

## EFEITO DA TETRODOTOXINA NA LIBERAÇÃO DE ACETILCOLINA ESTIMULADA POR AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS EM TECIDO ESTRIATAL DE RATOS

Paulo Cesar de Arruda Paes\*, Maria AP Camillo\*, Jose Roberto Rogero\* &

Lanfranco R P Troncone\*\*

\*Laboratório de Biologia Molecular  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP  
Caixa Postal 11049  
05422-970

\*\*Laboratório de Farmacologia -Instituto Butantan  
Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo  
05503-900 São Paulo, Brasil

### RESUMO

As toxinas de venenos animais tem sido importantes ferramentas nos estudos bioquímicos de processos fisiológicos e patológicos de diversos sistemas. No presente trabalho utilizamos a ação da tetrodotoxina sobre canais de sódio para mapear a localização de receptores de glutamato nos neurônios colinérgicos do tecido estriatal de ratos. Todos os receptores de glutamato são excitatórios, portanto promovem a liberação de outros neurotransmissores; neste trabalho estaremos focando a acetilcolina. A localização do tipo de receptor glutamatérgico, no corpo celular ou no terminal colinérgico, pode contribuir para uma melhor compreensão do papel funcional destes receptores. Para este estudo foi utilizado o método *in vitro* de liberação de neurotransmissores tritiados. Os agonistas de receptores glutamatérgicos escolhidos foram ácido glutâmico 500 $\mu$ M, NMDA 100 $\mu$ M, ácido kaínico 300 $\mu$ M, ácido quisquálico 300 $\mu$ M e AMPA 1mM. A primeira parte do ensaio mediu as liberações basais e estimuladas controles e na segunda, o mesmo protocolo foi seguido na presença de tetrodotoxina 1 $\mu$ M. As reduções nas liberações basais e estimuladas observadas na presença da tetrodotoxina sugerem que os receptores do tipo AMPA e NMDA estão localizados predominantemente no corpo celular da célula colinérgica e os demais apresentam distribuição mais equilibrada entre os terminais e o corpo celular.

Keywords: tetrodotoxina , acetilcolina , glutamato , liberação , estriato

### I. INTRODUÇÃO

As toxinas de venenos animais têm sido ferramentas importantes nos estudos bioquímicos de processos fisiológicos de diversos sistemas (neuronal, muscular, circulatório, hematológico etc). Estes compostos sofreram a seleção ao longo da evolução, o que parece justificar as ações pontuais e específicas.

O desenvolvimento tecnológico gerou novos equipamentos que permitem o rápido isolamento, detecção e determinação estrutural consumindo pouquíssimas quantidades de toxinas, associado às ações biológicas específicas conforme citado acima, tem levado ao crescente interesse nos estudos destes compostos e a descoberta de novos fármacos (fato este comprovado pelo elevado número de patentes nesta área).

No presente trabalho utilizamos a ação da tetrodotoxina sobre canais de sódio para mapear a localização de receptores de glutamato nos neurônios colinérgicos do tecido estriatal de ratos.

A tetrodotoxina (TTX) é uma toxina marinha altamente potente que se tornou ferramenta de grande importância no estudo da função de canais de sódio em tecidos excitáveis, uma vez que se liga com alta afinidade a estes canais bloqueando a condutância iônica (1) por oclusão do poro do canal (2). A ingestão desta toxina causa parada respiratória e seu vetor mais conhecido é o peixe fuga. O peixe não sintetiza TTX e sim, a concentra após a ingestão de certas bactérias em sua cadeia alimentar, as quais são a fonte desta toxina. A TTX apresenta um grupamento guanidínico e carrega uma carga positiva em pH fisiológico (3).

O glutamato é o principal mediador excitatório do sistema nervoso central e seus receptores estão diretamente relacionados ao fenômeno da excitotoxicidade, ou seja, estes receptores possuem função dupla. Ao mesmo tempo em que estão envolvidos em diversas funções fisiológicas, como aprendizado e memória, e na formação de redes neurais durante o desenvolvimento embrionário; também estão envolvidos na morte de neurônios em processos como isquemia, ataques epiléticos, traumatismos cranianos, etc (4).

Diversos tipos de receptores de glutamato foram caracterizados, principalmente devido aos avanços na farmacologia e biologia molecular. Foram separados em duas grandes classes: os ionotrópicos (iGluRs), da qual fazem parte os receptores formadores de canais iônicos permeáveis a cátions específicos, e os metabotrópicos (mGluRs), que são acoplados a proteínas-G (5, 4). Estes por sua vez, são subdivididos em grupos de acordo com a ação de agonistas específicos. Os ionotrópicos possuem três grupos identificados como iGluR-NMDA, iGluR-kainato e iGluR-AMPA. Os metabotrópicos também possuem três grupos de acordo com o nível de conservação de suas seqüências de aminoácidos, farmacologia e mecanismo de transdução de sinais. Os agonistas característicos de cada grupo são para mGluR1-quisqualato, para mGluR2-DCG-IV e para mGluR3-L-AP4. (5, 4, 6, 7, 8).

Todos os receptores de glutamato são excitatórios portanto promovem a liberação de outros neurotransmissores (neste trabalho estaremos focando a acetilcolina). No entanto, a sua localização no neurônio pode estar relacionado com a ação final (liberação do neurotransmissor) ou com a modulação, (controle das frequências de disparo do neurônio). A inibição da propagação do potencial de membrana pelo bloqueio do canal de sódio poderá nos dar indicação da localização dos diferentes tipos de receptores de glutamato no neurônio colinérgico.

A localização do tipo de receptor glutamatérgico no corpo celular ou no terminal colinérgico pode contribuir para uma melhor compreensão do papel funcional destes receptores.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

Liberação *in vitro* de [<sup>3</sup>H]neurotransmissores. A ação de substâncias sobre o sistema nervoso central pode ser avaliada pela interferência no padrão normal de liberação dos neurotransmissores. Para esta medida foi utilizado o método *in vitro* de liberação de neurotransmissores tritizados. Ratos Wistar, adultos, machos pesando entre 200-250 gramas foram sacrificados por decapitação. O estriato foi dissecado e colocado em tampão bicarbonato-Krebs-Ringer (KRB) com a seguinte composição, em mM: NaCl 118, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4,8, CaCl<sub>2</sub> 1,2 e Glicose 10; pH 7,3. Como tem sido verificado que a glicina interfere com a eficácia da resposta do receptor de glutamato, 10 mM deste aminoácido foi adicionado ao tampão. Da mesma forma, quando altas concentrações de potássio (K<sup>+</sup>) foram utilizadas como estímulo, adicionou-se 1,2 mM de

MgSO<sub>4</sub> ao tampão. Durante o experimento foi mantido gaseamento constante com carbogênio (5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>). O estriato passou duas vezes pelo cortador de tecidos marca McIlwain; calibrado para cortes na espessura de 250 µm, em sentido transversal formando prismas. O tecido foi disperso com uma pipeta Pasteur e lavado duas vezes em 20 mL de KRB gelado; sendo finalmente transferido para um béquer contendo 3 mL de KRB. Foram adicionados 15 µL de [<sup>3</sup>H]colina (New England Nuclear / atividade específica 322,7 Bq/mMol) a partir da qual o tecido sintetizará o neurotransmissor [<sup>3</sup>H]acetilcolina. A incubação foi feita por 20 minutos a 37°C. O tecido foi, então, filtrado e lavado duas vezes com KRB gelado e distribuído em 10 câmaras de perfusão com volume interno de 0,25 mL. A perfusão se processou com um fluxo de 0,35 mL/min, controlado por uma bomba peristáltica de vários canais. Os 60 minutos iniciais de perfusão foram necessários para atingir uma linha basal de liberação, estável. Decorrido este tempo, foi iniciada a coleta de amostras com a duração de 3 minutos cada. A perfusão com o agente de estímulo ocorreu aos 10 minutos (4<sup>a</sup> coleta) e durou 2 minutos. Foram utilizados ácido glutâmico 500µM, NMDA 100µM, ácido kaínico 300µM, ácido quisqualico 300µM e AMPA 1mM. A partir da 8<sup>a</sup> coleta foi adicionado ao meio tetrodotoxina 1 µM. Um segundo estímulo idêntico ao primeiro foi induzido na 11<sup>a</sup> coleta e mais seis amostras foram coletadas após esta liberação. No 19<sup>o</sup> intervalo, o tecido foi perfundido com uma solução de ácido clorídrico 0,1 N por dois períodos de 3 minutos para induzir a liberação total dos neurotransmissores ainda presentes no tecido. Os controles seguem o mesmo procedimento mas na ausência da tetrodotoxina.

A reprodutibilidade dos ensaios foi acompanhada pelo branco controle, ou seja, dois canais perfundidos apenas com tampão. Todas os estímulos foram ensaiadas, no mínimo, em duplicata.

Tratamento dos dados. Os resultados foram expressos como liberação fracional, isto é, a porcentagem de [<sup>3</sup>H]neurotransmissores liberados em cada intervalo sobre o total contido no tecido no momento da coleta. O efeito da tetrodotoxina foi avaliada pela razão S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>; sendo S<sub>2</sub> a liberação estimulada na sua presença e S<sub>1</sub> a liberação estimulada controle. A liberação basal na presença da toxina (B<sub>2</sub>) e a liberação basal controle (B<sub>1</sub>) foram utilizadas para a avaliação dos efeitos na liberação basal usando a razão B<sub>2</sub>/B<sub>1</sub>. S<sub>1</sub> é calculado subtraindo B<sub>1</sub> da liberação total obtida sob estímulo. B<sub>1</sub> corresponde a média de três amostras que precedem o estímulo S<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> a última liberação fracional antes de S<sub>2</sub>.

## III. RESULTADOS

As figuras 1 a 5 mostram os perfis de liberação de [<sup>3</sup>H]acetilcolina frente aos vários agonistas para receptores glutamatérgicos e a alteração decorrente do efeito do bloqueio da tetrodotoxina.

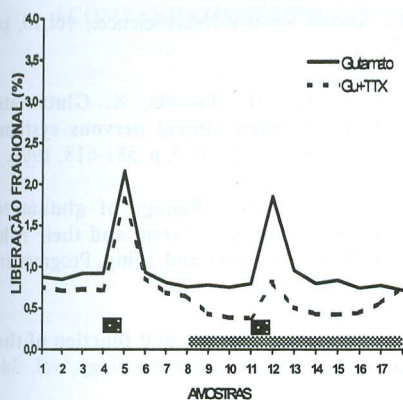


Figura 1. Efeito da tetrodotoxina sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ácido glutâmico.

■ glutamato 500 µM / ▨ Tetrodotoxina 1 µM

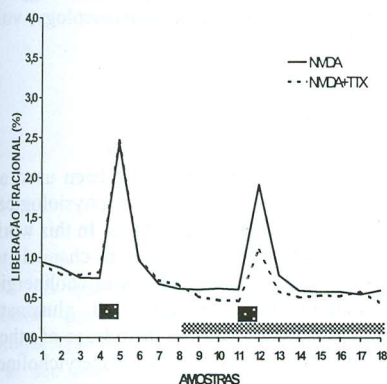


Figura 2. Efeito da tetrodotoxina sobre a liberação de acetilcolina estimulada por NMDA.

■ NMDA 100 µM / ▨ Tetrodotoxina 1 µM

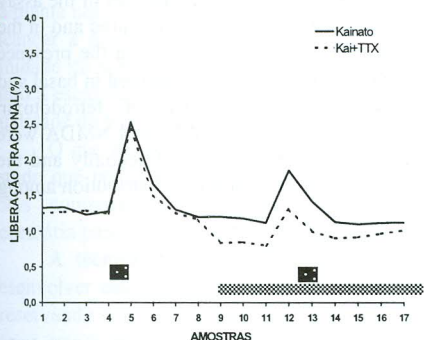


Figura 3. Efeito da tetrodotoxina sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ácido kaínico.

■ ácido kaínico 300 µM / ▨ Tetrodotoxina 1 µM

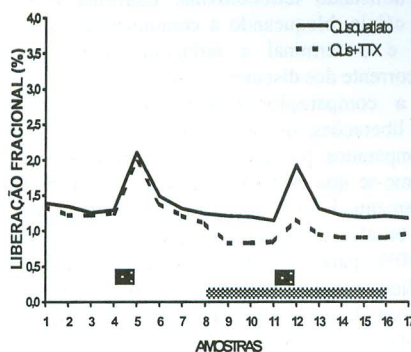


Figura 4. Efeito da tetrodotoxina sobre a liberação de acetilcolina estimulada por ácido Quisquático.

■ ácido Quisquático 300 µM / ▨ Tetrodotoxina 1 µM

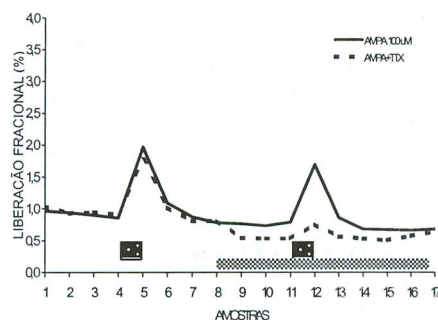


Figura 5. Efeito da Tetrodotoxina sobre a liberação de acetilcolina estimulada por AMPA.

■ AMPA 1 mM / ▨ Tetrodotoxina 1 µM

Com a adição da tetrodotoxina foi observado uma redução da liberação basal  $B_2$  porém reversível, pois, com a saída da toxina ocorreu o retorno ao nível basal inicial  $B_1$ . Os valores obtidos para as razões  $B_2/B_1$  e  $S_2/S_1$  estão na tabela 1.

Tabela 1. Valores das médias e desvio padrão para as relação  $B_2/B_1$  e  $S_2/S_1$  dos experimentos envolvendo tetrodotoxina e diferentes agonistas glutamatérgicos.

NT/Est/Cond		Média $B_2/B_1$	Média $S_2/S_1$
Ach/Glu/TTx	controle	$0,89 \pm 0,02$	$0,83 \pm 0,04$
	teste	$0,51 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,00$
Ach/NMDA/TTx	controle	$0,76 \pm 0,08$	$0,82 \pm 0,02$
	teste	$0,55 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,12$
Ach/Ka/TTx	controle	$0,83 \pm 0,09$	$0,62 \pm 0,11$
	teste	$0,60 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,12$
Ach/Quis/TTx	controle	$0,87 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,11$
	teste	$0,67 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,26$
Ach/AMPA/TTx	controle	$0,87 \pm 0,08$	$0,87 \pm 0,17$
	teste	$0,56 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,02$

A redução na liberação basal em todos os experimentos utilizando tetrodotoxina, confirma o seu efeito sobre a célula, bloqueando a comunicação entre o corpo celular e o terminal e reduzindo a liberação espontânea decorrente dos disparos neuronais.

Para a comparação quantitativa da variação observada nas liberações, os valores da tabela 1 também podem ser comparados por porcentagem em relação ao controle. Assume-se que este não apresentou diminuição, ou seja, seu percentual foi 0%. Assim, houve uma queda nas liberações basal e estimulada em relação ao controle de cerca de 50%, para estímulo com ácido glutâmico, ácido quisquálico e ácido kaínico. Isto provavelmente indica a presença de receptores de glutamato tanto no corpo celular quanto no terminal colinérgico.

Para o ácido quisquálico e ácido kaínico essa porcentagem obtida não pode ser considerada real para receptores do tipo AMPA e kainato respectivamente, uma vez que o primeiro também é agonista de receptores metabotrópicos, e o segundo também é agonista de receptores AMPA.

Quando utilizou-se AMPA como estímulo, a TTx reduziu em 71% a liberação sugerindo assim, uma maior presença de receptores do tipo AMPA no corpo celular. Quando utilizou-se NMDA como estímulo, cerca de 65% de redução causada pela TTx foi obtida, sugerindo também um predomínio de receptores NMDA no corpo celular das células colinérgicas.

#### IV. CONCLUSÕES

As reduções nas liberações basais e estimuladas causadas pela tetrodotoxina sugerem que os receptores do tipo AMPA e NMDA estão localizados predominantemente no corpo celular da célula colinérgica e os demais apresentam distribuição mais equilibrada entre os terminais e o corpo celular.

#### V. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

#### VI. REFERÊNCIAS

- [1] Narahashi T.; Moore JW.; Poston RN. **Tetrodotoxin derivatives chemical structure and blockage of nerve membrane conductance.** Science, vol.156, p.:976-979, 1967
- [2] Hille B. **The receptor for tetrodotoxin and saxotoxin: a structural hypothesis.** Biophysical Journal., vol.15, p. 615-619, 1975
- [3] Strichartz G.; Rando T.; Wang GK.. **An integrate view of the molecular toxicology of sodium channel gating in excitable cells.** Annual Review Neuroscience., vol.10, p. 237-267, 1987.
- [4] Ozawa. S.; Kamiya. H.; Tsuzuki, K. **Glutamate receptors in the mammalian central nervous system.** Progress in Neurobiology, vol. 54, n. 5, p. 581-618, 1998.
- [5] Michaelis, E.K. **Molecular Biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging.** Progress in Neurobiology., v. 54, p. 369-415, 1998.
- [6] Mori. H.; Mishina. M. **Structure and function of the NMDA receptor channel.** Neuropharmacology, vol. 34, n. 10, p. 1219-1237, 1995.
- [7] Pin, J.-P.; Duvoisin, R. **Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions.** Neuropharmacology, vol. 34, n. 1, p. 1-26, 1995.
- [8] Bleakeman. D.; Lodge. D. **Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors.** Neuropharmacology, vol. 37, p. 1187-1204, 1998.

#### ABSTRACT

The toxins of animal venoms have been used as important tools for biochemical studies of physiological and pathological processes of diverse systems. In this work we used the action of tetrodotoxin on sodium channels to map the localization of glutamate receptors in cholinergic neurons from striatum tissue of rats. All glutamate receptors are exciting, so they promote the release of other neurotransmitters. In this work we focus on acetylcholine. The localization of glutamate receptor, on the soma or on the excitatory terminal, may contribute for a better understanding of its function. For this work we applied the *in vitro* method of tritiated neurotransmitter release. The agonists of glutamate receptors chosen were glutamic acid 500µM, NMDA 100µM, kainic acid 300µM, quisqualic acid 300µM and AMPA 1mM. In the first part of the assay the basal and stimulated releases were measured and in the second, the same protocol was performed in the presence of tetrodotoxin 1µM. The reductions observed in basal and stimulated release in the presence of tetrodotoxin suggested that the receptors type AMPA and NMDA were located in soma of cholinergic cell preferentially and the other ones presented a more equilibrate distribution among the axons and the soma.