

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NA LIBERAÇÃO DE
GLUTAMATO INDUZIDA POR CITOLISINAS DE ANÊMONAS DO MAR**

ROSSANA COLLA SOLETTI

Florianópolis, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NA LIBERAÇÃO DE
GLUTAMATO INDUZIDA POR CITOLISINAS DE ANÊMONAS DO MAR**

ROSSANA COLLA SOLETTI

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Nelson H. Gabilan

Florianópolis, 2006

Este trabalho é dedicado àqueles que passaram pelo meu caminho durante esses dois anos, temperando meu dia-a-dia com amizade, alegria e conhecimento. Aos professores, amigos e colegas que deixaram sua marca em minha trajetória, servindo de exemplo para guiar minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Nelson Horacio Gabilan, pelo apoio, confiança, orientação, dedicação incansável e pelo grande incentivo em mostrar-me o caminho a seguir.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Neurociências, pelo auxílio com o trabalho e pelos ensinamentos prestados nas disciplinas.

Aos colegas da turma de Pós-graduação em Neurociências 2004 e 2005, pelo coleguismo e amizade.

Aos amigos dos laboratórios de Neuroquímica 2 e 3 e Neurobiologia da Depressão, que tornaram o dia-a-dia no laboratório mais agradável.

Aos amigos Helena Decker e Tiago Góss dos Santos, que com seu companheirismo tornaram o trabalho no Rio de Janeiro ainda mais prazeroso e divertido.

Ao professor Vivaldo Moura Neto e a todos do Laboratório de Morfologia Celular da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por me indicarem novos caminhos.

Ao pessoal da Universidad Autónoma de Madrid, pela acolhida e ajuda nos experimentos.

Às alunas Andréa D. E. Zomkowski, Cristiane Felisbino Silva, Daniela G. de Souza e Rúbia C. de Almeida, pela ajuda durante os experimentos, e pelo jeito cativante com que conquistaram minha amizade para sempre.

Aos professores Hernán Terenzi e Javier Vernal, pela orientação e acolhida em seu laboratório.

À equipe do Professor João B. Calixto, por disponibilizarem seus equipamentos.

Ao Nivaldo, secretário da Pós-Graduação, sempre disposto a ajudar.

À minha família e a Tiago O. Vieira, pelo incentivo e apoio incondicional à realização dos meus sonhos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, **iii**

RESUMO, **iv**

ABSTRACT, **v**

1. INTRODUÇÃO, 1

1.1. Sistema nervoso central e preparações neurais, 2

1.2. Liberação de neurotransmissores, 3

1.3. Liberação de neurotransmissores por exocitose, 4

1.4. Vias de sinalização celular envolvidas na liberação de neurotransmissores, 7

1.5. Citolisinas de anêmonas do mar, 9

2. JUSTIFICATIVA, 13

3. OBJETIVOS, 14

3.1. Objetivo geral, 14

3.2. Objetivos específicos, 14

4. MATERIAIS E MÉTODOS, 15

4.1. Reagentes, 15

4.2. Animais, 15

4.3. Isolamento da toxina Bc2, 15

4.4. Isolamento da equinatoxina recombinante, 17

4.5. Ensaio de atividade hemolítica, 17

4.6. Liberação de glutamato, 18

4.6.1. Preparação dos sinaptossomas, 18

4.6.2. Ensaio de liberação de L-[³H]glutamato, 19

4.7. Tratamento dos sinaptossomas, 19

4.8. Dosagem de proteínas, 21

4.9. Análise Estatística dos Resultados, 21

5. RESULTADOS, 22

5.1.	Isolamento da toxina marinha Bc2, 22
5.2.	Efeito da concentração de equinatoxina e da toxina Bc2 na liberação de glutamato sinaptossomal, 25
5.3.	Liberação de glutamato sinaptossomal induzida por ionomicina e latrotoxina, 29
5.4.	Cinética da liberação de glutamato sinaptossomal induzida por equinatoxina, toxina Bc2, ionomicina e latrotoxina, 29
5.5.	Efeito do pré-tratamento com equinatoxina ou toxina Bc2 na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por KCl, 31
5.6.	Envolvimento de proteínas quinases na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por equinatoxina e toxina Bc2, 33
5.8.1.	Envolvimento da MAPK/ERK, 33
5.8.2.	Envolvimento da PKC, 35
5.8.3.	Envolvimento da PKA, 36
5.8.4.	Envolvimento da PI3K, 40
5.8.5.	Envolvimento da CaMKII, 40
5.9.	Efeito da bafilomicina na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por equinatoxina e toxina Bc2, 43
5.10.	Efeito da toxina tetânica na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por , equinatoxina e toxina Bc2, 45
6.	DISCUSSÃO, 47
7.	CONCLUSÕES, 58
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, 59

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP – Adenosina 5'-monofosfato

ATP – Adenosina 5'-trifosfato

ATPase - Adenosina 5'-trifosfato hidrolase

Bc2 - Toxina Bc2

BoNT - Toxina botulinica

Ca²⁺ - Cálcio

CaMKII – Proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina

cAMP- AMP cíclico

BAF – Bafilomicina A₁

EqTx-II - Equinatoxina-II

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

E.P.M. – Erro padrão da Média

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

L-[³H]GLU – L-Glutamato tritiado

GLU - Glutamato

HBSS – Solução salina tamponada por HEPES

HEPES – Ácido hidroxietil piperazina hetanosulfônico

IONO - Ionomicina

Ltx - Latrotoxina

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos

NSF - Proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PKA - Proteína quinase ativada por cAMP

PKC - Proteína quinase dependente de cálcio e fosfolípídeo C

SNAP – Proteína associada ao sinaptossoma

TeTx - Toxina tetânica

RESUMO

Citolisinas animais têm sido ferramentas fundamentais para a análise dos mecanismos envolvidos no controle da liberação de neurotransmissores em sinapses. Os objetivos deste trabalho foram: i) verificar o efeito da equinatoxina-II (EqTx-II) recombinante na liberação de glutamato de sinaptossomas corticais de camundongos; ii) investigar as vias de sinalização celular envolvidas na liberação de glutamato induzida pela EqTx-II e toxina Bc2 (isolada da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum*); iii) verificar se a liberação de glutamato induzido pela EqTx-II e toxina Bc2 é citosólica ou exocitótica. Sinaptossomas corticais de camundongos foram obtidos utilizando um gradiente de Percoll e incubados com L- ^3H glutamato. Os sinaptossomas foram incubados na presença de tampão HBSS, KCl (33 mM), EqTx-II (0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$), toxina Bc2 (0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$), ionomicina (Iono, 1, 3 e 10 μM) e latrotoxina (Ltx, 0,1; 0,3 e 1 nM). A liberação de ^3H -glutamato foi determinada num cintilador líquido. EqTx-II, toxina Bc2, iono e Ltx induziram uma liberação de glutamato de modo dependente da concentração e do tempo de incubação. O pré-tratados com EqTx-II ou toxina Bc2, não afetou a liberação exocitótica de glutamato induzida por despolarização com KCl. PD98059 (inibidor da via MAPK/ERK) diminuiu a liberação de glutamato induzida por EqTx-II, toxina Bc2, iono (1 μM) e Ltx (0,1 nM). H89 (inibidor de PKA), estaurosporina (inibidor inespecífico de PKC) e KN-62 (inibidor de CaMKII) bloquearam a liberação de glutamato provocada por KCl, EqTx-II e toxina Bc2. Entretanto, queleritrina (inibidor da PKC) e LY294002 (inibidor da PI3K) não afetaram a liberação de glutamato. O pré-tratamento com bafilomicina (BAF) e toxina tetânica (TeTx) não afetaram a liberação de glutamato induzida pela incubação dos sinaptossomas durante 1 minuto com EqTx-II ou toxina Bc2. Contudo, em sinaptossomas incubados durante 5 minutos com as citolisinas, a liberação de glutamato foi reduzida por BAF e TeTx. Os resultados deste trabalho sugerem que a liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela EqTx-II e toxina Bc2 envolve as vias MAPK/ERK, PKC e CaMKII. EqTx-II e toxina Bc2 induzem a liberação de glutamato sinaptossomal citosólica ou vesicular, de modo dependente do tempo de incubação.

ABSTRACT

Natural cytolysins have been fundamental tools to analyze the basic mechanisms involved in the control of neurotransmitter release on synapses. The aims of this study were: i) investigate if equinatoxin-II (EqTx-II, cloned and expressed in *E. coli*) evokes synaptosomal glutamate release; ii) analyze the effect of protein kinase inhibitors and inhibitors of vesicular exocytosis on the synaptosomal glutamate release induced by EqTx-II (1 $\mu\text{g/ml}$) and toxin Bc2 (1 $\mu\text{g/ml}$, isolated from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*). Mice cortical synaptosomes were obtained using a percoll gradient and loaded with [^3H]glutamate. Synaptosomes were incubated during different times with HBSS buffer (Basal), KCl (33 mM), EqTx-II (0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$), toxin Bc2 (0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$), ionomycin (iono, 1, 3 and 10 μM) and latrotoxin (ltx, 0.1, 0.3 and 1 nM). The release of [^3H -glutamate] was measured using a liquid scintillator. EqTx-II, toxin Bc2, iono and ltx induced a time- and concentration-synaptosomal glutamate release. A depolarization with KCl evoked glutamate release, even after a synaptosomal pretreatment with EqTx-II (1 $\mu\text{g/ml}$) or toxin Bc2 (1 $\mu\text{g/ml}$). PD98059 (a MAPK/ERK inhibitor) reduced the glutamate release evoked by EqTx-II, toxin Bc2, iono (1 μM) and ltx (0.1 nM). Staurosporine (a broad spectrum PKC inhibitor) decreased the glutamate release induced by KCl, EqTx-II and toxin Bc2. However, chelitrine (a specific PKC inhibitor) did not affect the glutamate released by these cytolysins. H89 (a PKA inhibitor) and KN-62 (a CaMKII inhibitor) blocked the glutamate release evoked by KCl, EqTx-II and toxin Bc2. LY294002 (a PI3K inhibitor) did not alter the glutamate release induced by KCl and by these cytolysins. The inhibitors of vesicular exocytosis bafilomycin (BAF) and tetanus toxin (TeTx) decreased the glutamate release induced by 1 min. of incubation with KCl, but has no effect on the release evoked by EqTx-II or toxin Bc2. However, when the synaptosomes were incubated during 5 min. with KCl and these cytolysins, the glutamate release was decreased by BAF and TeTx. In conclusion, the results of this work suggest that the glutamate release induced by EqTx-II and toxin Bc2 involves the MAPK/ERK, PKC and CaMKII protein. Moreover, the glutamate released by these cytolysins (1 min. stimulus) seems to be cytosolic. Nevertheless, the release induced by 5 min. seems to mobilize vesicular glutamate and involves an exocytotic component.

1. INTRODUÇÃO

As toxinas de origem animal, vegetal e microbiana têm sido ferramentas fundamentais para analisar os mecanismos celulares envolvidos em processos fisiológicos e farmacológicos, como por exemplo, a liberação de neurotransmissores (exocitose). As citolisinas são toxinas proteicas comumente encontradas em vegetais, microrganismos e animais, como as anêmonas do mar (Anderluh & Macek, 2002; Parker & Feil, 2005). Estas proteínas interagem com fosfolipídeos de membrana para formar poros, pelos quais pode ocorrer um influxo de Ca^{2+} , um importante mensageiro intracelular (Belmonte et al., 1993; Tejuca et al., 2001).

O avanço no conhecimento acerca da utilização de toxinas marinhas na neurotransmissão pode permitir a utilização destas no estudo da exocitose e de outros processos no sistema nervoso. Assim como já foi demonstrado para outras proteínas formadoras de poros (Panchal et al., 2002), novas aplicações biológicas das citolisinas de anêmonas poderão ser viabilizadas, desde que o seu mecanismo de ação seja bem conhecido.

A pesquisa sobre os efeitos e mecanismos de ação de toxinas marinhas desperta interesse, pois levanta a possibilidade do uso destas citolisinas como ferramentas farmacológicas para o estudo dos processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no sistema nervoso central.

1.1. SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PREPARAÇÕES NEURAIS

O sistema nervoso central (SNC) é constituído pela medula espinhal e pelo encéfalo. O encéfalo localiza-se dentro da caixa craniana e é constituído por três órgãos: cérebro, cerebelo e bulbo (Zigmond et al., 1999). A sutileza e complexidade do cérebro, aliada à habilidade de se alterar em resposta a novas informações é suportada por um grande

número de mecanismos de comunicação célula-célula que engloba níveis anatômicos, conexões intrincadas e plásticas, circuitos neuronais de larga escala e o comando global dos sistemas regulatórios. A nível químico, o sistema nervoso central utiliza um grande número de neurotransmissores com diversos mecanismos para decodificar o conteúdo de informações (Hyman, 2005).

Várias preparações neurais foram desenvolvidas como modelos para o estudo do sistema nervoso central. Os sinaptossomas são terminais nervosos isolados que contém as principais organelas celulares (de Robertis et al., 1962; Whittaker et al., 1964). As mitocôndrias estão localizadas em um citoplasma fisiológico, com vias metabólicas e suprimento de ATP, contando ainda com toda a maquinária necessária para a exocitose de vesículas sinápticas (Nicholls, 2003). Os terminais nervosos isolados são modelos simples para a investigação do mecanismo de ação e das conseqüências funcionais de neurotoxinas que afetam canais iônicos e exocitose (Nicholls et al., 1985; Harvey, 1997).

Por serem a preparação neural mais simples que possui toda a maquinária de exocitose vesicular, os sinaptossomas têm sido utilizados no estudo dos mecanismos moleculares da neurotransmissão (Verhage et al., 1991; Cousin et al., 2000). Outra aplicação importante para as preparações de terminais nervosos isolados é o estudo da liberação de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. O glutamato é liberado de vesículas nos terminais pré-sinápticos por um mecanismo dependente de Ca^{2+} que envolve canais de Ca^{2+} -dependentes de voltagem do tipo N e P/Q (Birnbaumer et al. 1994). A concentração de glutamato dentro das vesículas é aproximadamente 100 mmol/L. A liberação de uma única vesícula produz um potencial excitatório pós-sináptico (EPSP). Os terminais nervosos glutamatérgicos são modelos importantes para o estudo de substâncias com potencial para a intervenção farmacológica em uma ampla relação de doenças neurológicas e psiquiátricas (Meldrum, 2000).

1.2. LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES

A idéia da existência de uma comunicação entre neurônios e células-alvo específicas, chamada sinapse, surgiu de Santiago Ramon y Cajal há mais de um século (Ramon y Cajal, 1891). Otto Loewi descobriu o primeiro neurotransmissor em 1926, quando demonstrou que a acetilcolina carregava um sinal químico do nervo vago para o coração que diminuía o ritmo cardíaco. A partir desta época, mais de uma centena de substâncias e um grande número de receptores têm sido implicados na neurotransmissão (Valenstein et al., 2002). Para que ocorra a neurotransmissão, a mensagem química é recebida pelo neurônio pós-sináptico e é convertida em um sinal elétrico e bioquímico dentro dos dendritos. Esta informação elétrica é integrada nos dendritos e corpo celular, e se alcançar um limiar adequado de despolarização, a informação elétrica será transmitida ao axônio do neurônio receptor, para o seu terminal pré-sináptico. No terminal pré-sináptico, o ciclo da transmissão sináptica é renovado quando o sinal elétrico do potencial de ação é convertido em um novo sinal químico. Estes sinais permitem que informações bioquímicas complexas, excitatórias ou inibitórias sejam passadas entre as células (Nestler et al., 2003).

1.3. LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES POR EXOCITOSE

A exocitose ocorre seletivamente em "zonas ativas", uma região especializada da membrana celular. A transmissão sináptica é iniciada quando um potencial de ação induz a liberação de neurotransmissores de um terminal nervoso pré-sináptico. Um potencial de ação abre canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, e o aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]_c$) transitória resultante estimula a exocitose de vesículas sinápticas ancoradas à membrana (Sudhof, 1995). O envolvimento do Ca^{2+} na formação, no estoque e na fusão das vesículas é complexo, e não é completamente entendido (Stojilkovic, 2005). Este papel relevante das variações de Ca^{2+} em controlar a liberação de neurotransmissores tem sido esclarecido, em parte, através da utilização de ionóforos seletivos para cátions e de

toxinas formadoras de poros (citolisinas) para induzir a exocitose (Rosenthal & Meldolesi, 1989; Davletov et al., 1998).

Em várias sinapses, a liberação é estimulada pelo influxo de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} do tipo P/Q ou do tipo N, enquanto que os canais do tipo R ou L estão raramente envolvidos (Dietrich et al., 2003). O influxo de Ca^{2+} tem pelo menos dois componentes de liberação, que são mecanisticamente distintos: uma fase rápida, sincrônica, que é induzida rapidamente, em menos de 50 μs após o aumento do Ca^{2+} (Sabatini & Regehr, 1996), e uma fase lenta, que continua por mais de 1 s com um aumento no nível da liberação espontânea, após o potencial de ação (Barrett & Stevens, 1972; Atluri & Regehr, 1998). Ambos os componentes de liberação são dependentes de Ca^{2+} , mas respondem diferentemente após estimulações repetitivas (Hagler & Goda, 2001).

O conhecimento acerca dos mecanismos moleculares de fusão das vesículas na membrana plasmática avançou muito na última década, através da combinação de ensaios *in vitro*, manipulações genéticas e da elucidação dos mecanismos de ação pelo qual as neurotoxinas clostridiais (neurotoxinas botulínica e tetânica) bloqueiam a exocitose em neurônios. Estes dados convergiram para a teoria SNARE de fusão membranal (Sollner et al., 1993; Rothmann, 1994; Sollner, 2003), a qual tem sido seguida pela maioria dos estudos recentes. De acordo com este modelo, a exocitose sináptica é mediada por três proteínas SNAREs (receptores solúveis de ligação à N-etilmaleimida): sinaptobrevina (proteína de membrana associada à vesícula, também referida como VAMP) nas vesículas sinápticas, syntaxina 1 e SNAP-25 (proteína associada ao sinaptossoma) na membrana plasmática pré-sináptica. Estas proteínas formam um emaranhado paralelo de quatro hélices, com uma estrutura terciária bastante termoestável (Galli & Haucke, 2005). Outras proteínas incluem a NSF (proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida) ATPase e sua adaptadora SNAP (proteína de ancoramento ao NSF solúvel), a classe Rab de pequenas proteínas G e seus efetores, a família sinaptotagmina e a família nsec1 (homólogo mamífero da proteína sec1 de levedura, também referida como munc18). Vários outros fatores que interagem com SNAREs, como as complexinas, VAP33 (proteína de membrana associada a vesícula/

proteína ligadora de sinaptobrevina) e sinaptofisina têm sido caracterizados (Dulubova et al., 1999; Rizo & Sudhof, 2002; Gallwitz & Janh et al., 2003).

Para a fusão das vesículas sinápticas, inicialmente a syntaxina está ligada a munc18 e a sinaptobrevina está provavelmente ligada à sinaptofisina. Ambas, syntaxina e sinaptobrevina são proteínas com um domínio transmembrana. No estágio de ancoragem, o complexo syntaxina-munc18 é dissociado talvez assistido por uma proteína efetora Rab. A interação dos peptídeos amino-terminais da syntaxina com os homólogos sec1/munc18 ocorre no retículo endoplasmático, no complexo de Golgi e em endossomos. A sinaptobrevina liga-se, então, à syntaxina e SNAP-25. No estágio de preparação (priming), o sistema se torna apto a sofrer fusão desde que haja um aumento na concentração de Ca^{2+} , possivelmente envolvendo uma proteína ligadora de Ca^{2+} tal como sinaptotagmina. No estágio de reciclagem, a SNAP e NSF se ligam ao complexo SNARE, e este complexo é então dissociado após hidrólise de ATP (Rizo & Sudhof, 2002; Sudhof et al., 2003; Stojkovic et al., 2005; Galli and Haucke, 2005).

Várias das proteínas envolvidas no ciclo das vesículas sinápticas e que participam da exocitose podem ser "alvo" de toxinas (Montecucco & Schiavo, 2005). Sete sorotipos distintos de toxinas botulínicas (BoNTs, A-G) têm sido identificados através do estudo do botulismo em humanos (BoNT/A, /B, /E e /F), aves (BoNT/C) e bovinos (BoNT/D), ou de bactérias isoladas do solo (BoNT/G) (Herreros & Schiavo., 2002). Estas bactérias produzem neurotoxinas clostridiais juntamente com muitas outras toxinas proteicas, como a toxina C2-ADP-ribosiltransferase, que afeta G-actina, e a exoenzima C3, que ADP-ribosila a proteína Rho (Aktories, 1997). Em mamíferos, VAMP-1 e -2 são clivadas por toxina tetânica (TeTx), BoNT/B, /D, /F e /G, SNAP-25 por BoNT/A, /C e /E, e syntaxina somente por BoNT/C. Muitos homólogos destas proteínas (celubrevina, SNAP-23) podem ser clivados em diferentes níveis (Montecucco & Schiavo, 2005). Os mecanismos moleculares utilizados pelas neurotoxinas clostridiais podem ser classificados em três categorias: BoNT/A bloqueia o passo "postdocking priming"; BoNT/D/E/ e F previne a formação do complexo de fusão; BoNT/B, /C, /G, e TeTx desacoplam partículas de fusão da vesícula ou da membrana

plasmática, alterando a sincronização do complexo SNARE durante a fusão (Humeau et al., 2000).

Uma melhor compreensão dos mecanismos de ação das toxinas clostridiais nas células neuronais têm permitido diversas aplicações terapêuticas para as toxinas botulínicas, como nos casos de hiperhidrose, distonia muscular, incontinência urinária, hipersalivação e em um amplo número de casos na medicina estética (Rosseto et al., 2001; Balikian & Zimble, 2005; Brashear, 2005). A utilização das toxinas tetânica e botulínica tem sido útil para fornecer informações a respeito do tipo de liberação de glutamato sinaptossomal (exocitótica ou não).

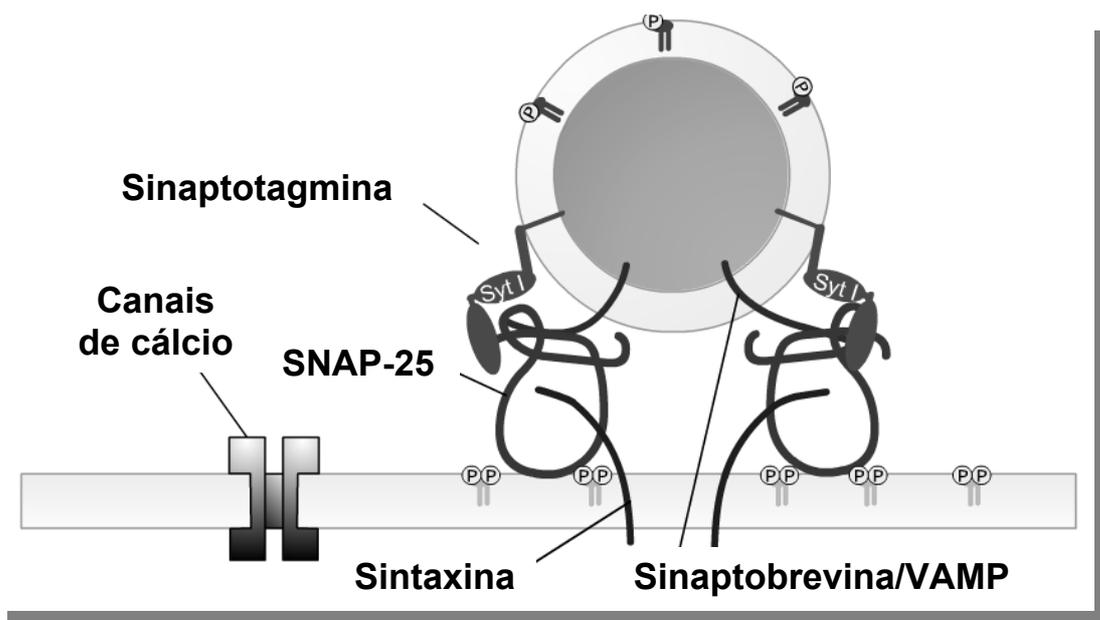


Figura 1. Representação esquemática da exocitose vesicular. Estão demonstradas algumas proteínas vesiculares ou membranares envolvidas na liberação exocitótica de neurotransmissores. Adaptado de Galli & Haucke, 2005.

1.4. VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NA LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES

A neurotransmissão é regulada positiva ou negativamente de múltiplas maneiras, e acredita-se que esta regulação seja um dos importantes mecanismos de plasticidade sináptica, que leva ao aprendizado e memória. Diferentes proteínas quinases têm sido implicadas na regulação pré-sináptica em vários tipos de preparações neuronais, contudo, os exatos mecanismos ainda são pouco compreendidos (Greengard et al., 1993; Takahashi et al., 2003).

A cascata de sinalização MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos), que leva à ativação das proteínas ERK1 e ERK2 (quinases reguladas por sinal extracelular), tem sido implicada no controle da plasticidade sináptica no cérebro adulto, além de ser essencial nos eventos de diferenciação e proliferação celular (Thomas & Huganir, 2004). As ERKs são ativadas nos neurônios em resposta à sinalização glutamatérgica, que está envolvida em fenômenos como aprendizado e memória (Kurino et al., 1995). O envolvimento da via MAPK/ERK em vários eventos celulares tem sido esclarecido graças à utilização do composto PD98059, um inibidor específico da via MAPK/ERK (Alessi et al., 1995; Atherfold et al., 1999; Egea et al., 1999; Jovanovic et al., 2000; Bloch-Schilderman et al., 2002; Pereira et al., 2002). A MAPK fosforila a proteína sinapsina, envolvida na formação do pool de reserva das vesículas sinápticas, nos sítios 4 e 5 da região N-terminal, e nos sítio 6 da região C-terminal, podendo assim controlar a mobilização vesicular (Chie et al., 2003).

A proteína quinase dependente de cálcio e fosfolipídeo C (PKC) é uma quinase serina-treonina ativada por lipídeos e cálcio, com um papel fundamental na transdução de sinal (Parker & Murray-Rust, 2004). As isoformas da PKC são classificadas em três subfamílias, de acordo com o domínio regulatório N-terminal. Este domínio determina a sensibilidade para os segundos mensageiros Ca^{2+} e diacilglicerol (DAG). As isoenzimas α , βI , βII e γ requerem DAG, fosfatidilserina (PS) e Ca^{2+} para sua ativação. As formas δ , ϵ e θ requerem DAG e PS, mas são independentes de Ca^{2+} . Por outro lado, as PKCs λ e χ não

requerem Ca^{2+} nem DAG (Parker & Murray-Rust, 2004). Isoenzimas de PKC estão presentes em terminais nervosos do sistema nervoso de mamíferos (Coffey et al., 1993). As vias que levam à ativação de PKC tem sido muito estudadas, revelando uma clara relação entre a sinalização de PI3K e a função das PKCs (Toker, 2000). A ativação de PKC pode aumentar a liberação de neurotransmissores por mecanismos como o aumento na atividade dos canais de Ca^{2+} , a inibição dos canais de K^+ , alterações na maquinaria exocitótica, aumento no pool de vesículas prontas, ou aumentando a sensibilidade da maquinaria de liberação ao Ca^{2+} (Millán et al., 2003). Além de facilitar a liberação de glutamato, PKC e PKA (proteína quinase dependente de AMP cíclico) suprimem as influências pré-sinápticas inibitórias de vários receptores acoplados à proteína G (Cai et al., 2001).

A transmissão sináptica pode ser regulada em várias sinapses pela ativação da PKA. A ativação de PKA tem mostrado potencializar a transmissão sináptica, aumentando a liberação de glutamato em muitas preparações neuronais, incluindo fatias hipocámpicas da região CA1, cultura de células granulares cerebelares e sinaptossomas (Milán et al., 2003). Os mecanismos envolvidos na facilitação da liberação de glutamato por PKA incluem a ativação direta da maquinaria de exocitose (Chheda et al., 2001) e alterações na excitabilidade dos terminais nervosos, resultando em modulação dos canais iônicos (Chevalleyre & Castillo, 2002).

Evidências sugerem que a ativação da cascata MAPK/ERK é mediada em parte pela via PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase), dependendo do tipo celular e do estímulo utilizado (Toker, 2000). Amino e colaboradores (2002) demonstraram que o fator de crescimento nervoso (NGF) aumenta a liberação de neurotransmissores em células PC12, através da ativação das proteínas quinases ERK e PI3K.

A estimulação de terminais nervosos por uma variedade de estímulos leva ao influxo de Ca^{2+} , que interage com proteínas reguladoras da exocitose. O Ca^{2+} tem um papel chave na regulação da funcionalidade dos terminais nervosos através da estimulação de enzimas dependente de calmodulina (CaM), incluindo um grande número de quinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK) (Turner et al., 1999). As proteínas sinapsina I e II são

fosforiladas pela CaMKII, nas extremidades N- e C-terminais (Greengard et al., 1993). A fosforilação de CaMKII induzida pelo aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelulares tem um papel central no ciclo das vesículas sinápticas (Leenders & Sheng, 2005). A participação da CaMKII na liberação de glutamato induzida por despolarização com KCl em sinaptossomas foi demonstrada pela utilização do KN-62, um inibidor específico da CaMKII (Sihra & Pearson, 1995).

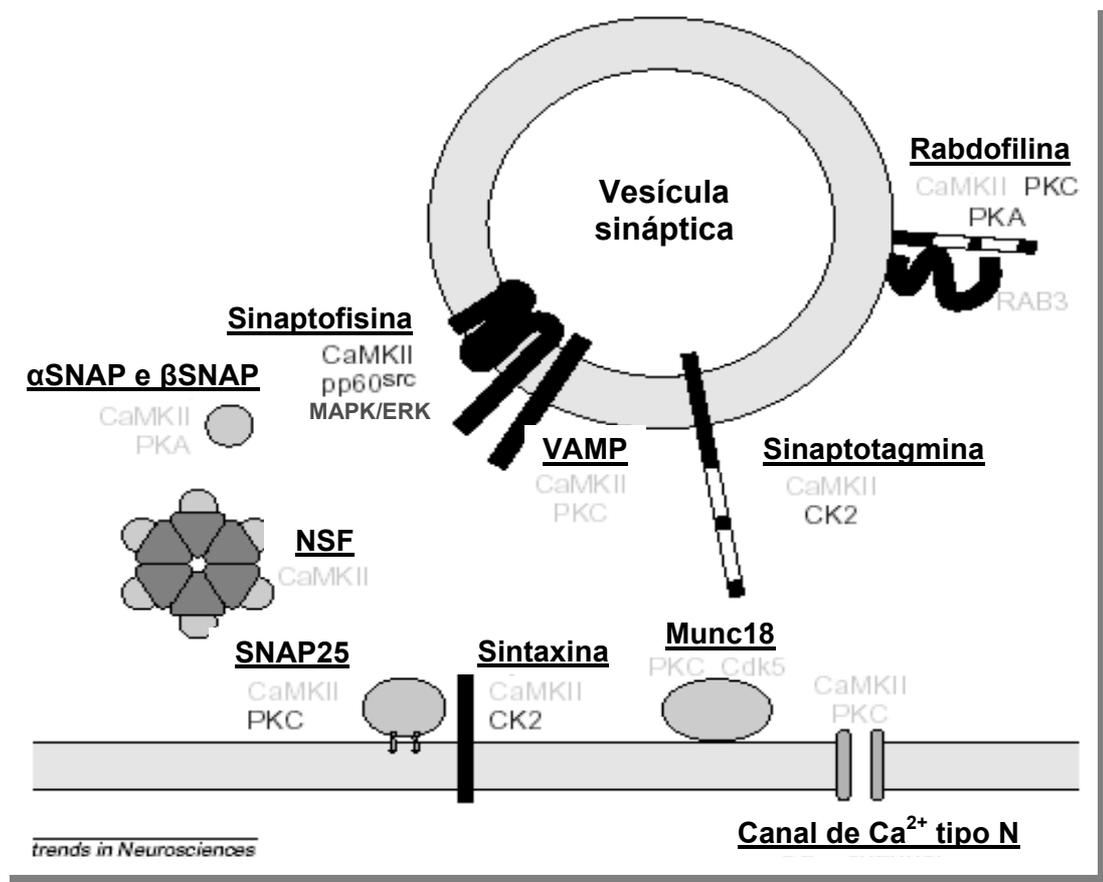


Figura 2. Proteínas quinases envolvidas na liberação de neurotransmissores. Estão demonstradas algumas quinases que podem ativar várias proteínas envolvidas na liberação de neurotransmissores (em negrito e sublinhado). Adaptado de Turner et al., 1999.

1.5. CITOLISINAS DE ANÊMONAS DO MAR

Os membros do Filo Cnidária produzem uma variedade de peptídeos e proteínas, que agem como neurotoxinas ou citolisinas. Apesar de vários cnidários serem venenosos ou peçonhentos, os estudos bioquímicos e farmacológicos têm focado em alguns poucos grupos (Anderluh e Macek, 2002). O veneno das anêmonas-do-mar (Actiniaria) contém várias toxinas polipeptídicas, como neurotoxinas que interagem com canais de Na⁺ (Norton, 1991; Santana et al., 2001; Bosmans et al., 2002), de K⁺ (Diochot et al., 1998) e citolisinas (Macek et al., 1994; Anderluh & Macek, 2002; Turk, 1991).

Nas últimas três décadas, 32 espécies de anêmonas do mar foram caracterizadas como produtoras de uma ou mais proteínas citolíticas. Estas toxinas são classificadas em quatro grupos, com base no seu peso molecular (Anderluh e Macek, 2002): a) peptídeos de 5-8 kDa com atividade antihistamínica; b) proteínas formadoras de poros com cerca de 20 kDa (actinoporinas), inibidas por esfingomiélinase; c) citolisinas com 30-40 kDa com ou sem atividade de fosfolipase A₂; d) um grupo representado pela citolisina metridiolisina, de 80 kDa, obtida da anêmona *Metridium senile*. As actinoporinas possuem várias atividades biológicas, como hemolítica (Macek et al., 1994; Anderluh & Macek, 2002), citotóxica (Zorec et al., 1990; Batista & Sentjerc, 1995), antiparasitária (Tejuca et al., 1999) e cardiotoxica (Suput et al., 2001). As equinatoxinas (obtidas da anêmona *Actinia equina*) e as esticolisinas (da *Stoichactis helianthus*) são as citolisinas mais bem conhecidas, sendo que a equinatoxina-II (EqTx-II) foi clonada e expressada em *E. coli* (Anderluh et al., 1996).

A caracterização estrutural e funcional das actinoporinas teve um grande avanço com a clonagem e o sequenciamento de algumas destas citolisinas (Anderluh et al., 1995; De los Rios et al., 2000; Wang et al., 2000). A alta letalidade das actinoporinas em mamíferos (LD₅₀ in vivo: entre 20 e 300 µg/kg) foi atribuída à parada cardiorespiratória e ao espasmo coronariano (Sket et al., 1974; Ho et al., 1987). As actinoporinas são líticas para uma variedade de células e suas organelas vesiculares. Batista & Sentjerc (1995) demonstraram que concentrações de EqTx-II menores que 0,1 nM afetaram a estrutura de

células V-79 (fibroblastos de macaco). Por serem extremamente citolíticas e citotóxicas, estas toxinas têm sido usadas como componentes ativos de imunotoxinas (Avila et al., 1988; Pederzoli et al., 1995). Além disso, EqTx-II e a esticolisina demonstraram uma atividade anti-parasitária, apresentando forte toxicidade para o parasita *Giardia lamblia* (Tejuca et al., 1999).

As actinoporinas formam canais seletivos para cátions em modelos de membranas e em células (Belmonte et al., 1993; Tejuca et al., 2001). Os poros formados por essas citolisinas consistem de 3 ou 4 monômeros inseridos na membrana lipídica (Malovrh et al., 2003), com um diâmetro de cerca de 1 nm, que permitem a passagem de moléculas entre 400 a 900 Da (De los Rios et al., 2001; Tejuca et al., 2001). O efeito dessas citolisinas é observado em baixas concentrações e pode ser inibido por esfingomiéline, um fosfolípido de membrana que parece ser o sítio de ligação da toxina com a membrana plasmática (Macek et al., 1994; Anderluh & Macek, 2002; Malovrh et al., 2003). A estrutura tridimensional da EqTx-II foi recentemente determinada através de difração de raios-X e NMR (ressonância magnética nuclear), estimulando novos estudos sobre os mecanismos de ação destas citolisinas (Athanasiadis et al., 2001; Anderluh et al., 2003; Anderluh et al., 2005). Desde 1990, é conhecido que a EqTx-II aumenta os níveis de $[Ca^{2+}]_c$ (Zorec et al., 1990). Além disso, a EqTx-II também induziu o influxo de cálcio em células de neuroblastoma humano (Muenier et al., 2000).

A citolisina isolada da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum*, denominada de toxina Bc2 (cerca de 20 kDa), induziu uma massiva liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de ratos (Migues et al., 1999). Este efeito foi independente de Ca^{2+} extracelular e de canais de Na^+ , e foi inibido pela esfingomiéline. Alguns destes efeitos foram semelhantes aos da proteína neurotóxica α -latrotoxina (Ltx), da aranha "viúva negra", que produz massiva liberação de diversos neurotransmissores (Rosenthal & Meldolesi, 1989). A Ltx também forma poros e tem sido utilizada como uma importante ferramenta para estudar os mecanismos moleculares envolvidos na exocitose em linhagens celulares e neurônios (Davletov et al., 1998; Ushkaryov, 2002).

A toxina Bc2 provocou o aumento dos níveis de $[Ca^{2+}]_c$ e a exocitose de catecolaminas em células cromafins bovinas (secretoras de catecolaminas) (Alés et al., 2000). A exocitose induzida pela toxina Bc2 mostrou diferenças quando comparada com a induzida pela Ltx e com a induzida por despolarização com K^+ . Além de aumentar os níveis de $[Ca^{2+}]_c$, a toxina Bc2 também provocou modificações no arranjo estrutural da F-actina (uma proteína do citoesqueleto), e mobilizou diferentes “pools” de vesículas (Alés et al., 2000).

2. JUSTIFICATIVA

A utilização de citolisinas na neurotransmissão tem sido investigada (Khoo et al., 1995; Miguez et al., 1990; Alés et al., 2000), e neste trabalho se pretende dar continuidade e aprofundar o conhecimento sobre o mecanismo de ação das toxinas marinhas equinatoxina-II e toxina Bc2. Assim como já foi demonstrado para outras proteínas formadoras de poros (Panchal et al., 2002), novas aplicações biológicas das citolisinas de anêmonas poderão ser viabilizadas, desde que o seu mecanismo de ação seja bem conhecido: a) EqTx-II e toxina Bc2 aumentam os níveis citosólicos de Ca^{2+} (Alés et al., 2000; Meunier et al., 2000), um importante mensageiro intracelular. Esta capacidade permitiria utilizar as citolisinas para estudar os eventos em que este cátion está envolvido: sinalização celular, neurotransmissão e morte celular (necrose e apoptose); b) devido à sua capacidade de formação reversível de poros na membrana, sem provocar a lise celular em doses subcitotóxicas, citolisinas têm sido testadas como "carregadores" ("delivery") de drogas e medicamentos para dentro da células (Provoda & Lee, 2001); c) a formação de poros na membrana (permeabilização) de células permitiu a "introdução" de segmentos de DNA no interior de células (transfecção) e de anticorpos (Provoda & Lee, 2001; Schiavo & Van der Goot, 2001). d) os "nanoporos" formados pelas citolisinas também têm sido testadas como "sensores" para analisar compostos orgânicos (Gu et al., 2001).

O conhecimento sobre o mecanismo de ação das citolisinas marinhas, equinatoxina e toxina Bc2 podem permitir a utilização destas proteínas no estudo da excitose e de outros processos da neurotransmissão.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o mecanismo de ação e as vias de sinalização celulares envolvidas na liberação de L- [³H]glutamato sinaptossomal induzida pelas citolisinas marinhas equinatoxina-II (EqTx-II) e toxina Bc2.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar a EqTx-II (clonada, obtida de culturas de *E. coli*) e verificar se esta citolisina tem a capacidade de induzir a liberação sinaptossomal de glutamato;
- Estudar a cinética de liberação sinaptossomal de glutamato: analisar o efeito da concentração e do tempo de incubação com EqTx-II e toxina Bc2;
- Avaliar se o pré-tratamento dos sinaptossomas com EqTx-II ou toxina Bc2 afeta a exocitose induzida por KCl;
- Investigar o envolvimento de proteínas quinases na ação neurosecretora da EqTx-II e toxina Bc2, utilizando inibidores específicos das vias MAPK/ERK, PKC, PKA, PI3K e CaMKII;
- Analisar se a liberação de glutamato induzida por EqTx-II e toxina Bc2 é exocitótica ou citosólica, através do pré-tratamento dos sinaptossomas com bafilomicina e toxina botulínica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

Bafilomicina, ionomicina, Percoll, PD98059, estaurosporina, H89, KN-62 e toxina tetânica foram obtidos da Sigma Co. (St. Louis, MO, USA). O kit para dosagem de proteínas BCA foi adquirido de Pierce (Rockford, USA). Queleritrina, LY294002 e latrotoxina são provenientes de Alomone Labs. (Jerusalém, Israel). L-[³H]glutamato foi obtido de Amersham (UK) e o líquido de cintilação de Perkin-Elmer (Wellesley, USA). A bafilomicina, a toxina tetânica e todos os inibidores de proteínas quinases foram diluídos em DMSO (concentração final menor que 0,1%). Equinatoxina, toxina Bc2, latrotoxina e ionomicina foram diluídas em tampão HBSS (HEPES 28 mM; NaCl 133,5 mM; KCl 2,5 mM; KH₂PO₄ 20 mM; CaCl₂ 1 mM e glicose 1,2 mM).

4.2. ANIMAIS

Os animais utilizados neste trabalho foram camundongos Swiss machos adultos, com cerca de 3 meses de idade (25 - 35 g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 300/UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas com grades na parte superior e tratados com livre acesso à água e ração sólida própria. A sala de manutenção teve ciclo claro e escuro de 12 horas (ciclo claro das 7:00 às 19:00 h) em temperatura climatizada entre 22 e 24°C.

4.3. ISOLAMENTO DA TOXINA Bc2

As anêmonas-do-mar da espécie local *Bunodosoma caissarum* foram coletadas na Praia da Armação, em 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 o muco liberado pelas anêmonas do mar foi filtrada através de papel filtro para remover partículas, em temperatura de 4 °C. O filtrado (extrato bruto) foi aliqotado e liofilizado.

A toxina marinha Bc2 foi isolada por cromatografia em coluna como descrito por Migues et al. (1999). O extrato bruto foi dissolvido em tampão fosfato (PBS) 0,1 M, NaCl 0,15 M e pH = 7,4. A amostra foi submetida a uma filtração em coluna (1,5 x 115 cm) de resina Biogel P2, equilibrada e eluída com o mesmo tampão fosfato, sendo o fluxo de 4 ml por hora, em temperatura ambiente. Frações de 4 ml de efluente foram recolhidas em tubos num coletor de frações. A absorbância de cada tubo (fração) foi lida em um espectrofotômetro a 280 nm (UV), para detectar os "picos" de proteínas. Uma alíquota de 5 a 50 µl de cada tubo foi testada no ensaio de atividade hemolítica (item 2.4) para verificar e identificar as proteínas citolíticas. A seguir, os tubos que mostraram atividade (frações ativas isoladas) foram reunidos, concentrados por liofilização e dessalinizados.

As frações ativas liofilizadas, contendo tampão fosfato, foram dessalinizadas por filtração em mini-coluna PD-10 de gel Sephadex G-25 (Pharmacia). Primeiramente, a coluna foi equilibrada e eluída com água bidestilada. A seguir, as amostras liofilizadas foram diluídas em 1-2 ml de água e aplicadas na coluna. A coluna foi eluída com água bidestilada e o fluxo regulado para cerca de 6 ml/hora. Nestas colunas, a fração proteica é eluída rapidamente (volume "vazio" da coluna), seguida da eluição de sal (tampão fosfato). Frações de 1 ml foram separadas em tubos e depois lidas a 280 nm, para detectar o componente proteico. Os tubos contendo a proteína citolítica isolada (toxina marinha Bc2) foram aliqotados e concentrados por liofilização. A coluna foi lavada com água e azida sódica 0,02% para conservação e posterior reutilização.

4.4. ISOLAMENTO DA EQUINATOXINA-II RECOMBINANTE

O gene da equinatoxina II foi clonado em um vetor T7 e expressado em uma bactéria *E. coli* (DE3) (Anderluh et al., 1996). Esta linhagem bacteriana foi gentilmente cedida pelo Dr. Gregor Anderluh (Eslovênia) e foi utilizada na obtenção de equinatoxina. As bactérias foram cultivadas em meio M9-LBA enriquecido e a expressão da proteína induzida durante o crescimento na fase log. As células foram ressuspensas em tampão acetato de amônio 50 mM, pH 6,8, contendo 25% de sacarose. O meio foi centrifugado e o precipitado (contendo as bactérias) coletado. As bactérias foram lisadas por choque osmótico (através da adição de 3 volumes de tampão acetato de amônio sem sacarose) e centrifugadas (6000 g durante 10 minutos). O sobrenadante (contendo as proteínas expressadas) foi aplicado em uma coluna de troca iônica (CM-Celulose) para o isolamento da equinatoxina II (Anderluh et al., 1996).

4.5. ENSAIO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Amostras de sangue de carneiro foram fornecidas pelo Biotério Central da UFSC. Os eritrócitos foram separados do plasma lavando o sangue 3 ou 4 vezes, até a ausência de hemólise com tampão Fosfato (PBS) 0,1 M, NaCl 0,15 M e pH = 7,4. A cada lavagem, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. Uma suspensão de eritrócitos (3 a 5%) foi preparada para, quando em hemólise total (100%), apresentar uma absorbância aproximada de 0,600 em 540 nm. Cem microlitros (100 µl) da suspensão de eritrócitos foram incubados com até 100 µl de solução-teste (frações obtidas da cromatografia ou citolisinas isoladas), durante 30 minutos a 37 °C. Os tubos foram levemente agitados para homogeneização do conteúdo após a adição da solução-teste. Ao final do tempo de incubação, 800 µl de tampão fosfato foram adicionados e as amostras centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos. A absorbância do sobrenadante, que é proporcional à quantidade de hemoglobina liberada, foi lida a 540 nm. Como controle (0% de hemólise) foi utilizado

50µl de tampão fosfato. A hemólise total (100%) foi obtida com a incubação de eritrócitos em Triton X-100 (0,1% v/v).

4.6. LIBERAÇÃO DE L-[³H]GLUTAMATO SINAPTOSSOMAL

4.6.1. PREPARAÇÃO DOS SINAPTOSSOMAS

Os sinaptossomas foram obtidos de córtex de camundongos, utilizando um gradiente descontínuo de Percoll (Dunkley et al., 1988), como descrito por Miguez et al. (1999). Os camundongos foram sacrificados por decapitação e os cérebros rapidamente removidos. O córtex cerebral foi dissecado e homogeneizado em 10 volumes de solução de sacarose (0,32 M), EDTA (1 mM) e ditioneitol (0,25 mM) com pH = 7,4. O homogenado foi centrifugado a 1.000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi aplicado com pipeta Pasteur sobre gradientes descontínuos de Percoll (3, 7, 15 e 23 %) e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. As frações sinaptossomais obtidas nas interfaces 7%-15% e 15%-23% foram coletadas, reunidas e centrifugadas a 17.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi novamente ressuspensão e centrifugado a 17.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado final ressuspensão em tampão HSSB (solução salina tamponada com HEPES), o qual consiste de: HEPES 28 mM; NaCl 133,5 mM; KCl 2,5 mM; KH₂PO₄ 20 mM; CaCl₂ 1 mM e glicose 1,2 mM. Esta suspensão de sinaptossomas foi utilizada para os ensaios de liberação.

4.6.2. ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE [³H]GLUTAMATO

O ensaio de liberação de [³H]glutamato foi realizado segundo Miguez et al. (1999). O precipitado sinaptossomal foi ressuspensão em 900 µl de tampão HEPES. Nesta suspensão foram adicionados 100 µl de uma solução de L-[³H]glutamato, contendo 2 µCi de L-[³H]glutamato (atividade específica 53 µCi/mmol) e glutamato não-radioativo

(concentração final de 5×10^{-7} M). A preparação sinaptossomal foi incubada por 15 minutos a 37°C para captação.

Após a incubação, os sinaptossomas foram lavados três vezes, durante 1 minuto, com 1 ml de HEPES, a temperatura de 4°C. Este volume de tampão foi utilizado para descartar o excesso de glutamato (neurotransmissor não captado). A liberação de glutamato foi induzida de acordo com os tratamentos dos sinaptossomas descritos abaixo. Após os tratamentos, os sinaptossomas foram centrifugados a 14.000 g durante 1 minuto, a 4°C. Os precipitados (P) e os sobrenadantes (S) foram coletados em eppendorfs para medidas no cintilador. A cada tubo foi adicionado 1 ml de líquido de cintilação e a contagem da radioatividade (em cpm) contida em P e S foi realizada em um cintilador líquido (Packard). O percentual de [³H]glutamato liberado foi calculado como porcentagem do total, da seguinte maneira:

$$\text{L-}[^3\text{H}]\text{glutamato liberado (\%)} = \frac{\text{cpm em S}}{\text{cpm no S + P}} \times 100$$

4.7. TRATAMENTO DOS SINAPTOSSOMAS

- Para avaliar a liberação de glutamato, os sinaptossomas foram incubados durante 1 minuto com diferentes concentrações de EqTx-II, toxina Bc2, ionomicina e latrotoxina;
- Para estudar a cinética da liberação de glutamato induzida pelas citolisinas e ionóforos, os sinaptossomas foram incubados durante 1, 2 e 5 minutos na presença de condições basais (tampão HBSS), solução despolarizante (KCl 33 mM), EqTx-II (1 µg/ml), toxina Bc2 (1 µg/ml), ionomicina (1 µM) e latrotoxina (0,1 nM).
- Para avaliar se o pré-tratamento dos sinaptossomas com EqTx-II ou toxina Bc2 afeta a excitose induzida por KCl, estes foram pré-tratados durante 1 minuto na presença de HBSS, EqTx-II (1 µg/ml) ou toxina Bc2 (1 µg/ml). Os sinaptossomas foram centrifugados a 14.000 g durante 1 minuto, a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado

sinaptossomal foi redissolvido e incubados por 1 minuto com HBSS, KCl, EqTx-II ou toxina Bc2.

- Para analisar o envolvimento de proteínas quinases na liberação de glutamato induzida pela EqTx-II e toxina Bc2, os sinaptossomas foram pré-incubados durante 15 ou 20 minutos com os seguintes inibidores: PD98059 (30 μ M, Pereira et al., 2002; Raiteri et al., 2003), inibidor da MEK 1/2; estaurosporina (100 nM; Risso et al., 2004), inibidor não-específico de proteínas quinases; queleritrina (6 μ M, Tuz et al., 2004), inibidor seletivo da PKC; H89 (0,5 μ M, Page et al., 2001; Risso et al., 2004), inibidor da PKA; LY294002 (10 μ M, Goggi et al., 2003; Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2001), um inibidor da PI3K seletivo para os subtipos I, II e III; e KN-62 (1 μ M, Sihra & Pearson, 1995), inibidor da CaMKII. Os sinaptossomas pré-tratados com PD98059 foram incubados durante 1 minuto na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), EqTx-II (1 μ g/ml), toxina Bc2 (1 μ g/ml), ionomicina (1 μ M) e latrotoxina (0,1 nM). Os sinaptossomas pré-tratados com os outros inibidores de proteínas quinases foram incubados durante 1 minuto apenas na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), EqTx-II (1 μ g/ml) e toxina Bc2 (1 μ g/ml).
- A fim de determinar se a liberação de glutamato induzida pela EqTx-II e toxina Bc2 é vesicular ou citosólica, os sinaptossomas foram pré-tratados com a bafilomicina, um inibidor do transporte vesicular (0,1 μ M) durante 30 minutos (Linetska et al., 2004; Bradford & Nadler, 2004) ou com a toxina tetânica, um inibidor da formação do complexo SNARE (100 nM, Matsumoto et al., 2001) durante 40 minutos (Montecucco & Schiavo, 2005). A seguir, os sinaptossomas foram incubados durante 1 e 5 minutos na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), EqTx-II (1 μ g/ml) e toxina Bc2 (1 μ g/ml).

4.8. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas nas amostras foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA), utilizando albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados foram analisados através do teste-*t* de Student. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. ISOLAMENTO DA TOXINA MARINHA Bc2

O gráfico de eluição do extrato bruto da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum*, por cromatografia líquida em coluna de Biogel P-2, está apresentado na Figura 1A. Uma alíquota de cada fração foi testada no ensaio de atividade hemolítica, e demonstrou a presença de dois picos, denominados Bc1 e Bc2, com menor e maior atividade hemolítica, respectivamente (Figura 1B).

As curvas de hemólise de Bc1 e Bc2 estão mostradas na Figura 2. O gráfico mostra que o componente Bc2 apresenta uma maior atividade hemolítica (máxima em cerca de 10 $\mu\text{g/ml}$), do que a proteína Bc1. Portanto, Bc2 é a principal citolisina da anêmona do mar *B. caissarum*. Resultados anteriores de eletroforese em gel de poliacrilamida com a toxina Bc2 indicaram que esta é uma proteína de peso molecular aproximado de 20 kDa (Migues et al., 1999).

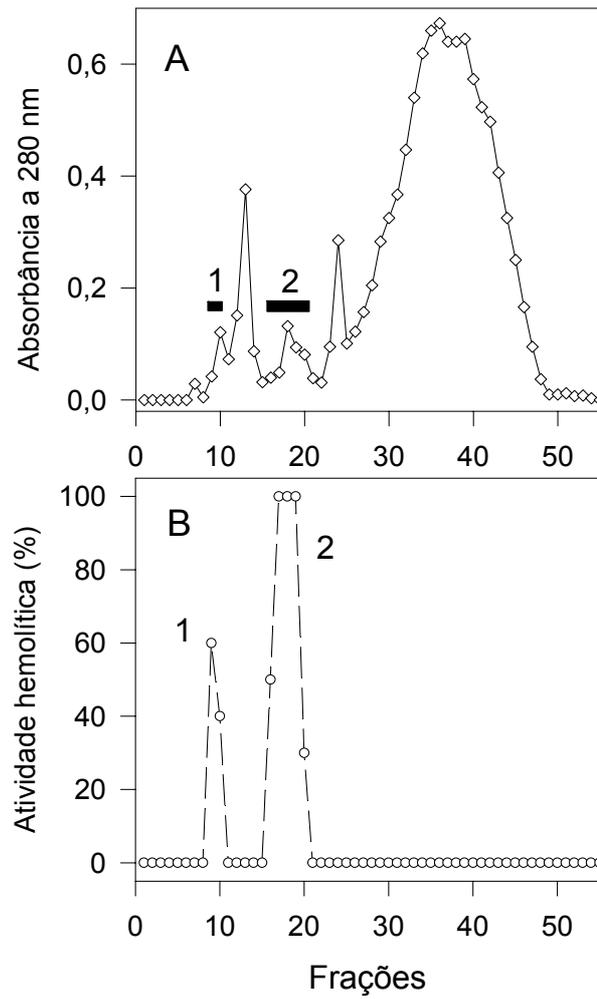


Figura 1. Isolamento da toxina Bc2. **(A)** Cromatografia do extrato bruto da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* em coluna de Biogel P-2 eluída com PBS + 0,1 M NaCl. **(B)** A atividade hemolítica das frações que eluíram da coluna cromatográfica. Dois “picos” de proteínas hemolíticas (citolisinas) estão indicadas, toxina Bc1 (pico 1) e toxina Bc2 (pico 2).

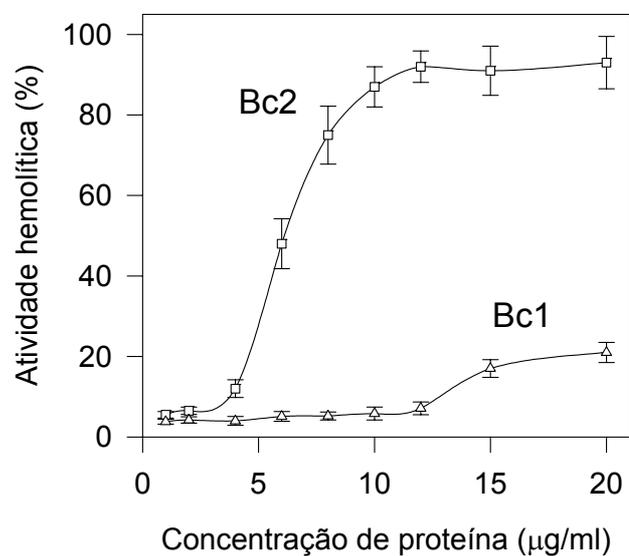


Figura 2. Curvas de hemólise das citolisinas Bc1 e Bc2 isoladas do extrato bruto da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum*. Diferentes concentrações (1 a 20 µg/ml) das citolisinas Bc1 e Bc2 foram incubadas com 100 µl de uma suspensão de eritrócitos de carneiros a 3%, durante 30 minutos a 37°C. Os dados representam a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes.

5.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE EQUINATOXINA-II E TOXINA Bc2 NA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO SINAPTOSSOMAL

A liberação de glutamato provocada pela equinatoxina (EqTx-II) foi induzida utilizando as concentrações de 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$, durante 1 minuto. Nestas concentrações, a liberação de glutamato foi de $23,6 \pm 1,2\%$; $35,5 \pm 0,9\%$ e $45,3 \pm 1,2\%$ do total, respectivamente (Figura 3A).

Os sinaptossomas também foram incubados durante 1 minuto com diferentes concentrações de toxina Bc2: 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3B). A liberação de glutamato induzida por estas concentrações foi de: $18,5 \pm 0,9\%$; $31,3 \pm 1,8\%$ e $44,1 \pm 0,8\%$ do total, respectivamente.

Os resultados mostram que a EqTx-II e a toxina Bc2 induzem a liberação sinaptossomal de glutamato de maneira dependente da concentração: $23,3 \pm 1,2\%$; $35,5 \pm 0,9\%$ e $43,3 \pm 1,2\%$ do total (EqTx-II) e $18,5 \pm 0,9\%$; $31,3 \pm 1,8\%$ e $44,1 \pm 0,8\%$ do total (toxina Bc2).

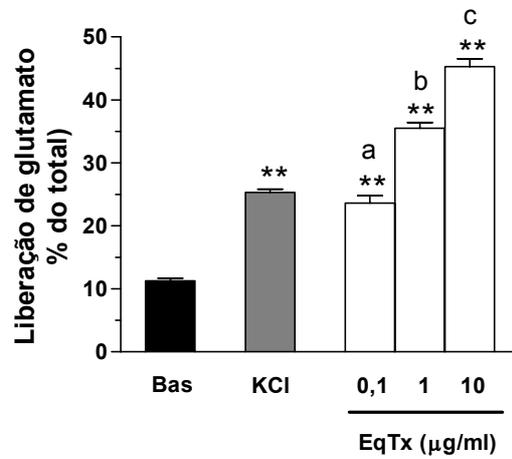
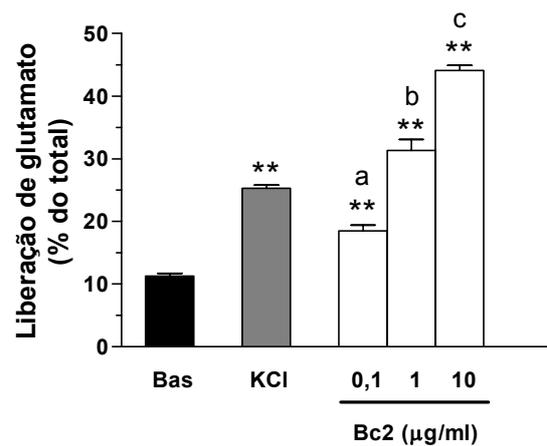
A**B**

Figura 3. Efeito da EqTx-II e da toxina Bc2 na liberação de glutamato sinaptossomal. Os sinaptossomas foram incubados durante 1 minuto na presença de HBSS (basal), solução despolarizante (KCl 33 mM), EqTx-II (**A**) ou toxina Bc2 (**B**) nas concentrações de 0,1; 1 e 10 µg/ml. A liberação de L-[³H]glutamato foi determinada como porcentagem do total (ver Métodos). Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M de 3 experimentos independentes. **p <0,01, quando comparado à liberação basal. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si (teste-*t* de Student).

5.3. LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO SINAPTOSSOMAL INDUZIDA POR IONOMICINA E LATROTOXINA

A liberação de glutamato provocada pela ionomicina foi induzida utilizando as concentrações de 1; 3 e 10 μ M. Nestas concentrações, a liberação de glutamato foi de $21,3 \pm 0,3\%$; $31,6 \pm 0,4\%$ e $34,5 \pm 0,4\%$ do total, respectivamente (Figura 4A).

O efeito da latrotoxina na liberação de glutamato também foi testado em sinaptossomas de camundongos. A Figura 4B mostra que os sinaptossomas incubados durante 1 minuto com diferentes concentrações de latrotoxina: 0,1; 0,3 e 1 nM, liberaram $15,3 \pm 1,5\%$; $17,2 \pm 0,6\%$ e $20,2 \pm 1,7\%$ de glutamato do total, respectivamente.

Ionomicina e latrotoxina induziram uma liberação de glutamato de maneira dependente da concentração. A latrotoxina, em concentrações subnanomolares, mostrou um significativo efeito neurosecretor.

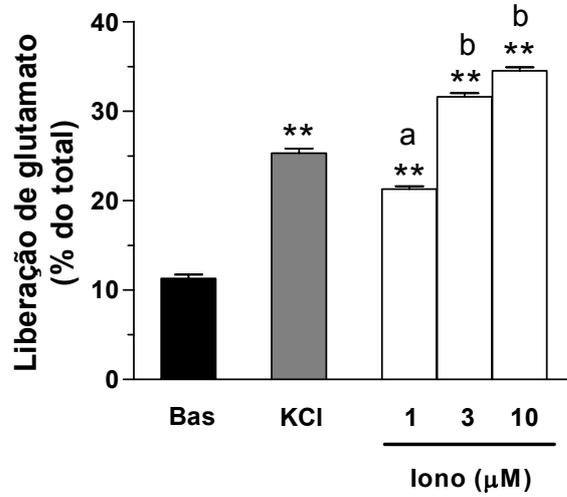
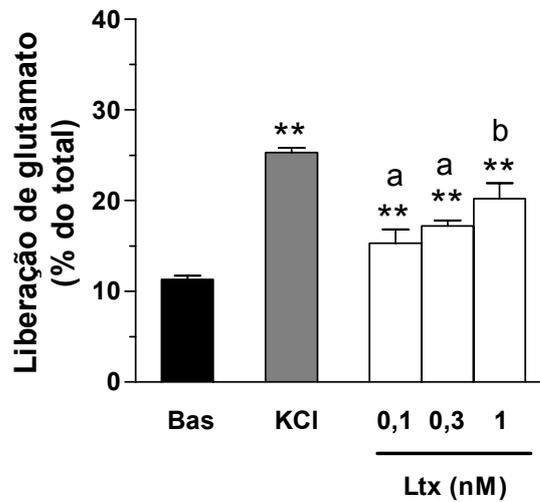
A**B**

Figura 4. Efeito da ionomicina e latrotoxina na liberação sinaptossomal de glutamato. Os sinaptossomas foram incubados durante 1 minuto na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), ionomicina (1; 3 e 10 μM, **(A)** ou latrotoxina (0,1; 0,3 e 1 nM, **(B)**). A liberação de L-[³H]glutamato foi determinada como porcentagem do total. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M de 3 experimentos independentes. **p <0,01, quando comparado ao basal. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si (teste-*t* de Student).

5.4. CINÉTICA DA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO SINAPTOSSOMAL INDUZIDA POR EQUINATOXINA-II, TOXINA Bc2, IONOMICINA E LATROTOXINA

A liberação de glutamato foi verificada em diferentes tempos de incubação: 1; 2 e 5 minutos. Na Figura 5 pode ser observado que a liberação de glutamato sinaptossomal induzida por solução despolarizante (KCl 33 mM), EqTx-II (1 µg/ml), toxina Bc2 (1 µg/ml), ionomicina (1 µM) e latrotoxina (0,1 nM) foi significativamente maior do que a liberação basal em todos os tempos analisados.

A incubação dos sinaptossomas com ionomicina durante 1, 2 e 5 minutos induziu uma liberação de glutamato de $21,3 \pm 0,7\%$; $34,2 \pm 0,4\%$ e $47,7 \pm 0,8\%$ do total, respectivamente. A liberação de glutamato induzida pela latrotoxina após 1, 2 e 5 minutos, foi de $15,3 \pm 1,5\%$; $20,5 \pm 1,7\%$ e $25,8 \pm 1,8\%$ do total, respectivamente.

Estes resultados demonstram que a EqTx-II, a toxina Bc2, a ionomicina e a latrotoxina induziram a liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de camundongos de maneira dependente do tempo.

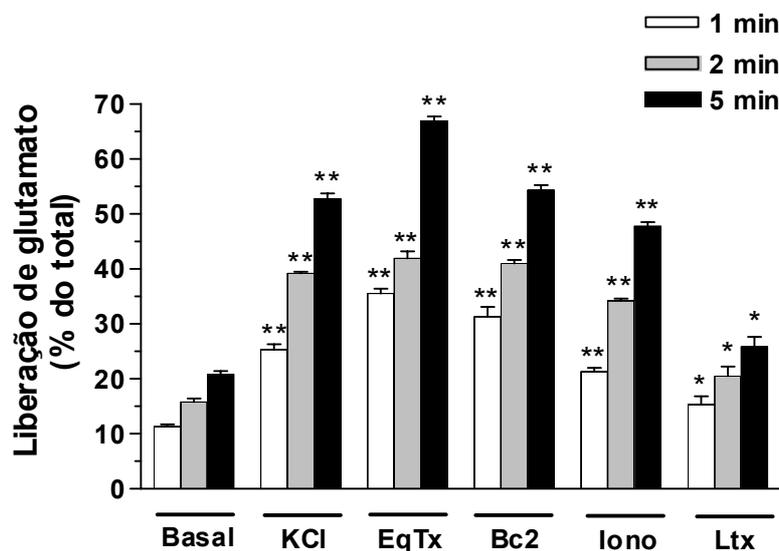


Figura 5. Efeito do tempo de incubação na liberação de glutamato induzida por KCl, EqTx-II, toxina Bc2, ionomicina e latrotoxina. Os sinaptossomas foram incubados durante 1, 2 ou 5 minutos, na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), EqTx-II (1 μ g/ml), toxina Bc2 (1 μ g/ml), ionomicina (Iono, 1 μ M) ou latrotoxina (Ltx, 0,1 nM). A liberação de L-[3 H]glutamato foi determinada como porcentagem do total. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, em relação ao basal, nos mesmos tempos de incubação (teste- t de Student).

5.5. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM EQUINATOXINA-II OU TOXINA Bc2 NA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO SINAPTOSSOMAL INDUZIDA POR KCl

Para investigar o efeito das citolisinas de anêmonas do mar na capacidade sinaptossomal de induzir a liberação exocitótica de glutamato, os sinaptossomas foram pré-incubados com HBSS, EqTx-II (1 µg/ml) ou toxina Bc2 (1 µg/ml) durante 1 minuto, centrifugados, e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida, os sinaptossomas foram estimulados durante 1 minuto com KCl (33 mM), EqTx-II ou toxina Bc2. A Figura 6 mostra que a despolarização induzida por KCl induziu a liberação de glutamato, mesmo após o pré-tratamento dos sinaptossomas com EqTx-II ou toxina Bc2, indicando que as citolisinas parecem não afetar a viabilidade sinaptossomal e/ou a maquinária de exocitose nos sinaptossomas.

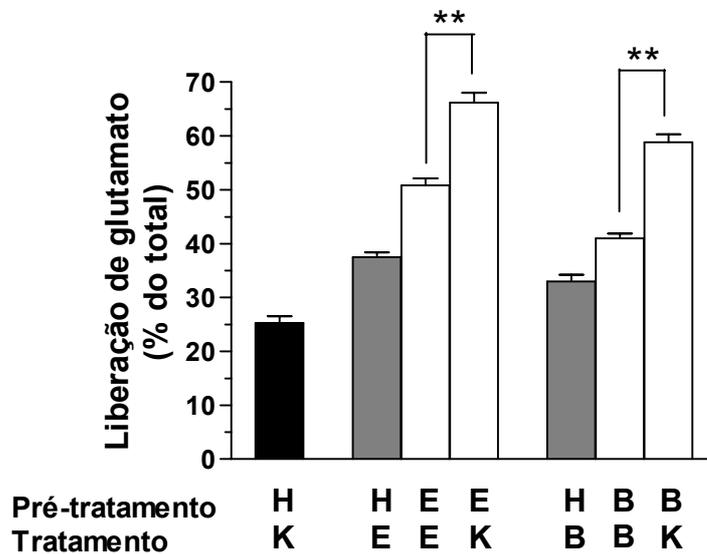


Figura 6. Efeito do pré-tratamento dos sinaptossomas com EqTx-II ou toxina Bc2 na liberação de glutamato induzida por KCl. Os sinaptossomas foram pré-incubados durante 1 minuto na presença de HBSS (**H**), EqTx-II (1 $\mu\text{g/ml}$, **E**) ou toxina Bc2 (1 $\mu\text{g/ml}$, **B**), centrifugados e o sobrenadante desprezado. A seguir, os sinaptossomas foram incubados durante 1 minuto na presença de KCl (33 mM, **K**), EqTx-II (**E**) ou toxina Bc2 (**B**). A liberação de L-[^3H]glutamato foi determinada como porcentagem do total. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$ (teste- t de Student).

5.6. ENVOLVIMENTO DE PROTEÍNAS QUINASES NA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO SINAPTOSSOMAL INDUZIDA POR EQUINATOXINA-II E TOXINA Bc2

5.6.1 ENVOLVIMENTO DA VIA MAPK/ERK

O envolvimento da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos/ proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (MAPK/ERK) na liberação de glutamato induzida por EqTx-II (1 µg/ml), toxina Bc2 (1 µg/ml), ionomicina (1 µM) e latrotoxina (0,1 nM) foi verificado utilizando um inibidor desta via, o PD98059 (inibidor seletivo da MEK). O pré-tratamento dos sinaptossomas durante 10 minutos com PD98059 (10 µM) não afetou a liberação de glutamato induzida pela despolarização com KCl (33 mM) (resultados não mostrados). Quando o PD98059 (30 µM) foi pré-incubado durante 20 minutos com os sinaptossomas, a liberação de glutamato evocada por KCl (33 mM) foi parcialmente inibida, de $204,9 \pm 8,9$ para $124 \pm 4\%$ (Figura 7). O pré-tratamento dos sinaptossomas com PD98059 (30 µM, 20 minutos) inibiu totalmente (retornando a valores basais) a liberação de glutamato induzida por EqTx-II (de $255,7 \pm 13,9$ para $114,1 \pm 5,9\%$), toxina Bc2 (de $250,2 \pm 4,1$ para $97,5 \pm 2,5\%$), ionomicina (de $188,2 \pm 2,5$ para $110,5 \pm 1,5\%$) e latrotoxina ($129,2 \pm 5,1$ para $103,1 \pm 4,9\%$). Estes resultados sugerem um efeito modulador da via MAPK/ERK na liberação sinaptossomal de glutamato induzida por KCl, EqTx-II, toxina Bc2, ionomicina e latrotoxina.

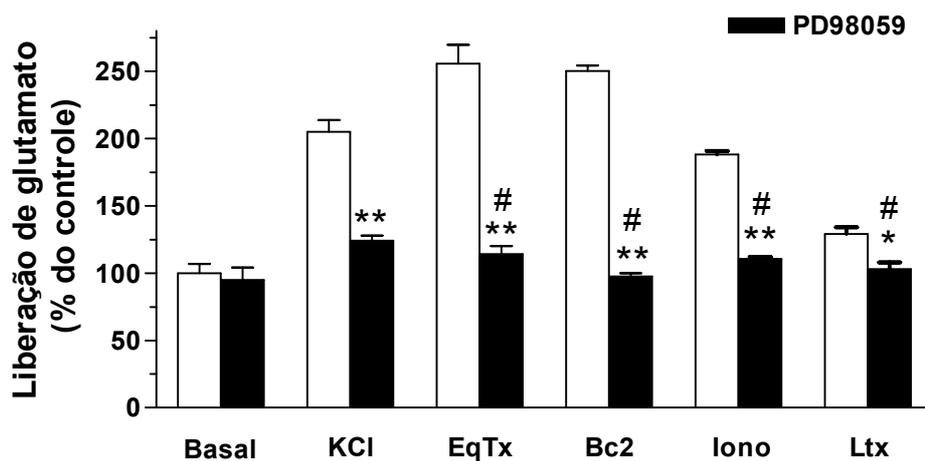


Figura 7. Efeito do PD98059 na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por EqTx-II, toxina Bc2, ionomicina e latrotoxina. Os sinaptossomas foram pré-tratados durante 20 minutos com PD98059 (30 μ M), e depois incubados durante 1 minuto na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), EqTx-II (1 μ g/ml), toxina Bc2 (1 μ g/ml), ionomicina (1 μ M) ou latrotoxina (0,1 nM). A liberação de L-[3 H]glutamato foi determinada como porcentagem do controle. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparado à ausência de pré-tratamento com PD98059. #Dados não significativos em relação ao basal pré-tratado com PD98059 (teste- t de Student).

5.6.2. ENVOLVIMENTO DA PKC

O envolvimento da proteína quinase C (PKC) na liberação de glutamato induzida pela EqTx-II (1 µg/ml) e toxina Bc2 (1 µg/ml) foi verificado utilizando 2 inibidores desta proteína quinase. Primeiramente, os sinaptossomas foram pré-tratados durante 20 minutos com estaurosporina (100 nM), um inibidor de proteínas quinases, não seletivo para PKC. Como está apresentado na Figura 8, o pré-tratamento com estaurosporina inibiu parcialmente a liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela despolarização com KCl (de $204,9 \pm 8,9$ para $137,6 \pm 8,6\%$) e pela toxina Bc2 (de $250,2 \pm 4,1$ para $130,1 \pm 5,1\%$). A liberação de glutamato induzida por EqTx-II foi totalmente inibida pela estaurosporina (de $255,7 \pm 13,9$ para $114,7 \pm 4,6\%$).

Também foi testado o efeito do pré-tratamento dos sinaptossomas com a queleritrina, um inibidor seletivo da PKC, na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por EqTx-II e toxina Bc2. A Figura 9 mostra que o pré-tratamento dos sinaptossomas durante 15 minutos com queleritrina (6 µM) inibiu parcialmente a liberação de glutamato induzida pela despolarização com KCl (33 mM), de $191,4 \pm 4,5$ para $155,9 \pm 6,3\%$. Entretanto, a liberação de glutamato induzida por EqTx-II ou toxina Bc2 não foi afetada pela queleritrina.

Portanto, como a queleritrina não afetou a liberação de glutamato provocada por EqTx-II e toxina Bc2, os resultados sugerem que a PKC não estaria envolvida na ação neurosecretora destas citolisinas.

5.6.3. ENVOLVIMENTO DA PKA

O envolvimento da proteína quinase ativada por cAMP (PKA) na liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela EqTx-II (1 µg/ml) e toxina Bc2 (1 µg/ml) foi verificado utilizando o H89, um inibidor seletivo da PKA. Em sinaptossomas pré-tratados durante 15 minutos com H89 (0,5 µM), a liberação de glutamato induzida por KCl (33 mM) foi parcialmente inibida, de $191,4 \pm 4,5$ para $131,9 \pm 8,1\%$ (Figura 10). O pré-tratamento dos sinaptossomas com o H89 inibiu totalmente (retornando aos valores basais) a liberação de glutamato induzida pela EqTx-II (de $248,6 \pm 13,9$ para $104 \pm 7,2\%$) e pela toxina Bc2 (de $238,8 \pm 5,6$ para $103,8 \pm 8,1\%$). Estes resultados sugerem a participação da PKA na liberação de glutamato induzida por EqTx-II e toxina Bc2.

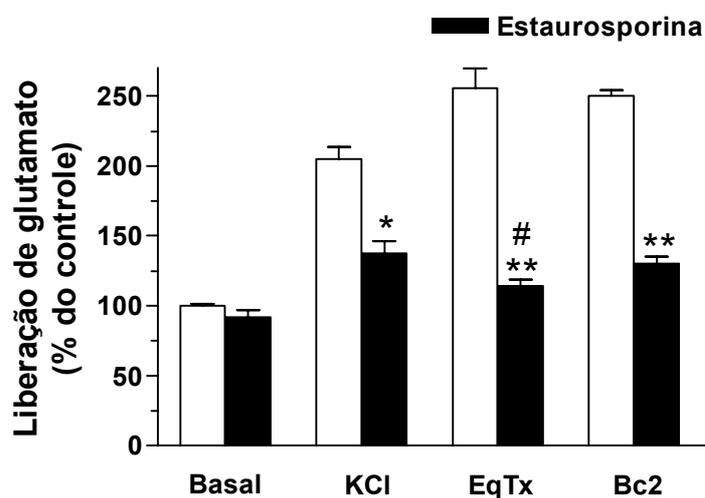


Figura 8. Efeito da estaurosporina na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por EqTx-II e toxina Bc2. Os sinaptossomas foram pré-tratados durante 20 minutos com estaurosporina (100 nM) e depois incubados durante 1 minuto na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), EqTx-II (1 μ g/ml) ou toxina Bc2 (1 μ g/ml). A liberação de L-[3 H]glutamato foi determinada como porcentagem do controle. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparado à ausência de pré-tratamento com estaurosporina. #Dados não significativos em relação ao basal pré-tratado com estaurosporina (teste- t de Student).

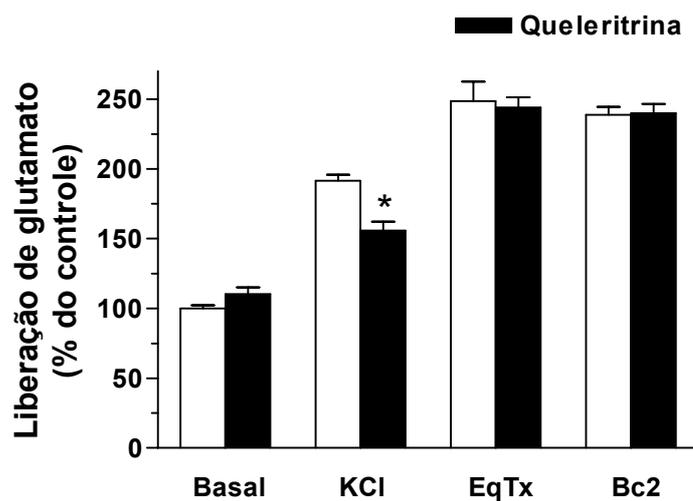


Figura 9. Efeito da quelitrina na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por EqTx-II e toxina Bc2. Os sinaptossomas foram pré-tratados durante 15 minutos com quelitrina (6 μ M) e depois incubados durante 1 minuto na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), EqTx-II (1 μ g/ml) ou toxina Bc2 (1 μ g/ml). A liberação de L-[3 H]glutamato foi determinada como porcentagem do controle. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$, quando comparado à ausência de pré-tratamento com quelitrina (teste- t de Student).

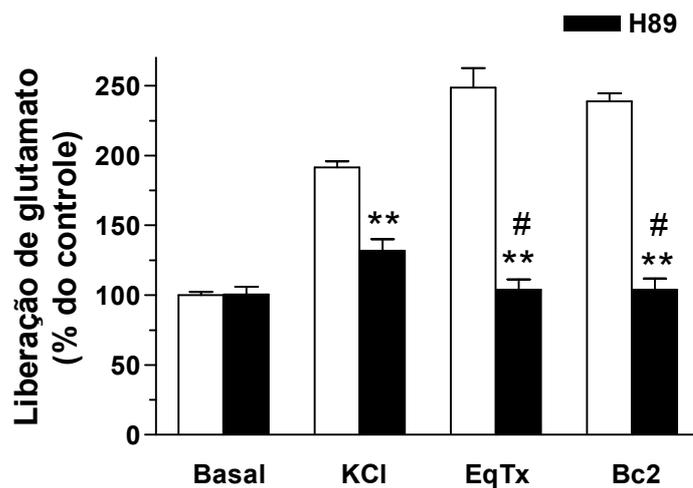


Figura 10. Efeito do H89 na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por EqTx-II e toxina Bc2. Os sinaptossomas foram pré-tratados durante 15 minutos com H89 (0,5 μ M) e depois incubados durante 1 minuto na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), EqTx-II (1 μ g/ml) ou toxina Bc2 (1 μ g/ml). A liberação de L-[3 H]glutamato foi determinada como porcentagem do controle. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. **p < 0,01, quando comparado à ausência de pré-tratamento com H89. #Dados não significativos em relação ao basal pré-tratado com H89 (teste-*t* de Student).

5.6.4. ENVOLVIMENTO DA PI3K

Para avaliar o envolvimento da proteína fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) na liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela EqTx-II (1 µg/ml) e toxina Bc2 (1 µg/ml), foi utilizado o LY294002, um inibidor seletivo da PI3K. A Figura 11 mostra que o pré-tratamento dos sinaptossomas durante 20 minutos com LY294002 (10 µM) não afetou a liberação de glutamato induzida por KCl (33 mM), EqTx-II ou toxina Bc2. Estes resultados sugerem que a PI3K não está envolvida na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por EqTx-II e toxina Bc2.

5.6.5. ENVOLVIMENTO DA CaMKII

O envolvimento da proteína quinase II dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII) na liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela EqTx-II (1 µg/ml) e toxina Bc2 (1 µg/ml) foi verificado utilizando o KN-62, um inibidor seletivo da CaMKII. A Figura 12 mostra que em sinaptossomas pré-tratados durante 20 minutos com KN-62 (1 µM), a liberação de glutamato induzida pela despolarização com KCl (33 mM) foi parcialmente inibida, de $204,9 \pm 8,9$ para $131 \pm 4,5\%$. O pré-tratamento com o KN-62 inibiu totalmente a liberação de glutamato induzida pela EqTx-II (de $255,7 \pm 13,9$ para $98,2 \pm 8,6\%$) e pela toxina Bc2 (de $250,2 \pm 5,6$ para $106,1 \pm 8,1\%$). Estes dados sugerem a participação da CaMKII na liberação de glutamato induzida por EqTx-II e toxina Bc2.

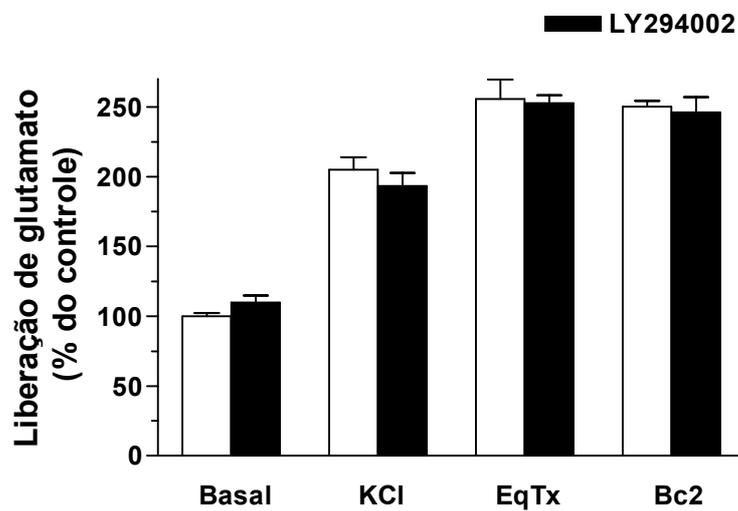


Figura 11. Efeito do LY294002 na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por EqTx-II e toxina Bc2. Os sinaptossomas foram pré-tratados durante 20 minutos com LY294002 (10 μ M) e depois incubados durante 1 minuto na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), EqTx-II (1 μ g/ml) ou toxina Bc2 (1 μ g/ml). A liberação de L-[3 H]glutamato foi determinada como porcentagem do controle. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. Dados não significativos quando comparados à ausência de pré-tratamento com LY294002 (teste-*t* de Student).

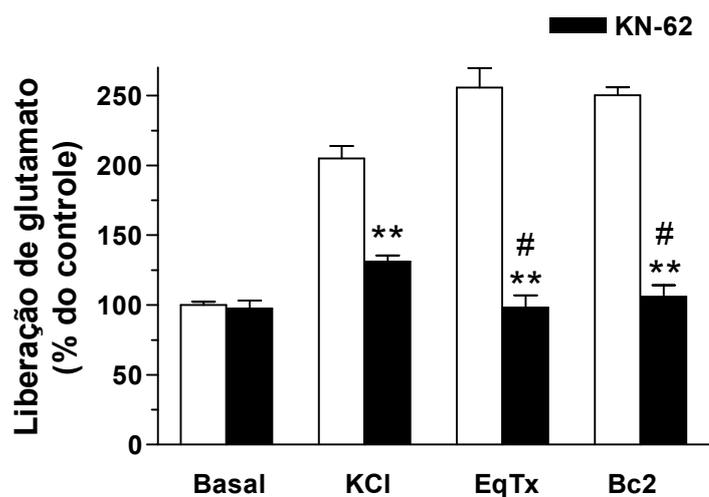


Figura 12. Efeito do KN-62 na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por EqTx-II e toxina Bc2. Os sinaptossomas foram pré-tratados durante 20 minutos com KN-62 (1 μ M) e depois incubados durante 1 minuto na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), EqTx-II (1 μ g/ml) ou toxina Bc2 (1 μ g/ml). A liberação de L-[3 H]glutamato foi determinada como porcentagem do controle. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. **p <0,01, quando comparado à ausência de pré-tratamento com KN-62. #Dados não significativos em relação ao basal pré-tratado com KN-62 (teste-*t* de Student).

5.7. EFEITO DA BAFIOMICINA NA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO SINAPTOSSOMAL INDUZIDA POR EQUINATOXINA-II E TOXINA Bc2

Para investigar se o glutamato liberado pela incubação com EqTx-II e toxina Bc2 (1 $\mu\text{g/ml}$) é proveniente do citosol ou das vesículas sinápticas, foi utilizada a bafilomicina, um composto que previne a exocitose pela inibição da bomba H^+ -ATPase vesicular (Cousin et al., 1995). Os sinaptossomas foram pré-tratados durante 30 minutos com bafilomicina (100 nM) e depois estimulados com EqTx-II (1 $\mu\text{g/ml}$) ou toxina Bc2 (1 $\mu\text{g/ml}$), durante 1 ou 5 minutos.

A Figura 13A mostra que a bafilomicina inibiu significativamente a liberação excitotóxica de glutamato induzida pela incubação dos sinaptossomas durante 1 minuto com KCl (33 mM): de $47,2 \pm 2,2$ para $27,6 \pm 0,7\%$. Em sinaptossomas incubados durante 1 minuto com EqTx-II ou toxina Bc2, a liberação de glutamato não foi afetada pela bafilomicina. Entretanto, a Figura 13B mostra que o pré-tratamento com bafilomicina reduziu totalmente a liberação de glutamato induzida pela incubação dos sinaptossomas durante 5 minutos com KCl (de $54,9 \pm 3,5$ para $35,9 \pm 1,6\%$), e parcialmente a liberação provocada por EqTx-II (de $67,4 \pm 1,5$ para $42,5 \pm 2,0\%$) e toxina Bc2 (de $64,7 \pm 3,3$ para $44,4 \pm 1,7\%$).

Estes resultados sugerem que o glutamato liberado pela estimulação rápida de 1 minuto com as citolisinas seria proveniente principalmente do citosol. Contudo, a estimulação prolongada de 5 minutos com EqTx-II ou toxina Bc2, induziria uma liberação de glutamato também vesicular.

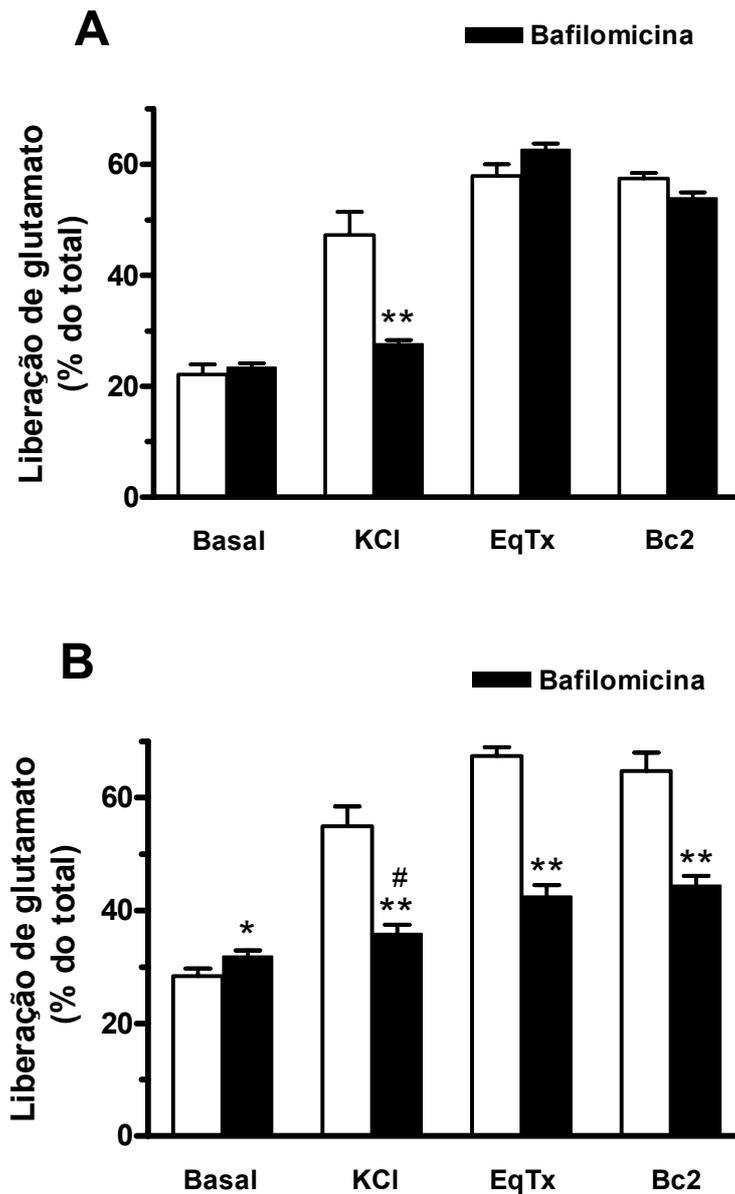


Figura 13. Efeito da bafilomicina na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por EqTx-II e toxina Bc2. Os sinaptossomas foram pré-tratados durante 30 minutos com bafilomicina (100 nM) e depois incubados durante 1 minuto (**A**) ou 5 minutos (**B**) na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), EqTX (1 μ g/ml) ou toxina Bc2 (1 μ g/ml). A liberação de L-[3 H]glutamato foi determinada como porcentagem do total. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. **p <0,01, quando comparado à ausência de pré-tratamento com bafilomicina. #Dados não significativos em relação ao basal pré-tratado com bafilomicina (teste-t de Student).

5.8. EFEITO DA TOXINA TETÂNICA NA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO INDUZIDA POR EQUINATOXINA-II E TOXINA Bc2

Para avaliar o envolvimento da maquinaria de exocitose na liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela EqTx-II e toxina Bc2, foi utilizada a toxina tetânica. Esta neurotoxina cliva a proteína sinaptobrevina, prevenindo a fusão das vesículas com a membrana plasmática nos terminais nervosos, bloqueando assim os eventos exocitóticos em várias células neuronais (Humeau et al., 2000). Os sinaptossomas foram pré-tratados durante 40 minutos com toxina tetânica (TeTx, 100 nM) e depois estimulados com EqTx-II (1 µg/ml) ou toxina Bc2 (1 µg/ml) durante 1 ou 5 minutos.

O pré-tratamento com TeTx reduziu significativamente a liberação exocitótica de glutamato induzida pela incubação dos sinaptossomas durante 1 minuto com KCl (33 mM): de $53,3 \pm 2,1$ para $31,6 \pm 1,7\%$ (Figura 14A). Em sinaptossomas incubados durante 1 minuto com EqTx-II ou toxina Bc2, a liberação de glutamato não foi afetada pela TeTx. No entanto, a Figura 14B mostra que o pré-tratamento com TeTx inibiu totalmente a liberação de glutamato induzida pela incubação dos sinaptossomas durante 5 minutos com KCl (de $73,7 \pm 3,6\%$ para $40,8 \pm 2,8\%$), e parcialmente a liberação provocada por EqTx-II ($89,2 \pm 0,5$ para $52,2 \pm 2,4\%$) e toxina Bc2 ($85,8 \pm 4,8$ para $59,1 \pm 3,2\%$).

Estes resultados indicam que a liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela incubação de 1 minuto com EqTx-II e toxina Bc2 parece não envolver a participação das proteínas SNARE, sugerindo ser não-exocitótica. Entretanto, durante uma estimulação prolongada de 5 minutos com as citolisinas, a liberação de glutamato teria a participação da maquinaria exocitótica sinaptossomal.

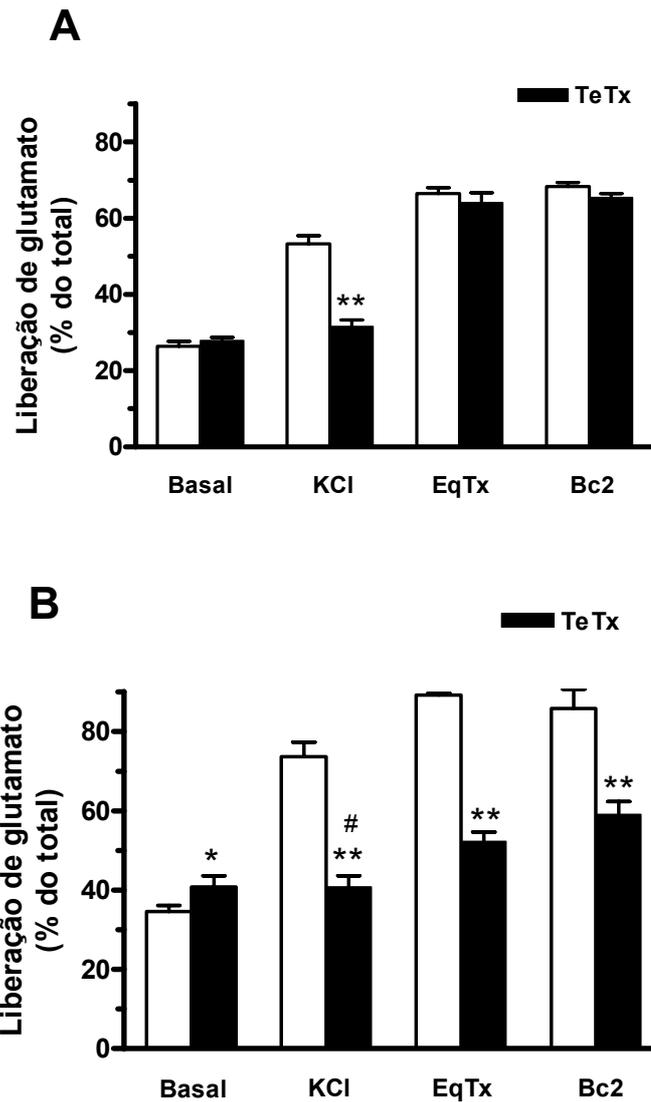


Figura 14. Efeito da toxina tetânica na liberação de glutamato sinaptossomal induzida por EqTx-II e toxina Bc2. Os sinaptossomas foram pré-tratados durante 40 minutos com toxina tetânica (TeTx, 100 nM) e depois incubados durante 1 minuto (**A**) ou 5 minutos (**B**) na presença de HBSS (Basal), KCl (33 mM), EqTx-II (1 µg/ml) ou toxina Bc2 (1 µg/ml). A liberação de L-[³H]glutamato foi determinada como porcentagem do controle. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. **p < 0,01, quando comparado à ausência de pré-tratamento com TeTx. #Dados não significativos em relação ao basal pré-tratado com TeTx (teste-*t* de Student).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram investigadas as vias de sinalização celular envolvidas na liberação sinaptossomal de glutamato induzida pela equinatoxina-II (EqTx-II) e toxina Bc2, duas proteínas citolíticas isoladas de anêmonas do mar. Além disso, também foi analisada a origem do glutamato liberado por estas citolisinas, se citosólica (não-vesicular) ou por um mecanismo de exocitose (vesicular).

Primeiramente foi demonstrada a presença de, pelo menos, dois componentes citolíticos (denominadas Bc1 e Bc2) no extrato bruto da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum*. A proteína que apresentou maior atividade citolítica (atividade hemolítica sobre eritrócitos de carneiros) e denominada de toxina Bc2 (Migues et al., 1999), foi isolada e utilizada neste trabalho. A citolisina conhecida como equinatoxina-II (EqTx-II) foi isolada da anêmona do mar *Actinia eqüina* e clonada em *E. coli* por Anderluh et al. (1996). Esta cepa de *E. coli* foi gentilmente doada (Dr. G. Anderluh) ao nosso grupo e cultivada para a obtenção da EqTx-II recombinante. Neste trabalho foi investigado se a EqTx-II recombinante também apresenta a ação neurosecretora demonstrada pela toxina Bc2 (Migues et al., 1999; Alés et al., 2000) .

A transmissão sináptica é iniciada quando um potencial de ação induz a liberação de neurotransmissores de um terminal nervoso pré-sináptico. O potencial de ação abre canais de Ca^{2+} -dependentes de voltagem, provocando o aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) que estimula a fusão de vesículas sinápticas ancoradas (Sudhof, 1995). A despolarização por KCl (33 mM) abre canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, induzindo o influxo de Ca^{2+} nos sinaptossomas, mobilizando as vesículas sinápticas, que liberam neurotransmissores na fenda (Sudhof, 1995). Várias citolisinas animais aumentam os níveis de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Zorec et al., 1990; Alés et al., 2000; Ashton et al., 2001; Soderbloom et al., 2002). A equinatoxina e a toxina Bc2 aumentaram os níveis de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Zorec et al., 1990; Alés et al., 2000). Os resultados deste trabalho demonstraram que a EqTx-II induziu a liberação de

glutamato sinaptossomal de modo dependente da concentração e do tempo de incubação; e confirmou os efeitos já conhecidos da toxina Bc2 (Migues et al., 1999). O primeiro trabalho a sugerir que as citolisinas de anêmonas do mar poderiam afetar a neurotransmissão foi publicado por Khoo et al. (1995). Estes autores demonstraram que o pré-tratamento de sinaptossomas de ratos com as citolisinas magnificalisinas (extraídas da anêmona do mar *Heteractis magnífica*) e EqTx-II inibiram a captação de GABA e colina, por um mecanismo desconhecido. Entretanto, analisando o protocolo experimental e os resultados obtidos por Khoo et al. (1995), as citolisinas podem ter induzido a liberação desses neurotransmissores, resultando em uma menor quantidade deles no interior dos sinaptossomas. Assim, isto pode ter sido interpretado como uma inibição da captação.

Os resultados deste trabalho mostraram que a ionomicina e a latrotoxina também induziram uma liberação de glutamato de maneira dependente da concentração e do tempo de incubação, o que está de acordo com os trabalhos de Ashton et al (2001) e Wang & Sihra (2004). A ionomicina é um conhecido ionóforo de cálcio que estimula o influxo de Ca^{2+} e a concomitante liberação de glutamato, independentemente da atividade dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, do potencial de membrana e de transportadores ou trocadores de íons (Bradford & Nadler, 2004). Por outro lado, a latrotoxina, a toxina obtida do veneno da aranha viúva negra, tem sido fundamental para o conhecimento de vários aspectos da neurotransmissão e da excitose. Ela é conhecida por induzir a liberação de vários neurotransmissores, por mecanismos distintos, como por exemplo: a liberação de noradrenalina requer Ca^{2+} ; a liberação de dopamina é parcialmente dependente de Ca^{2+} ; e a liberação de glutamato e GABA não requer Ca^{2+} (Khvotchev et al., 2000).

Os resultados deste trabalho demonstraram que a despolarização por KCl induziu a liberação (exocitótica) de glutamato, mesmo após o pré-tratamento dos sinaptossomas durante 1 minuto com a EqTx-II ou toxina Bc2 (1 μ g/ml), sugerindo que estas citolisinas não afetaram a viabilidade sinaptossomal e/ou a maquinária exocitótica. Estes resultados estão de acordo com Migues et al. (1999), no qual sinaptossomas de córtex de ratos incubados com a toxina Bc2 (10 e 50 μ g/ml) durante 15 minutos, não liberaram a enzima lactato

desidrogenase (LDH) no meio extracelular, um indicador de lise celular. Além disso, estes autores também haviam mostrado que o KCl foi capaz de induzir a liberação de glutamato após o pré-tratamento dos sinaptossomas durante 30 segundos com a toxina Bc2 (10 µg/ml) (Migues et al., 1999).

Trabalhos recentes demonstraram a participação da cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) que leva à ativação das proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1 e 2), no controle da liberação de neuropeptídeos, hormônios e aminas (Coxon et al., 2003; Park et al., 2005). O composto PD98059 é um inibidor específico da MEK (Dudley et al., 1995), que tem sido utilizado no estudo do envolvimento da via MAPK/ERK em vários eventos celulares (Atherfold et al., 1999; Egea et al., 1999; Jovanovic et al., 2000; Bloch-Shilderman et al., 2002; Pereira et al., 2002). Os resultados deste trabalho mostraram que a liberação sinaptossomal de glutamato induzida pelo KCl e pela ionomicina foi completamente bloqueada pelo pré-tratamento com PD98059. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Pereira et al. (2002) demonstrando que o PD98059 inibiu a liberação de glutamato em sinaptossomas hipocámpais estimulados por despolarização com KCl ou por ionomicina. Além disso, estes autores demonstraram que a ERK é fosforilada em resposta à despolarização por KCl de maneira dependente de cálcio (Pereira et al., 2002). Os resultados deste trabalho mostraram que o PD98059 reduziu a níveis basais a liberação de glutamato induzida por EqTx-II e toxina Bc2, sugerindo o envolvimento da via MAPK/ERK na ação neurosecretora destas citolisinas. Este efeito foi semelhante ao da toxina pardaxina, uma toxina isolada do peixe *Pardachirus marmoratus*, que aumenta os níveis de $[Ca^{2+}]_c$ e induz a exocitose de dopamina em células PC12 (Bloch-Shilderman et al., 2002). O PD98059 bloqueou a exocitose de dopamina induzida por pardaxina, sugerindo o envolvimento das ERKs na regulação da exocitose (Bloch-Shilderman et al., 2002). Estes autores sugerem um mecanismo para a ação secretora da pardaxina: o influxo de Ca^{2+} ativaria a enzima fosfolipase A_2 , gerando ácido araquidônico e derivados eicosanóides. Estes produtos facilitariam a formação do complexo SNARE, conseqüentemente induzindo a exocitose de dopamina (Bloch-Shilderman et al., 2002).

Além disso, os resultados deste trabalho mostraram que o pré-tratamento com PD98059 também reduziu a liberação de glutamato evocada pela latrotoxina. Este é o primeiro trabalho sugerindo a participação da via MAPK/ERK na liberação de neurotransmissores induzida por latrotoxina. Como o PD98059 afetaria a ação destas proteínas neurosecretoras? Jovanovic et al. (2000) demonstraram que a inibição da atividade da via MAPK/ERK por PD98059 diminuiu a fosforilação da sinapsina I e conseqüentemente reduziu a liberação de neurotransmissores.

Embora o mecanismo exato pelo qual a EqTx-II, toxina Bc2 e latrotoxina induzem a liberação de glutamato sinaptossomal via MAPK/ERK ainda não está esclarecido, uma possível explicação para esta ação é que estas citolisinas induzam o influxo de Ca^{2+} (Zorec et al., 1990; Meunier et al., 2000; Alés et al., 2000; Ashton et al., 2001). Vários trabalhos têm demonstrado que o aumento nos níveis de $[Ca^{2+}]_c$ em resposta à despolarização, estimulação dos receptores glutamatérgicos e ionóforos ativa a via MAPK/ERK (Atherfold et al., 1999; Egea et al., 1999; Pereira et al., 2002). Assim, EqTx-II, toxina Bc2 e latrotoxina que aumentam os níveis de $[Ca^{2+}]_c$ nos terminais nervosos, poderiam ativar a via MAPK/ERK e induzir a liberação de neurotransmissores.

Millán e colaboradores (2003) demonstraram que a ativação da PKC pode aumentar a liberação de neurotransmissores por vários mecanismos como: aumento na atividade dos canais de Ca^{2+} , inibição dos canais de K^+ , alterações na maquinária excitotóxica, aumento no "pool" de vesículas prontas e aumento da sensibilidade da maquinária de liberação ao Ca^{2+} . Vários experimentos mostraram que os ésteres de forbol (compostos derivados de plantas que ativam a PKC) aumentam o tamanho e o nível de reposição do "pool" de vesículas prontas para a exocitose em culturas de neurônios hipocâmpais e em células cromafins (Stevens & Sullivan, 1998). Algumas das proteínas do complexo SNARE, como a SNAP25 e a Munc18, contêm sítios de fosforilação para PKC (Morgan et al., 2005). Além disso, a aplicação de ésteres de forbol em diferentes culturas celulares (células cromafins, PC12 e neurônios hipocâmpais) induziu a fosforilação da SNAP25 (Gonelle-Gispert et al. 2002;

Nagy et al., 2003). Assim, o conjunto destes dados fornece evidências consistentes para o envolvimento da PKC na modulação da neurotransmissão.

Os resultados deste trabalho mostraram que a liberação de glutamato induzida por KCl foi parcialmente inibida pela estaurosporina (um inibidor não seletivo de PKC, que também inibe a PKA e a CaMKII; Yanagihara et al., 1991; Rasouly et al., 1992; Risso et al., 2004) e pela queleritrina (um inibidor específico de PKC). Coffey et al. (1993) observaram que uma facilitação da liberação de glutamato dependente de PKC ocorreu durante a despolarização induzida por 4-aminopiridina (um bloqueador de canais de K^+), mas não pela estimulação com altas concentrações de KCl. Mais recentemente, Cousin & Robinson (2000) demonstraram que a estaurosporina exerceu uma menor inibição sobre a liberação de glutamato induzida por KCl do que a induzida por 4-aminopiridina. De acordo com estes autores, existiriam dois mecanismos (para KCl e 4-aminopiridina) distintos de exocitose nos terminais sinápticos, que são diferentemente regulados pela PKC. Assim, na liberação de glutamato induzida por KCl ocorreria a fusão completa das vesículas sinápticas e esta seria pouco dependente da PKC (Cousin & Robinson, 2000). A liberação de glutamato induzida por EqTx-II e toxina Bc2 foi inibida pelo pré-tratamento dos sinaptossomas com estaurosporina. Entretanto, a queleritrina não afetou a liberação de glutamato sinaptossomal induzida por estas citolisinas, sugerindo que a ação neurosecretora induzida por EqTx-II e toxina Bc2 ocorre de modo independente da PKC. Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho de Risso et al (2004), no qual a estaurosporina e o H89 (um inibidor seletivo de PKA) inibiram a liberação de noradrenalina sinaptossomal induzida por NMDA e nicotina. No entanto, quando estes autores utilizaram o Ro 31-8220, um inibidor seletivo de PKC, a liberação de noradrenalina não foi afetada (Risso et al, 2004). Assim, o efeito provocado pela estaurosporina, um inibidor não seletivo de proteínas quinases, seria devido à inibição da PKA ou da cAMKII. Isto foi confirmado quando estes autores inibiram a liberação de noradrenalina induzida por NMDA e nicotina com o H89.

Os resultados deste trabalho mostraram que o H89 bloqueou totalmente a liberação de glutamato induzida pela EqTx-II e toxina Bc2. Como a PKA e a PKC coexistem nos

terminais nervosos do córtex cerebral (Millán et al., 2003), pode ser sugerido que a inibição da liberação de glutamato causada pela estaurosporina foi devido ao bloqueio da PKA e não da PKC, já que a queleritirina, um inibidor específico de PKC não afetou a liberação induzida por EqTx-II e toxina Bc2. Portanto, a liberação de glutamato induzida por estas citolisinas parece ser mediada pela PKA, uma via conhecida por potencializar a transmissão sináptica, aumentando a liberação de glutamato em várias preparações neuronais, como fatias hipocámpicas e sinaptossomas (Millán et al., 2003). Neste trabalho, o H89 inibiu em cerca de 65% a liberação de glutamato sinaptossomal induzida por KCl, um resultado semelhante aos obtidos por Grilli e colaboradores (2004), nos quais a liberação de glutamato sinaptossomal induzida por KCl foi inibida em 50% pelo H89. De acordo com estes autores, a liberação de glutamato dependente de Ca^{2+} induzida pela despolarização com KCl consiste de dois componentes: um diretamente ligado à entrada de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDV), e um componente indireto através da via adenilato ciclase (AC)/cAMP/PKA/CCDV (Grilli et al., 2004).

A proteína fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) regula a síntese proteica, a migração celular, a mitogênese e participa de vias anti-apoptóticas (Brunet et al., 2001; Cantrell et al., 2001; Maffucci et al., 2005). Os produtos lipídicos da PI3K fosforilam e ativam a proteína quinase B (PKB), também conhecida como Akt, que como uma proteína quinase lipídica aumenta o conteúdo de fosfoinosítídeos fosforilados na membrana (Cantrell et al., 2001). Contudo, o envolvimento direto desta proteína quinase e de seus produtos lipídicos na neuroexocitose tem sido questionado, com base em vários resultados mostrando nenhuma ou pouca inibição da exocitose sinaptossomal pelos seus inibidores seletivos, wortmanina e LY294002 (Chasserot-Golaz et al., 1998; Meunier et al., 2005; Milosevic et al., 2005). Amino e colaboradores (2002) demonstraram que o NGF (fator de crescimento do nervo) potencializou a liberação de dopamina induzida por despolarização com KCl em células PC12. A liberação de dopamina foi inibida por PD98059 e LY294002, indicando que a ativação das vias MAPK e PI3K foi necessária para o efeito do NGF. Entretanto, como neste trabalho a liberação de glutamato induzida por despolarização com KCl, EqTx-II e toxina Bc2 não foi afetada pelo

LY294002, estes resultados sugerem que o efeito neurosecretor induzido pela despolarização com KCl e por estas citolisinas é independente da participação da PI3K.

Os níveis de Ca^{2+} têm um papel fundamental na regulação da função dos terminais nervosos, através da ativação de enzimas dependentes de calmodulina, como as proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKs) (Lennders & Sheng, 2005). A CaMKII fosforila várias proteínas envolvidas no tráfego, armazenamento e fusão de grânulos secretores de insulina, como: sinapsina I, proteína 2 associada a microtúbulos (MAP2), proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida (NSF), proteína de ancoramento ao NSF solúvel (SNAP), proteína de membrana associada à vesícula (VAMP ou sinaptobrevina), α -SNAP, SNAP-25 e sinaptotagmina (Soderling et al., 2001). No cérebro, a CaMKII- α está presente em vesículas sinápticas e desempenha um papel importante na regulação da liberação de neurotransmissores, via fosforilação da sinapsina I (Yamamoto et al., 2003). O papel da CaMKII na exocitose já havia sido demonstrado por Sihra & Pearson (1995), em um trabalho no qual KN-62, um inibidor específico da CaMKII, diminuiu a liberação de glutamato sinaptossomal induzida por despolarização com KCl e 4-aminopiridina. O KN-62 também inibiu a secreção de pepsinogênio estimulada pelo ionóforo de cálcio ionomicina em células gástricas de cobaias (Okayama et al., 1995). Além disso, estes autores observaram um aumento da CaMKII autofosforilada no citoplasma das células estimuladas com ionomicina (Okayama et al., 1995). Neste trabalho foi demonstrado que o pré-tratamento com o KN-62, inibiu a liberação de glutamato sinaptossomal induzida por EqTx-II e toxina Bc2, sugerindo a participação da CaMKII na neurosecreção induzida por estas citolisinas. De acordo com Vogel (1994) e Agell et al. (2000), o aumento dos níveis de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ativa as proteínas CaMKs. Assim, o envolvimento da CaMKII na liberação de glutamato provocado por estas citolisinas seria explicado pelo influxo de Ca^{2+} induzido pela EqTx-II (Zorec et al., 1990; Meunier et al., 2000) e toxina Bc2 (Alés et al., 2000).

Méndez-Samperio et al. (2006) demonstraram que em monócitos tratados com *Mycobacterium bovis* bacillus (BCG), a mobilização do Ca^{2+} levou à ativação da calmodulina e da PKA, que induziram a ativação da ERK1/2. Outro mecanismo conhecido para a

ativação da PKA é a estimulação da proteína G que pode levar ao aumento nos níveis de cAMP, seguido da ativação desta proteína quinase (Stork & Schmitt, 2002). A ação secretora da latrotoxina (Ushkaryov, 2002) e do peptídeo citolítico mastoparan (Klinker et al., 1996) é mediada pela estimulação de receptores pré-sinápticos acoplados à proteína G. Entretanto, ainda não é conhecido se a EqTx-II ou a toxina Bc2 podem ativar a proteína G. Neste trabalho não foram analisadas as possíveis integrações ("upstream" e "downstream") entre as vias de sinalização envolvidas na ação neurosecretora destas citolisinas. Contudo, o aumento nos níveis de $[Ca^{2+}]_c$ e de cAMP pela EqTx-II e toxina Bc2, poderia ativar a CaMKII e a PKA, respectivamente. Estas proteínas levariam à ativação da MAPK/ERK (Duca et al., 2003; Schmitt et al., 2004; Bluem & Konnerth, 2005; Méndez-Samperio et al., 2006) e induziriam a liberação de glutamato em sinaptossomas.

Finalmente, foi investigado se o glutamato liberado pelas citolisinas EqTx-II e toxina Bc2 tem origem citosólica ou vesicular. Para isto, foi utilizada a bafilomicina, um composto que bloqueia a exocitose vesicular (Cousin et al., 1995) pela inibição da bomba H^+ -ATPase da vesícula sináptica (Bowman et al., 1988). Esta bomba mantém o potencial eletroquímico na membrana da vesícula sináptica responsável pela acumulação e retenção dos aminoácidos ácidos nas vesículas (Maycox et al., 1990). O pré-tratamento dos sinaptossomas com bafilomicina reduziu a liberação de glutamato induzida por KCl. Este resultado está de acordo com o trabalho de Bradford & Nadler (2004), que demonstraram que a bafilomicina inibiu a liberação de glutamato evocada por KCl e 4-aminopiridina, dois estímulos conhecidos por induzirem a despolarização da membrana e a liberação vesicular de neurotransmissores (exocitose). No presente trabalho, o pré-tratamento dos sinaptossomas com bafilomicina mostrou dois efeitos distintos dependentes do tempo de incubação com as citolisinas: i) não afetou a quantidade de glutamato liberado durante a incubação de 1 minuto com EqTx-II e toxina Bc2; ii) reduziu a quantidade de glutamato liberado pela incubação prolongada (5 minutos) com EqTx-II e toxina Bc2. Estes resultados sugerem que a liberação rápida (1 minuto) de glutamato seria citosólica, mas um estímulo prolongado com as citolisinas provocaria a liberação de glutamato também vesicular. Estes

resultados não estão de acordo com o efeito da latrotoxina na liberação sinaptossomal de GABA (Linetska et al., 2004). Estes autores demonstraram que o pré-tratamento dos sinaptossomas com bafilomicina inibiu a liberação sinaptossomal de GABA induzida pela incubação com latrotoxina durante 2 minutos, mas não teve efeito sobre a liberação induzida por latrotoxina em uma incubação de 5 minutos. Foi sugerido que a latrotoxina estimularia a liberação de GABA por dois processos: i) uma liberação rápida, de não mais que 2 minutos, ocorreria por um processo excitatório; ii) uma liberação prolongada (cerca de 5 minutos), que seria não vesicular e causada devido à formação de poros pela latrotoxina na membrana sinaptossomal (Linetska et al., 2004). A liberação de catecolaminas induzida pela toxina Bc2 em células cromafins também apresentou dois padrões diferentes de secreção, dependente do tempo de incubação e da concentração da toxina Bc2 (Ales et al., 2000). Uma liberação rápida e "massiva" foi induzida pela incubação prolongada da toxina Bc2, que parecia provocar a liberação de vesículas ancoradas e prontas ("docked and releasable") na membrana. Contudo, as células cromafins utilizadas nestes experimentos não possuem um "pool" citosólico de catecolaminas e os resultados deste trabalho podem esclarecer apenas se a liberação é ou não excitatória. Entretanto, a liberação de glutamato em sinaptossomas induzida pelas citolisinas poderia ocorrer via a formação de poros na membrana e/ou uma interação com a maquinaria de excitação.

A liberação de neurotransmissores envolve a formação de um complexo composto de proteínas SNARE, formado pela proteína vesicular VAMP ou sinaptobrevina, e pelas proteínas de membrana sintaxina e SNAP-25 (Sollner et al., 2003). Várias das proteínas envolvidas no ciclo das vesículas sinápticas e que participam na formação do complexo SNARE podem ser "alvo" de toxinas (Montecucco & Schiavo, 2005). Em mamíferos, as proteínas VAMP-1 e -2 são clivadas pelas toxinas tetânica (TeTx), e botulínica (BoNT). A SNAP-25 e a sintaxina são clivadas por toxina botulínica (Montecucco & Schiavo, 2005). A toxina tetânica age prevenindo a fusão das vesículas ancoradas com a membrana plasmática nos terminais nervosos, bloqueando os eventos excitatórios em várias células

neuronal (Humeau et al., 2000). No presente trabalho, o pré-tratamento dos sinaptossomas com toxina tetânica foi realizado durante 40 minutos, tempo necessário para que a toxina clive as proteínas de ancoramento da vesícula na membrana sinaptossomal (Montecucco & Schiavo, 1995). A liberação de glutamato induzida pela incubação dos sinaptossomas com KCl durante 1 e 5 minutos foi inibida pelo pré-tratamento com TeTx. Estes resultados estão de acordo com Bradford & Nadler (2004), no qual sinaptossomas hipocâmpais pré-tratados com as toxinas botulínicas e tetânicas reduziram em mais de 50% a exocitose de glutamato induzida por altas concentrações de K^+ e 4-aminopiridina. Entretanto, a TeTx afetou apenas a liberação de glutamato induzida pela incubação de EqTx-II e toxina Bc2 durante 5 minutos. Estes resultados foram semelhantes e confirmam os dados obtidos no experimento com bafilomicina, e sugerem que a liberação induzida pelo estímulo rápida com EqTx-II e toxina Bc2 seria citosólica (não exocitótica). Assim, o glutamato presente no citosol poderia ser liberado através dos poros formados por estas citolisinas nas membranas sinaptossomais (Macek et al., 1994; Belmonte et al., 1993; Tejuca et al., 2001; Anderluh et al., 2003, 2005). Porém, na incubação prolongada de 5 minutos, a liberação de glutamato induzida por EqTx-II e toxina Bc2 seria exocitótica. O efeito da pardaxina na liberação de dopamina em células PC12 também foi inibido pela toxina botulínica em cerca de 90% (Bloch-Schildermann et al., 2001).

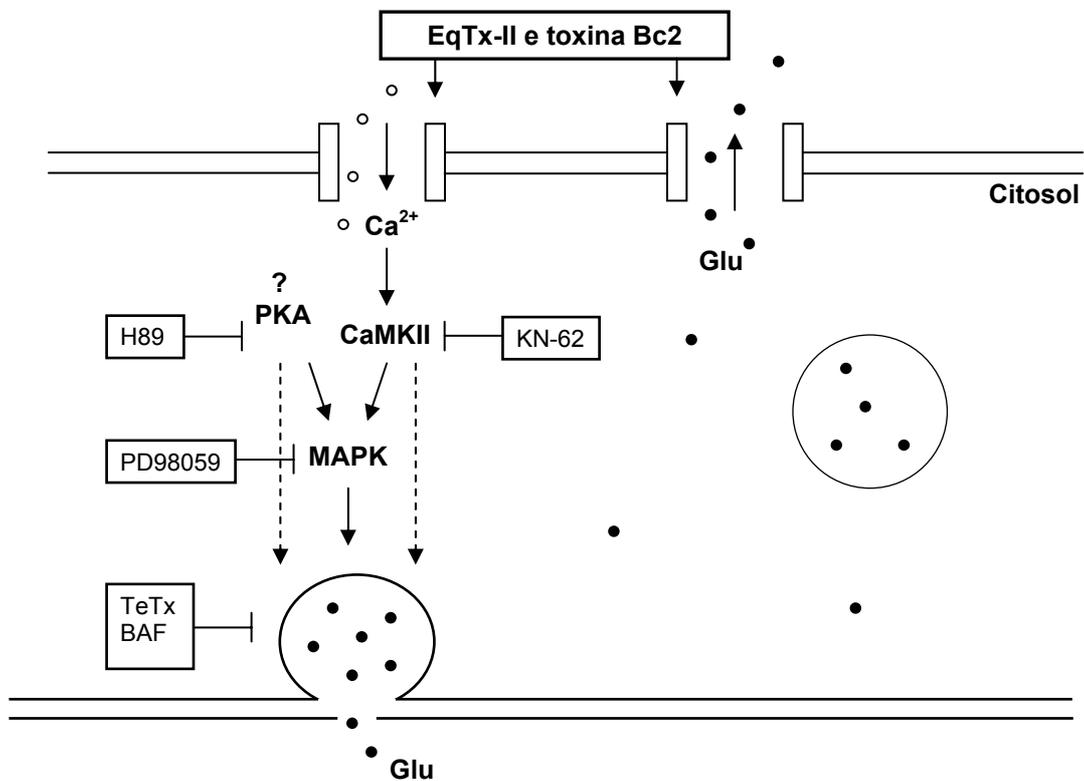


Figura 17. Modelo proposto para a ação da EqTx-II e toxina Bc2. Os poros formados por EqTx-II e toxina Bc2 induzem o influxo de Ca^{2+} , que ativa a CaMKII. PKA e CaMKII podem ativar a MAPK/ERK, induzindo a liberação de neurotransmissores. Ainda, o glutamato pode ser liberado através dos poros na membrana plasmática formados por EqTx-II ou toxina Bc2. H89, KN-62, PD98059, TeTx (toxina tetânica) e BAF (bafilomicina) inibem a liberação de glutamato induzida por E qTx-II e toxina Bc2.

Outros experimentos são necessários para uma melhor compreensão do mecanismo de liberação induzido pela EqTx-II e toxina Bc2. Entretanto, os resultados obtidos sugerem que estas citolisinas poderiam atuar seletivamente sobre diferentes "pools" de neurotransmissores, e que o estudo do seu mecanismo de ação poderia vir a auxiliar a compreensão da exocitose, como vem sendo demonstrado pela latrotoxina (Ashton et al., 2001).

Concluindo, os resultados deste trabalho mostraram que a liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela EqTx-II e toxina Bc2 seria mediada pela vias de sinalização celular das proteínas quinases MAPK/ERK, PKA e CaMKII. Além disso, EqTx-II e toxina Bc2 parecem induzir dois mecanismos distintos de liberação de glutamato, citosólica e excitotica, dependente do tempo de incubação com os sinaptossomas. Estes resultados reforçam a possibilidade de utilização destas citolisinas marinhas como ferramentas para o estudo da liberação vesicular e não-vesicular de neurotransmissores em preparações neurais e em células secretórias.

7. CONCLUSÕES

- Equinatoxina-II (EqTx-II) induziu a liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de camundongos, de uma maneira dependente da concentração e do tempo de incubação;
- EqTx-II e toxina Bc2 não alteraram a maquinaria de excitose celular, mantendo a célula capaz de liberar glutamato em resposta à despolarização por KCl mesmo após o pré-tratamento com estas citolisinas;
- As proteínas MAPK/ERK, PKA e CaMKII parecem estar envolvidas na liberação de glutamato induzida por EqTx-II e toxina Bc2;
- O glutamato liberado em resposta ao estímulo rápido (1 minuto) dos sinaptossomas com EqTx-II ou toxina Bc2 parece ter origem citosólica e não depender da maquinaria excitotica. Já a liberação induzida pelas citolisinas durante 5 minutos tem origem também vesicular, e parece ser excitotica;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGELL, N., BACHS, O., ROCAMORA, N., VILLALONGA, P. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca^{2+} , and calmodulin. **Cell Signal.** 14, 629–654, 2000.
- AKTORIES, K. Rho proteins: targets for bacterial toxins. **Trends Microbiol.** 5, 282–288, 1997.
- ALÉS, E., GABILAN, N.H., CANO-ABAD, M.F., GARCIA, A.G., LOPEZ, M.G. The sea anemone toxin Bc2 induces continuous or transient exocytosis, in the presence of sustained levels of high cytosolic Ca^{2+} in chromaffin cells. **J. Biol. Chem.** 275, 37488-37495, 2000.
- ALESSI, D.R., CUENDA, A., COHEN, P., DUDLEY, D.T., SALTIEL, A.R. PD98059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activation protein kinase kinase in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem.** 270, 27489-27494, 1995.
- AMINO, S., ITAKURA, M., OHNISHI, H., TSUJIMURA, J., KOISUMI, S., TAKEI, M., TAKAHASHI, M. Nerve growth factor enhances neurotransmitter release from PC12 cells by increasing Ca^{2+} -responsible secretory vesicles through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase. **J. Biochem.** 131: 887-894, 2002.
- ANDERLUH, G., PUNGERIMAGEAR, J., IMAGETRUKELJ, B., MAIMAGEEEK, P., GUBENIMAGEEEK, F. The coding region of the equinatoxin II gene lacks introns. **Croat. Chem. Acta** 68, 533–542, 1995.
- ANDERLUH, G., PUNGERCAR, J., STRUKELJ, B., MACEK, P., GUBENSEK, F. Cloning, sequencing and expression of equinatoxin II. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 220, 437-442, 1996.
- ANDERLUH, G., MACEK, P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). **Toxicon** 40, 111-124, 2002.
- ANDERLUH, G., DALLA SERRA, M., VIERO, G., MACEK, P., MENESTRINA, G. Pore formation by equinatoxin II, a eukaryotic protein toxin, occurs by induction of nonlamellar lipid structures. **J. Biol. Chem.** 278, 45216-45223, 2003.

ANDERLUH, G., RAPOZTNIK, A., PODLESEK, Z., MACEK, P., SEPAROVIC, F., NORTON, R.S. Interaction of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II with model membranes: ^{19}F NMR studies. **J. Mol. Biol.** 347, 27-39, 2005.

ANEIROS, A., GARCIA, I., MARTINEZ, J. R., HARVEY, A. L., ANDERSON, A. J., MARSHALL, D. L., ENGSTROM, A., HELLMAN, U., KARLSSON, E. A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. **Biochim. Biophys. Acta.** 1157, 86-92, 1993.

ASHTON, A. C., VOLINSKY, K. E., LELIANOVA, V.G., ORLOVA, E. V., VAN RENTERGHEM, C., CANEPARI, M., SEAGAR, M., USHKARYOV, Y. A. α -Latrotoxin, acting via two Ca^{2+} -dependent pathways, triggers exocytosis of two pools of synaptic vesicles. **J. Biol. Chem.** 276, 44695-446703, 2001.

ATHANASIADIS, A., ANDERLUH, G., MAIMAGEEK, P., TURK, D. Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina*. **Structure** 9, 341-346, 2001.

ATHERFOLD, P. A., NORRIS, M. S., ROBINSON, P. J., GELFAND, E. W., FRANKLIN, R. A. Calcium-induced ERK activation in human-T lymphocytes. **Mol. Immunol.** 36, 543-549, 1999.

ATLURI, P. P., REGEHR, W. G. Delayed release of neurotransmitter from cerebellar granule cells. **J. Neurosci.** 18, 14-8227, 1998.

AVILA, A. D., MATEO DE ACOSTA, C., LAGE, A. A new immunotoxin built by linking a hemolytic toxin to a monoclonal antibody specific for immature T lymphocytes. **Int. J. Cancer** 142, 568-571, 1988.

BALIKIAN, R.V., ZIMBLER, M.S. Primary and adjunctive uses of botulinum toxin type A in the periorbital region. **Facial Plast. Surg. Clin. North Am.** 13, 583-590, 2005.

BARRET, E. F., STEVENS, C. F. Quantal independence and uniformity of presynaptic release kinetics at the frog neuromuscular junction. **J. Physiol.** 227, 665-689, 1972.

BATISTA, U., SENTJURC, M. EPR study of the sea anemone cytolyisin, equinatoxin II, cytotoxicity on V-79 cells. **Cell. Biol. Int.** 19, 215-222, 1995.

BELMONTE, G., PEDERZOLLI, C., MACEK, P., MENESTRINA, G. Pore formation by the sea anemone cytolyisin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. **J. Membr. Biol.** 131, 11-22, 1993.

BIRNBAUMER, L., CAMPBELL, K. P., CATTERALL, W. A., HARPOLD, M. M., HOFMANN, F., HORNE, W. A., MORI, Y., SCHWARTZ, A., SNUTCH, T. P., TANABLE, T. The naming of voltage-gated calcium channels. **Neuron** 13, 505-506, 1994.

BLOCH-SHILDERMAN, E., ABU-RAYA, S., TREMBOVLER, V., BOSCHWITZ, H., GRUZMAN, A., LINIAL, M., LAZAROVICI, P. Pardaxin stimulation of phospholipases A₂ and their involvement in exocytosis in PC12 cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 301, 953-961, 2002.

BLUM, R., KONNERTH, A. Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. **Physiology** 20, 70-78, 2005.

BOSMANS, F., ANEIROS, A., TYTGAT, J. The sea anemone *Bunodosoma granulifera* contains surprisingly efficacious and potent insect-selective toxins. **FEBS Lett.** 532, 131-134, 2002.

BRADFORD, S. E., NADLER, J. V. Aspartate release from rat hippocampal synaptosomes. **Neuroscience** 128, 751-765, 2004.

BRASHEAR, A. The safety and tolerability of botulinum toxins for the treatment of cervical dystonia. **Expert. Opin. Drug Saf.** 4, 241-249, 2005.

BRUNET, A., DATTA, S. R., GREENBERG, M. E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. **Curr. Opin. Neurobiol.** 11, 297-305, 2001.

CAI, Z., SAUGSTAD, J. A., SORENSEN, S. D., CIOMBOR, K. J., ZHANG, C., SCHAFFHAUSER, H., HUBALEK, F., POHL, J., DUVOISIN, R. M., CONN, P. J. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates group III metabotropic glutamate receptors and inhibits their function as presynaptic receptors. **J. Neurochem.** 78, 756-766, 2001.

CANTRELL, D. A. Phosphoinositide-3-kinase signalling pathways. **J. Cell Sci.** 114, 1439-1445, 2001.

CHASSEROT-GOLAZ, S., HUBERT, P., THIERSE, D., DIRRIG, S., VLAHOS, C. J., AUNIS, D., BADER, M. F. Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in regulated exocytosis: studies in chromaffin cells with inhibitor LY294002. **J. Neurochem.** 70, 2347-2356, 1998.

CHEVALEYRE, V., CASTILLO, P. E. Assessing a role of Ih channels in synaptic transmission and mossy fiber LTP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99, 9538-9543, 2002.

CHHEDA, M. G., ASHERY, U., THAKUR, P., RETTIG, J., SHENG, Z. H. Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. **Nature Cell Biol.** 3, 331-338, 2001.

CHIE, P., GREENGARD, P., RYAN, T.A. Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. **Neuron** 38, 69-78, 2003.

COFFEY, E. T., SIHRA, T. S., NICHOLLS, D. G. Protein kinase C and the regulation of glutamate exocytosis from cerebrocortical synaptosomes. **J. Biol. Chem.** 268, 21060-21065, 1993.

CONTI, F., WEINBERG, R. J. Shaping excitation at glutamatergic synapses. **Trends Neurosci.** 22, 451-458, 2002.

COUSIN, M. A., HELD, B., NICHOLLS, D. G. Exocytosis and selective neurite calcium responses in rat cerebellar granule cells during field stimulation. **Eur. J. Neurosci.** 7, 2379-2388, 1995.

COUSIN, M. A., ROBINSON, P. J. Two mechanisms of synaptic vesicle recycling in rat brain nerve terminals. **J. Neurochem.** 75, 1645-1653, 2000.

COXON, P. Y., RANE, M. J., URIARTE, S., POWELL, D. W., SINGH, S., BUTT, W., CHEN, Q., MCLEISH, K. R. MAPK-activated protein kinase-2 participates in p38 MAPK-dependent and ERK-dependent functions in human neutrophils. **Cell Signal.** 15, 993-1001, 2003.

DAVLETOV, F. A., MEUNIER, F. A., ASHTON, A. C., MATSUSHITA, H., HIRST, W. D., LELIANOVA, V. G., WILKIN, G. P. DOLLY, J. O., USHKARYOV, J. A. Vesicle exocytosis stimulated by alpha-latrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and stored Ca^{2+} . **EMBO J.** 17, 3909-3920, 1998.

DE ROBERTIS, E., RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ, G., PELLEGRINO DE IRALDI, A. Isolation of synaptic vesicles from nerve endings of the rat brain. **Nature** 26, 794-795, 1962.

DE LOS RIOS, V., ONADERRA, M., MARTÍNEZ-RUIZ, A., LACADENA, J., MANCHENO, J. M., DEL POZO, A. M. AND GAVILANES, J. G. Overproduction in *Escherichia coli* and purification of the hemolytic protein sticholysin II from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **Protein Expr. Purif.** 18, 71-76, 2000.

DIETRICH, D., KIRSCHSTEIN, T., KUKLEY, M., PEREVERSEV, A., VON DER BRELIE, C., SCHNEIDER, T., BECK, H. Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca^{2+} channels. **Neuron** 39, 483-496, 2003.

DIOCHOT, S., SCHWEITZ, H., BERESS, L., LAZDUNSKI, M. Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. **J. Biol. Chem.** 273, 6744-6749, 1998.

DUCA, L., DEBELLE, L., DEBRET, R., ANTONICELLI, F., HORNEBECK, W., WAYE, B. The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling. **FEBS Lett.** 524, 193-198, 2002.

DUDLEY, D. T., PANG, L., DECKER, S. J., BRIDGES, A. J., SALTIEL, A. R., A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 92, 7686-7689, 1995.

DULUBOVA, I., SUGITA, S., HILL, S., HOSAKA, M., FERNANDEZ, I., SUDHOF, T. C., RIZO, J. A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. **EMBO J.** 18, 4372-4382, 1999.

DUNKLEY, P. R., HEATH, J. W., HARRISON, S. M., JARVIE, P. E., GLENFIELD, P. J., ROSTAS, J. A. 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, 1988.

EGEA, J., ESPINET, C., COMELLA, J.X. Calcium influx activates extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase pathway through a calmodulin-sensitive mechanism in PC12 cells. **J. Biol. Chem.** 274, 75-85, 1999.

GALLI, T., HAUCKE, V. A model for fast-track exocytosis of synaptic vesicles. **Sci. STKE.** 267, tr2, 2005.

GALLWITZ, D., JAHN, R. The riddle of the Sec1/Munc-18 proteins - new twists added to their interactions with SNAREs. **Trends Biochem. Sci.** 28, 113-116, 2003.

GONELLE-GISPERS, C., COSTA, M., TAKAHASHI, M., SADOUL, K., HALBAN, P. Phosphorylation of SNAP-25 on serine-187 is induced by secretagogues in insulin-secreting cells, but is not correlated with insulin secretion. **Biochem. J.** 15, 223-232, 2002.

GOGGI, J., PULLAR, I. A., CARNEY, S. L., BRADFORD, H. F. Signalling pathways involved in the short-term potentiation of dopamine release by BDNF. **Brain Res.** 968, 156-161, 2003.

GREENGARD, P., VALTORTA, F., CZERNIK, A. J., BENFENATI, F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. **Science** 259, 780-785, 1993.

GRILLI, M., RAITERI, L., PITTALUGA, A. Somatostatin inhibits glutamate release from mouse cerebrocortical nerve endings through presynaptic sst₂ receptors linked to the adenylyl cyclase-protein kinase A pathway. **Neuropharmacology** 46, 388-396, 2004.

GU, L. Q., CHELEY, S., BAYLEY, H. Prolonged residence time of a noncovalent molecular adapter, beta-cyclodextrin, within the lumen of mutant alpha-hemolysin pores. **J. Gen. Physiol.** 118, 481-494, 2001.

HAGLER, D. J. Jr., GODA, Y. Properties of synchronous and asynchronous release during pulse train depression in cultured hippocampal neurons. **J. Neurophysiol.** 85, 2324-2334, 2001.

HARVEY, A.L. Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. **Gen. Pharmacol.** 28, 7-12, 1997.

HERREROS, J., SCHIAVO, G. Lipid microdomains are involved in neurospecific binding and internalisation of clostridial neurotoxins. **Int. J. Med. Microbiol.** 291, 447-453, 2002.

HO, C. L., KO, J. L., LUE, H. M., LEE, C. Y., FERLAN, I. Effects of equinatoxin on the guinea-pig atrium. **Toxicon** 25, 659–664, 1987.

HUMEAU, Y., DOUSSAU, F., GRANT, N. J., POULAIN, B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. **Biochimie** 82, 427-446, 2000.

HYMAN, S. E. Neurotransmitters. **Curr. Biol.** 15, 154-158, 2005.

JOVANOVIĆ, J.N., CZERNIK, A.J., FIENBERG, A.A., GREENGARD, P., SIHRA, T.S. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. **Nat. Neurosci.** 3, 323-329, 2000.

KHOO, H.E., LIM, J.P., TAN, C.H. Effects of sea anemone (*Heteractis magnifica* and *Actinia equina*) cytolytic toxins on synaptosomal uptake of GABA and choline. **Toxicon** 33, 1365-1371, 1995.

KHVOTCHEV, M., LONART, G., SUDHOF, T.C. Role of calcium in neurotransmitter release evoked by alpha-latrotoxin or hypertonic sucrose. **Neuroscience** 101, 793-802, 2000.

KLINKER, J. F., LAUGWITZ, K. L., HAGELUKEN, A., SEIFERT, R. Activation of GTP formation and high-affinity GTP hydrolysis by mastoparan in various cell membranes. G-protein activation via nucleoside diphosphate kinase, a possible general mechanism of mastoparan action. **Biochem. Pharmacol.** 51, 217-23, 1996.

KURINO, M., FUKUNAGA, K., USHIO, Y., MIYAMOTO, E. Activation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat hippocampal neurons by stimulation of glutamate receptors. **J. Neurochem.** 65, 1282-1289, 1995.

LEENDERS, A. G. M., SHENG, Z. H. Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases: implications for presynaptic plasticity. **Pharmacol. Ther.** 105, 69-84, 2005.

LINETSKA, M. V., STORCHAK, L. G., TARASENKO, A. S., HIMMELREICH, N. H. Involvement of membrane GABA transporter in α -latrotoxin-stimulated [3 H]GABA release. **Neurochem. Int.** 44, 303-312, 2004.

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

MAFFUCCI, T., COOKE, F. T., FOSTER, F. M., TRAER, C. J., FRY, M. J., FALASCA, M. Class II phosphoinositide 3-kinase defines a novel signaling pathway in cell migration. **J. Cell. Biol.** 169, 789-799, 2005.

MALOVRH, P., VIERO, G., SERRA, M. D., PODLEZEK, Z., LAKEY, J. H., MACEK, P., MENESTRINA, G., ANDERLUH, G. A novel mechanism of pore formation: membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of equinatoxin. **J. Biol. Chem.** 278, 22678-22685, 2003.

MATSUMOTO, T., NUMAKAWA, T., ADACHI, N., YOKOMAKU, D., YAMAGISHI, S., TAKEI, N., HATANAKA, H. Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release in cultured cortical neurons. **J. Neurochem.** 79, 522-530, 2001

MAYCOX, P. R., HELL, J. W., JANH, R. Amino acid neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. **Trends Neurosci.** 13, 83-7, 1990.

MÉNDEZ-SAMPERIO, P., TREJO, A., MIRANDA, E. Activation of ERK1/2 and TNF- α production are mediated by calcium/calmodulin, and PKA signaling pathways during *Mycobacterium bovis* infection. **J. Infect.** 52, 147-153, 2006.

MEUNIER, F.A., FRANGEZ, R., BENOIT, T, E., OUANOUNOU, G., ROUZARIE-DUBOIS, B., SUPUT, D., MOLGO, J. Ca^{2+} and Na^{+} contribute to the swelling of differentiated neuroblastoma cells induced by equinatoxin-II. **Toxicon** 38, 1547-1560, 2000.

MEUNIER, F. A., OSBORNE, S. L., HAMMOND, G. R., COOKE, F. T., PARKER, P. J., DOMIN, J., SCHIAVO, G. Phosphatidylinositol 3-kinase C $_2$ α is essential for ATP-dependent priming of neurosecretory granule exocytosis. **Mol. Biol. Cell.** 16, 4841-4851, 2005.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J. Nutr.** 130, 1007-10015, 2000.

MIGUES, P.V., LEAL, R.B., MANTOVANI, M., NICOLAU, M., GABILAN, N.H. Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. **Neuroreport** 10, 67-70, 1999.

MILLÁN, C., TORRES, M., SÁNCHEZ-PRIETO, J. Co-activation of PKA and PKC in cerebrocortical nerve terminals synergistically facilitates glutamate release. **J. Neurochem.** 87, 1101-1111, 2003.

MILOSEVIC, I., SORENSEN, J. B., LANG, T., KRAUSS, M., NAGY, G., HAUCKE, V., JAHN, R., NEHER, E. Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. **J. Neurosci.** 25, 2557-2565, 2005.

MONTECUCCO, C., SCHIAVO, G., PANTANO, S. SNARE complex and neuroexocytosis: how many, how close? **Trends Biochem. Sci.** 30, 367-372, 2005.

MORGAN, A., BURGOYNE, R. D., BARCLAY, J. W., CRAIG, T. J., PRESCOTT, G. R., CIUFO, L. F., EVANS, G. J., GRAHAM, M. E. Regulation of exocytosis by protein kinase C. **Biochem. Soc. Trans.** 33, 1341-1344, 2005.

NAGY, G., MATTI, U., NEHRING, R. B., BINZ, T., RETTING, J., NEHER, E., SORENSERN, J. B. Protein kinase C-dependent phosphorylation of synaptosome-associated protein of 25 kDa at Ser187 potentiates vesicle recruitment. **J. Neurosci.** 22, 9278-9286, 2003.

NESTLER, S., HYMAN, E., MALENKA, R. J. Molecular Neuropharmacology: Foundation for Clinical Neuroscience, **McGraw Hill**, New York, 2003.

NICHOLLS, D., SNELLING, R., DOLLY, O. Bioenergetic actions of beta-bungarotoxin, dendrotoxin and bee-venom phospholipase A₂ on guinea-pig synaptosomes. **Biochem J.** 229, 653-662, 1985.

NICHOLLS, D.G. Bioenergetics and transmitter release in the isolated nerve terminal. **Neurochem Res.** 28, 1433-1441, 2003.

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

OKAYAMA, N., ITOH, M., JOH, T., MIYAMOTO, T., TAKEUCHI, T., SUZUKI, T., MORIYAMA, A., KATO, T. Mediation of pepsinogen secretion from guinea pig chief cells by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. **Biochim. Biophys. Acta** 1268, 123-129, 1995.

OKKENHAUG, K., VANHAESEBROECK, B. New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha. **Sci. STKE**. 65, PE1, 2001.

PAGE, G., PEETERS, M., NAJIMI, M., MALOTEAUX, J. N., HERMANS, E. Modulation of the neuronal dopamine transporter activity by the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat striatal synaptosomes through phosphorylation mediated processes. **J. Neurochem.** 76, 1282-1290, 2001.

PANCHAL, R. G., SMART, M. L., BOWSER, D. N., WILLIAMS, D. A., PETROU, S. Pore-forming proteins and their application in biotechnology. **Curr. Pharm. Biotechnol.** 3, 99-115, 2002.

PARK, Y.S., JUN, D.J., HUR, E.M., LEE, S.K., SUH, B.S., KIM, K.T. Activity-dependent potentiation of large dense-core vesicle (LDCV) release modulated by MAPK/ERK signaling. **Endocrinology** 23, in press, 2005.

PARKER, M. W., FEIL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Prog. Biophys. Mol. Biol.** 88, 91-142, 2005.

PARKER, P. J., MURRAY-RUST, J. PKC at a glance. **J. Cell Sci.** 117, 131-132, 2004.

PEREIRA, D. B., CARVALHO, A. P., DUARTE, C. B. Non-specific effects of the MEK inhibitors PD098,059 and U0126 on glutamate release from hippocampal synaptosomes. **Neuropharmacology** 42, 9-19, 2002.

PROVODA, C. J., LEE, K. D. Bacterial pore-forming hemolysins and their use in the cytosolic delivery of macromolecules. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 41, 209-212, 2001.

RAITERI, L., GIOVEDI, S., BENFENATI, F., RAITERI, M., BONANNO, G. Cellular mechanisms of the acute increase of glutamate release induced by nerve growth factor in rat cerebral cortex. **Neuropharmacology** 44, 390-402, 2003.

RAMON, S. y CAJAL. Significación fisiológica de las expansiones protoplasmáticas y nerviosas de las células de la sustancia gris. **Re. Ciências Méd.**, Barcelona 22, 1-15, 1891.

RASOULY, D., RAHAMIM, E., LESTER, D., MATSUDA, Y., LAZAROVICI, P. Staurosporine-induced neurite outgrowth in PC12 cells is independent of protein kinase C inhibition. **Mol. Pharmacol.** 42, 35-43, 1992.

RISSO, F., GRILLI, M., PARODI, M., BADO, M., RAITERI, M., MARCHI, M. Nicotine exerts a permissive role on NMDA receptor function in hippocampal noradrenergic terminals. **Neuropharmacology** 47, 65-71, 2004.

RIZO, J., SUDHOF, T.C. SNARES and munc18 in synaptic vesicle fusion. **Nature** 3, 641-653, 2002.

ROSENTHAL, L., MELDOLESI, J. Alpha-latrotoxin and related toxins. **Pharmacol. Ther.** 42, 115-134, 1989.

ROSSETTO, O., SEVESO, M., CASSIN, P., SCHIAVO, G., MONTECUCCO, C. Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. **Toxicon** 39, 27-41, 2001.

ROTHMAN, J. E., WARREN, G. Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. **Curr. Biol.** 4, 220-233, 1994.

SABATINI, B. L., REGEHR, W. G. Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. **Nature** 384, 170-172, 1996.

SANTANA, A. N., TRINDADE-FILHO, E. M., CUNHA, R. B., SOUZA, M. V., CAVALHEIRO, E. A., CARVALHO, K. M. Behavioral and electroencephalographic analysis of seizures induced by intrahippocampal injection of granulitoxin, a neurotoxic peptide from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 34, 797-801, 2001.

SCHIAVO, G., VAN DER GOOT, F. G. The bacterial toxin toolkit. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 2, 530-537, 2001.

SCHMITT, J. M., WAYMAN, G. A., NOZAKI, N., SODERLING, T. R. Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I. **J. Biol. Chem.** 279, 24064-24072, 2004.

SIHRA, T. S., PEARSON, H. A. Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase II inhibitor KN62 attenuates glutamate release by inhibiting voltage-dependent Ca²⁺-channels. **Neuropharmacology** 34, 731-741, 1995.

SKET, D., DRASLAR, K., FERLAN, I., LEBEZ, D. Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina*. II. Pathophysiological action. **Toxicon** 12, 63-68, 1974.

SODERBLOOM, T., LAESTADIUS, A., OXHAMRE, C., APERIA, A., RICHTER-DAHLFORS, A. Toxin-induced calcium oscillations: a novel strategy to affect gene regulation in target cells. **Int. J. Med. Microbiol.** 291, 511-515, 2002.

SODERLING, T. R., CHANG, B., BRICKEY, D. Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. **J. Biol. Chem.** 276, 3719-3722, 2001.

SOLLNER, T., BENNETT, M. K., WHITEHEART, S. W., SCHELLER, R. H., ROTHMAN, J. E. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. **Cell** 75, 409-418, 1993.

SOLLNER, T.H., Regulated exocytosis and SNARE function. **Mol Membr Biol.** 20, 209-220, 2003.

SOLLNER, T., WHITEHEART, S. W., BRUNNER, M., ERDJUMENT-BROMAGE, H., GERONIANOS, S., TEMPST, P., ROTHMAN, J. E. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. **Nature** 362, 318-324, 1993.

STEVENS, C. F., SULLIVAN, J. M. Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. **Neuron** 21, 885-893, 1998.

STOJILKOVIC, S. S. Ca²⁺-regulated exocytosis and SNARE function. **Trends Endocrinol Metab.** 16, 81-83, 2005.

STORK, P. J., SCHMITT, J. M. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. **Trends Cell Biol.** 12, 258-266, 2002.

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

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

SUPUT, D., FRANGEZ, R., BUNC, M. Cardiovascular effects of equinatoxin III from the sea anemone *Actinia equina* (L.). **Toxicon** 39, 1421-147, 2001.

TAKAHASHI, M., ITAKURA, M., KATAOKA, M., New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: regulation of neurotransmitter release by phosphorylation. **J. Pharmacol. Sci.** 93, 41-45, 2003.

TEJUCA, M., ANDERLUH, G., MAIMAGEEK, P., MARCET, R., TORRES, D., SARRACENT, J., ALVAREZ, C., LANIO, M. E., DALLA-SERRA, M., MENESTRINA, G. Antiparasite activity of sea-anemone cytolytins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-Giardia antibodies. **Int. J. Parasitol.** 29, 489–498, 1999.

TEJUCA, M., ANDERLUH, G., MACEK, P., MARCET, R., TORRES, D., SARRACENT, J., ALVAREZ, C., LANIO, M.E., DALLA SERRA, M., MENESTRINA, G. Antiparasite activity of sea-anemone cytolytins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-Giardia antibodies. **Int. J. Parasitol.** 29, 489-498, 2001.

THOMAS, G. M., HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nat. Rev. Neurosci.** 5, 173-183, 2004.

TOKER, A. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. **Mol. Pharmacol.** 57, 652-658, 2000.

TURNER, K. M., ROBERT, D. B., MORGAN, A. Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. **Trends Neurosci.** 22, 459-464, 1999.

TURK, T. Cytolytic toxins from sea anemones. **J. Toxicol.—Toxin Reviews** 10, 223–262, 1991.

TUZ, K., PEÑA-SEGURA, C., FRANCO, R., PASANTES-MORALES, H. Depolarization, exocytosis and amino acid release evoked by hyposmolarity from cortical synaptosomes. **Eur. J. Neurosci.** 19, 916-924, 2004.

USHKARYOV, Y. Alpha-latrotoxin: from structure to some functions. **Toxicon** 40, 1-5, 2002.

VALENSTEIN, E. S. The discovery of chemical neurotransmitters. **Brain Cogn.** 49, 73-95, 2002.

VERHAGE, M., McMAHON, H.T., GHIJSEN, W.E., BOOMSMA, F., SCHOLTEN, G., WIEGANT, V.M., NICHOLLS, D.G. Differential release of amino acids, neuropeptides, and catecholamines from isolated nerve terminals. **Neuron.** 6, 517-524, 1991.

VOGEL, H. J. The Merck Frosst Award Lecture 1994. Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. **Biochem. Cell Biol.** 72, 357-376, 1994.

WANG, S. J., SIHRA, T. S. Noncompetitive metabotropic glutamate₅ receptor antagonist (E)-2-methyl-6-styryl-pyridine (SIB1893) depresses glutamate release through inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ entry in rat cerebrocortical nerve terminals (synaptosomes). **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 309, 951-958, 2004.

WANG, Y., CHUA, K. L. AND KHOO, H. E. A new cytolyisin from the sea anemone, *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning and functional expression. **Biochim. Biophys. Acta** 1478, 9-18, 2000.

WHITTAKER, V. P., MICHAELSON, I. A., KIRKLAND, R. J. The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). **Biochem. J.** 90, 293-303, 1964.

YAMAMOTO, H., MATSUMOTO, K., ARAKI, E., MIYAMOTO, E. New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of synapsin I in insulin exocytosis. **J. Pharmacol. Sci.** 93, 30-34, 2003.

YANAGIHARA, N., TACHIKAWA, E., IZUMI, F., YASUGAWA, S., YAMAMOTO, H., MIYAMOTO, E. Staurosporine: an effective inhibitor for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. **J. Neurochem.** 56, 294-298, 1991.

ZIGMOND, M. J., BLOOM, F. E., LANDIS, S. C., ROBERTS, J. L., SQUIRE, L. R., WOOLEY, R. S. *Fundamental Neuroscience*. Washinton: Academic Press 1, 1999.

ZOREC, R., TESTER, M., MACEK, P., MASON, W.T. 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, 1990.