic pool of glutamate. *Nature* 321, 772-773.
- NICHOLLS, D.G.; SIHRA, T.S. & SANCHEZ-PRIETO, J. (1987) Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.* 49, 50-57.

NICHOLLS, D.G. (1989) Release of glutamate, aspartate, and γ -aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 52, 331-341.

NICHOLLS, D.G. & ATTWELL, D. (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 462-468.

NICHOLLS, D.G. (1994) *Proteins, Transmitter and Synapses*. Blackwell Scientific Publications, Cambridge.

NORTON, R.S. (1991) Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* 29, 1051-1084.

PASTERNAK, C.A.; ALDER, G.M.; BASHFORD, C.L.; BUCKLEY, C.L.; MICKLEM, K.J. & PATEL, K. (1985) Cell damage by viruses, toxins, and complement: common features of pore-formation and its inhibition by Ca^{2+} . *Biochem. Soc. Symp.* 50, 247-255.

PENNINGTON, M.W.; MAHNIR, V.M.; KHAYTIN, I.; ZAYDENBERG, I.; BYRNES, M.E. & KEM, W.R. (1996) An essential binding surface for ShK toxin interaction with rat brain potassium channels. *Biochemistry* 35, 16407-16411.

PETERSON, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.

PETRENKO, A.G.; PERIN, M.S.; DAVLETOV, B.A.; USHKARYOV, Y.A.; GEPPERT, M. & SUDHOF, T.C. (1991) Binding of synaptotagmin to the α -latrotoxin receptor implicates both in synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 353, 65-68.

POCOCK, J.M. & NICHOLLS, D.G. (1992) A toxin (Aga-GI) from the venom of the spider *Agelenopsis aperta* inhibits the mammalian presynaptic Ca^{2+} channel coupled to glutamate exocytosis. *Eur. J. Pharmacol.* 226, 343-350.

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

PUNGERCAR, J.; ANDERLUH, G.; MACEK, P.; FRANC, G. & STRUKELJ, B. (1997) Sequence analysis of the cDNA encoding the precursor of equinatoxin V, a newly discovered hemolysin from the sea anemone *Actinia equina*. *Biochim. Biophys. Acta* 1341, 105-107.

RODRIGUEZ, F.J.; LLUCH, M.; DOT, J.; BLANCO, I. & RODRIGUEZ-ALVAREZ, J. (1997) Histamine modulation of glutamate release from hippocampal synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* 323, 283-286.

ROMANO-SILVA, M.A.; GOMEZ, M.V. & BRAMMER, M.J. (1994a) Modulation of Ca^{2+} -stimulated glutamate release from synaptosomes by Na^+ entry through tetrodotoxin-sensitive channels. *Biochem. J.* 296, 313-319.

ROMANO-SILVA, M.A.; GOMEZ, M.V. & BRAMMER, M.J. (1994b) The use of gadolinium to investigate the relationship between Ca^{2+} influx and glutamate release in rat cerebrocortical synaptosomes. *Neurosci. Lett.* 178, 155-158.

ROSENTHAL, L. & MELDOLESI, J. (1989) α -latrotoxin and related toxins. *Pharmac. Ther.*, 42 115-134.

SALGADO, V.L. & KEM, W.R. (1992) Actions of three structurally distinct sea anemone toxins on crustacean and insect sodium channels. *Toxicon* 30, 1365-1381.

SALINAS, E.M.; CEBADA, J.; VALDES, A., GARATEIX, A., ANEIROS, A. & ALVAREZ, J.L. (1997) Effects of a toxin from the mucus of the caribbean sea anemone (*Budonosoma granulifera*) on the ionic currents of single ventricular mammalian cardiomyocytes. *Toxicon* 35, 1699-1709.

SANCHEZ-PRIETO, J.; SIHRA, T.S. & NICHOLLS, D.G. (1987) Characterization of the exocytotic release of glutamate from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes. *J. Neurochem.* 49, 58-64.

SCHIAVO, G.; ROSSETTO, O.; BENFENATI, F.; POULAIN, B. & MONTECUCCO, C. (1994) Tetanus and botulin neurotoxins are zinc proteases specific for components of the neuroexocytosis apparatus. *Ann. NY Acad. Sci.* 710, 65-75.

SCHOEPP, D.D., BOCKAERT, J. & SLADDECZEK, F. (1990) Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 508-518.

SHOJI-KASAI, Y.; YOSHIDA, A.; OGURA, A.; KUWAHARA, R.; GRASSO, A. & TAKAHASHI, M. (1994) Synaptotagmin I is essential for Ca^{2+} independent release of neurotransmitter induced by α -latrotoxin. *FEBS Letters.* 353, 315-318.

STANLEY, E.F. (1997) The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face. *Trends Neurosci.* 20, 404-409.

SUDHOF, T.C. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645-653.

- SUPUT, D. (1994) Equinatoxin II and exocytosis. *Ann. NY Acad. Sci.* 710, 30-37.
- SURKOVA, I. (1994) Can exocytosis induced by α -latrotoxin be explained solely by its channel-forming activity? *Ann. NY Acad. Sci.* 710, 49-64.
- TEJUCA, M.; SERRA, M.D.; FERRERAS, M.; LANIO, M.E. & MENESTRINA, G. (1996) Mechanism of membrane permeabilization by Sticholysin, a cytolysin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 35, 14947-14957.
- TENG, C.M.; LEE, L.G.; LEE, C.Y. & FERLAN, I. (1988) Platelet aggregation induced by equinatoxin. *Thromb. Res.* 52, 401-411.
- TUDOR, J.E.; PENNINGTON, M.W. & NORTON, R.S. (1998) Ionisation behaviour and solution properties of the potassium-channel blocker ShK toxin. *Eur. J. Biochem.* 251, 133-141.
- TURK, T. (1991) Cytolytic toxins from sea anemones. *J. Toxicol. Toxin Reviews* 10, 223-262.
- TURNER, T.J. & DUNLAP, K. (1995) Pharmacological characterization of presynaptic calcium channels using subsecond biochemical measurements of synaptosomal neurosecretion. *Neuropharmacology.* 34, 1469-1478
- VARANDA, W. & FILKENSTEIN, A. (1980) Ion and nonelectrolyte permeability properties of channels formed in planar lipid bilayer membranes by the cytolytic toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*. *J. Membr. Biol.* 55, 203-211.
- ZOREC, R.; TESTER, M.; MACEK, P. & MASON, W.T. (1990) Cytotoxicity of equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina* involves ion channel formation and increase in intracellular calcium activity. *J. Membr. Biol.* 118, 243-249.