

APLICABILIDADE DO MÉTODO DE LIBERAÇÃO FRACIONAL UTILIZANDO NEUROTRANSMISSORES TRITIADOS NO ESTUDO DE NEUROTOXINAS.

Camillo, M.A.P.*; Troncone, L.R.P.**; Arruda Paes, P.C.* e Rogero, J.R.*

*Divisão de Radiobiologia- IPEN-CNEN/SP
Caixa Postal 11049
05422-970, São Paulo, SP, Brasil

**Laboratório de Farmacologia- INSTITUTO BUTANTAN
Av. Vital Brazil, 1500
05503-900, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Durante as duas últimas décadas tem ocorrido avanços significativos em neuroquímica e neurofisiologia devido, em parte, ao uso de toxinas como ferramentas em estudos de funções estruturais e fisiológicas dos sistemas neuronais. Adicionalmente, o desenvolvimento do método "in vitro" de perfusão de neurotransmissores tritiados nos abriu a possibilidade de acessar diversas etapas da transmissão nervosa em um único experimento. Neste trabalho são apresentados os dados obtidos com tetrodotoxina [neurotoxina marinha do peixe *Fugu poecilonotus*], crotoxina [neurotoxina da cascavel brasileira- *Crotalus durissus terrificus*] e toxina de paralisia flácida [PF3] [neurotoxina da aranha armadeira- *Phoneutria nigriventer*]. Para tanto, foram utilizados tecido estriatal, ^3H -dopamina ou ^3H -acetilcolina e K^+ 20 mM ou Glu 100 μM como estímulos de liberação. Para tetrodotoxina obteve-se diminuição das liberações basal e estimulada, resultado de seu efeito bloqueador em canais de sódio voltagem dependente; para crotoxina houve aumento da liberação basal e bloqueio da estimulada, compatível com seu efeito trifásico pré-sináptico descrito em preparações isoladas e, finalmente, para PF3, cujo mecanismo de ação ainda é desconhecido, houve uma diminuição de ambas, basal e estimulada. Estes resultados evidenciam a aplicabilidade do método desenvolvido nos estudos com neurotoxinas.

INTRODUÇÃO

Os venenos animais são fontes ricas em princípios ativos que tem sido úteis em estudos de mecanismos fisiológicos fornecendo subsídios para a clínica médica ou mesmo como fonte de medicamentos [1]. A composição destes venenos varia com a distribuição geográfica, o que torna interessante estudar os venenos de nossa fauna já que esta é diversificada e pouco estudada.

Diversas neurotoxinas isoladas de venenos animais tem sido ferramentas muito úteis em estudos de neuroquímica e neurofisiologia desenvolvidos nas duas últimas décadas, contribuindo para a caracterização de receptores; estabelecendo passos de excitação etc [2]. A obtenção dos venenos é difícil e as quantidades disponíveis, em geral, são da ordem de 10^{-3} a 10^{-6} gramas; o que direciona os métodos a serem utilizados para sistemas "in vitro". O método de liberação fracional utilizando neurotransmissores

tritiados é compatível com esta limitação e durante a padronização foi possível comprovar que é sensível, específico, reprodutível e de extrema valia para estudar diversos aspectos da neurofisiologia, tais como liberação e recaptura de neurotransmissores, alterações de polaridade das membranas neuronal, ativação de canais iônicos, atividades enzimáticas intra e extracelulares etc. Utilizando drogas padrões foi possível registrar a resposta do sistema a intervenções em etapas conhecidas e específicas da neurotransmissão [3].

Neste trabalho são apresentadas as respostas do sistema a neurotoxinas que são compostos com estruturas mais complexas que as drogas anteriormente ensaiadas. Foram escolhidas neurotoxinas de diferentes origens, pesos moleculares e distintos mecanismos de ação: tetrodotoxina, crotoxina e toxina da paralisia flácida.

PROCEDIMENTOS E RESULTADOS

Ratos wistar, adultos, machos, pesando entre 200-250 gramas foram sacrificados por decaptação. O estriato foi dessecado e colocado em tampão Bicarbonato-Krebs Ringer (KRB) pH 7,3; contendo 10 μ M de glicina. Quando altas concentrações de potássio foram utilizadas como estímulo, adicionou-se 1,2 mM de $MgSO_4$ ao tampão. Durante o experimento foi mantido o gaseamento constante com CO_2/O_2 . O estriato passou duas vezes pelo cortador de tecidos McIlwain; calibrado para cortes de espessura de 250 μ m, em sentido transversal formando "prismas". O tecido foi ressuspensão e lavado com tampão sendo, finalmente transferido para um bequer e adicionado o neurotransmissor a ser ensaiado: 3H .dopamina [3H .DA] ou 3H .colina [que será armazenada como 3H .acetilcolina - 3H .Ach]. Após 20 minutos o tecido é lavado 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 foram para atingir uma linha basal de liberação estável. Decorrido este tempo, foram coletadas 3 amostras sucessivas para quantificação deste basal com 3 minutos de coleta para cada. A perfusão com agentes de estímulo ocorreu a partir de 43 minutos e durou 2 minutos; tendo sido avaliadas as liberações induzidas por dois processos: com 20 mM de potássio [K^+] e com 100 μ M de glutamato monossódico [Glu]. As toxinas foram adicionadas ao meio de perfusão a partir da amostra 8.

Os resultados são expressos como liberação fracional, isto é, a porcentagem de 3H .neurotransmissores liberados em cada intervalo sobre o total contido no tecido. O efeito das toxinas são avaliados pela razão $S2/S1$; sendo S2 a liberação estimulada na presença da toxina e S1 a liberação estimulada controle. A liberação basal na presença da

toxina B2 e a liberação basal controle B1 são utilizadas para a avaliação dos efeitos das drogas na liberação basal usando a razão $B2/B1$ (figura 1)

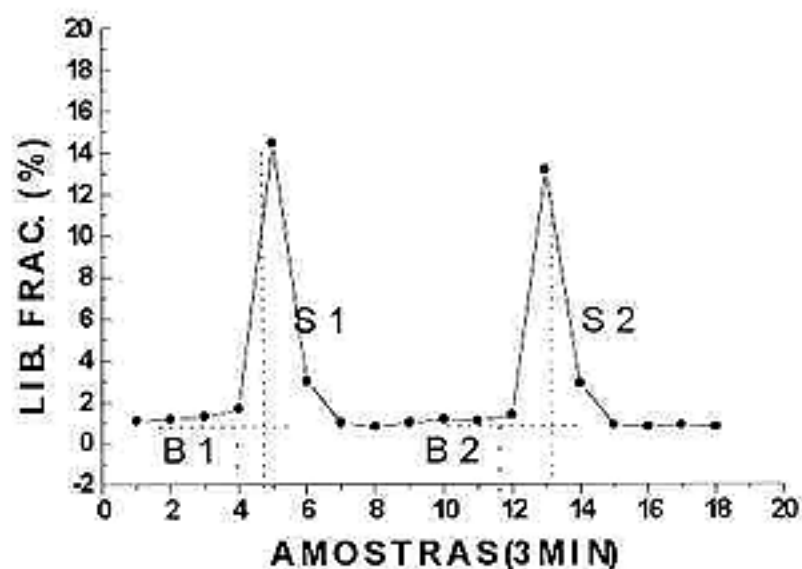


Figura 1- Perfil típico da eluição, mostrando os parâmetros B1, B2, S1 and S2.

Tetrodotoxina [TTX] ; [PM 319,28]. Toxina marinha encontrada em diversas espécies, entre elas no peixe fugu (*Spherooides rubripes*) consumido no Japão como uma iguaria, após remoção das vísceras onde se encontra a neurotoxina. Apesar dos cuidados no preparo do prato e do conhecimento da população do risco envolvido, o consumo é alto e os acidentes são frequentes, constituindo um problema de saúde pública local. Atua bloqueando os canais de sódio voltagem dependente, impedindo o influxo de Na^+ e, conseqüentemente, a transmissão da excitabilidade da membrana [2].

No método de liberação seu mecanismo de ação foi evidenciado pelos bloqueios das liberações basal e da estimulada (figura 2): havendo diminuição de $B2/B1$ e $S2/S1$.

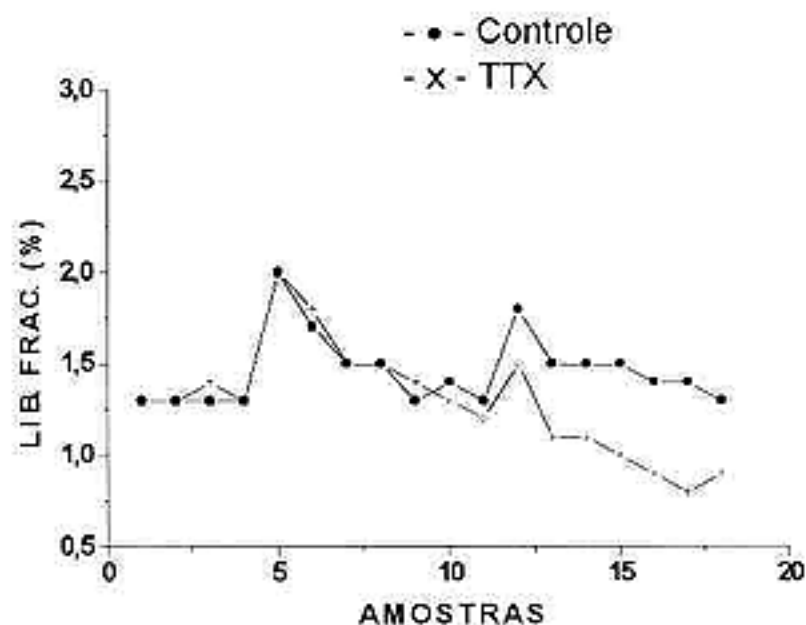


Figura 2. Ação da Tetrodotoxina (TTX) 0,5 μ M no perfil de liberação de 3H -DA. Estímulo 100 μ M de Glu.

Crotoxina [PM 24000]. Pertence à classe das neurotoxinas que possuem atividade enzimática de fosfolipase A₂ (PLA₂). Bloqueia a transmissão nervosa segundo um modelo trifásico pré-sináptico: um efeito depressor inicial, seguido por uma breve facilitação da liberação e, então, uma inibição irreversível de acetilcolina (Ach) [4]. Posteriormente, há diminuição da resposta pós-sináptica à Ach e, finalmente, causa necrose ao músculo atuando preferencialmente na placa motora [5]. No ensaio de liberação este efeito trifásico foi observado com aumento da liberação basal [B2/B1] e uma inibição da resposta ao estímulo [S2/S1], conforme demonstra a figura 3A. O controle com PLA₂ apresentou-se igual ao controle padrão [figura 3B] demonstrando que o efeito observado não tem interferência da atividade enzimática.

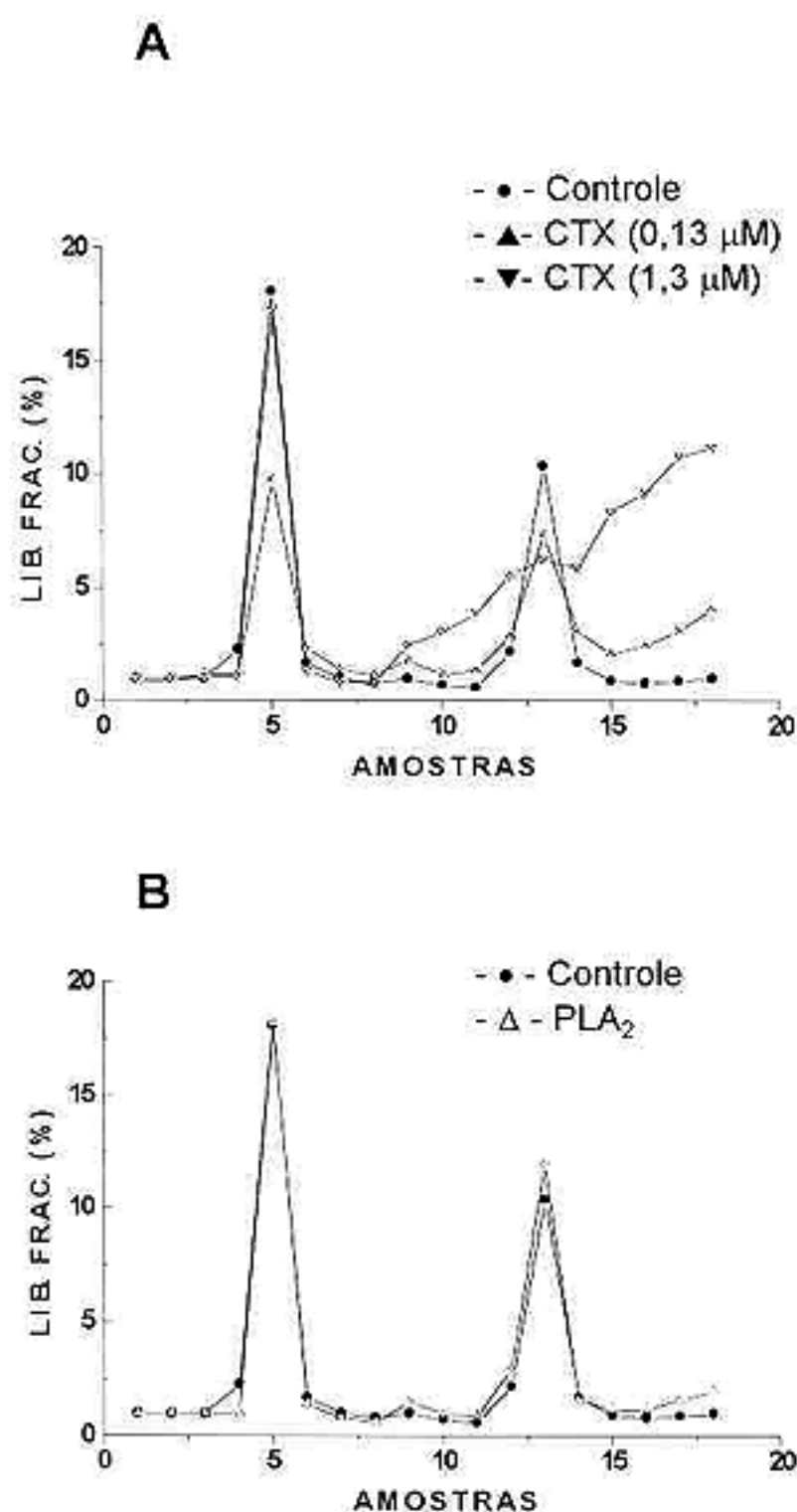


Figura 3. A. Ação da crotoxina (CTX) (0,13 e 1,3 μM) na liberação de ³H-Ach. Estimulo com K⁺ 20 mM. B. Idem, ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) (0,13 μM).

Paralisia flácida [PF3] Peptídeo com massa molecular de 8360, estimada por espectrometria de massa. Toxina purificada a partir do veneno da aranha brasileira *Phoneutria nigriventer*, popularmente conhecida como aranha armadeira. Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido, podendo atuar por bloqueio de canais de Ca⁺⁺ ou por ação direta no sistema de excitação.

Na presença de Ca⁺⁺ causa inibição das liberações basais e estimulada e na ausência de Ca⁺⁺ o efeito é oposto, ou seja, causa um aumento da liberação basal [figura 4].

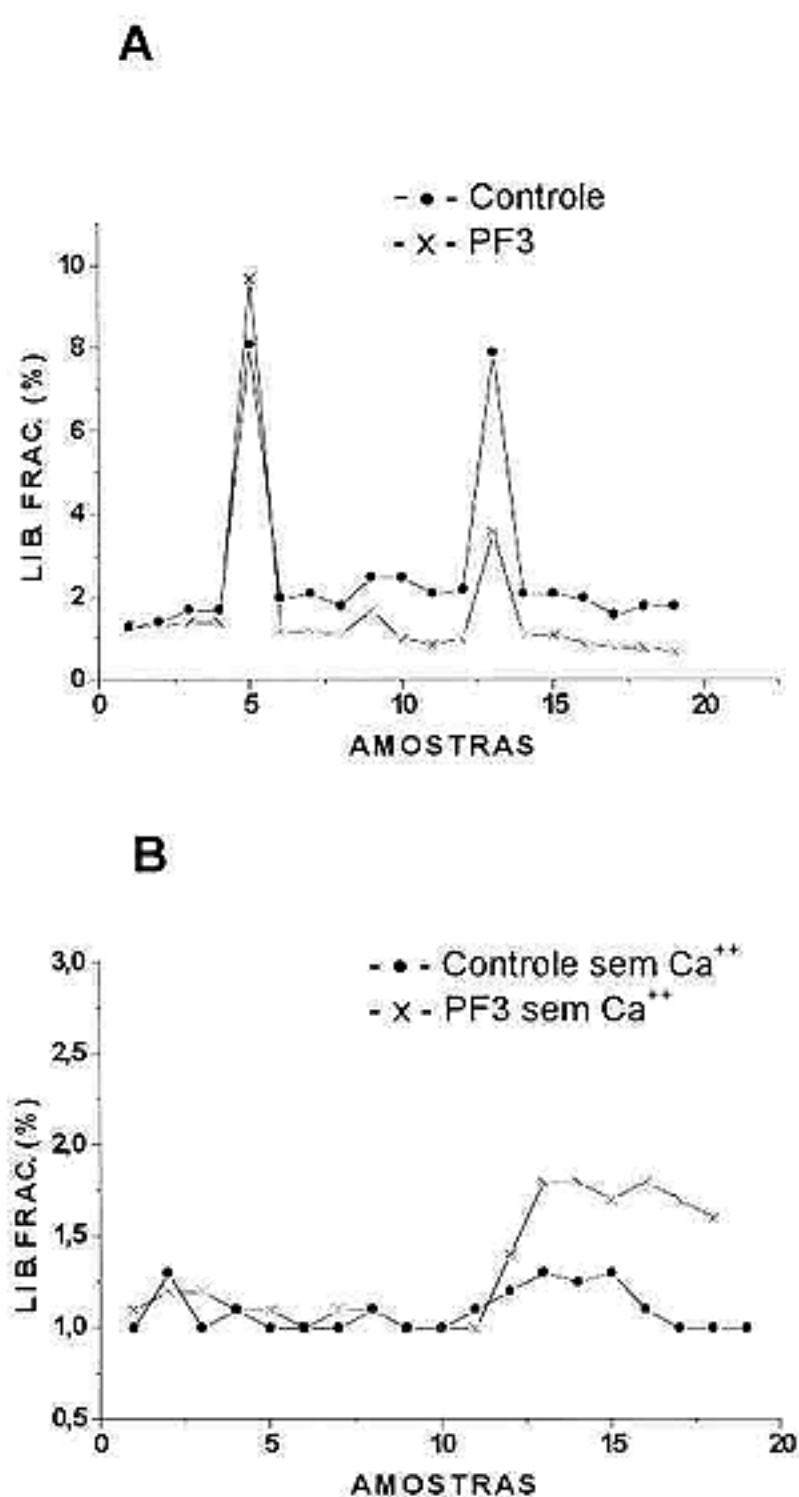


Figura 4. A: Ação da PF3 (120 nM) sobre o perfil de liberação de ³H-Ach. Estimulo K⁺ 20 mM. B: Influência da ausência de cálcio na ação da PF3 (120 nM) sobre a liberação basal de ³H-Ach.

Para melhor visualização das diferenças de liberação entre os grupos experimentais e os grupos controle, as liberações fracionais podem ser expressas como liberações relativas, em porcentagem dos controles [figura 5].

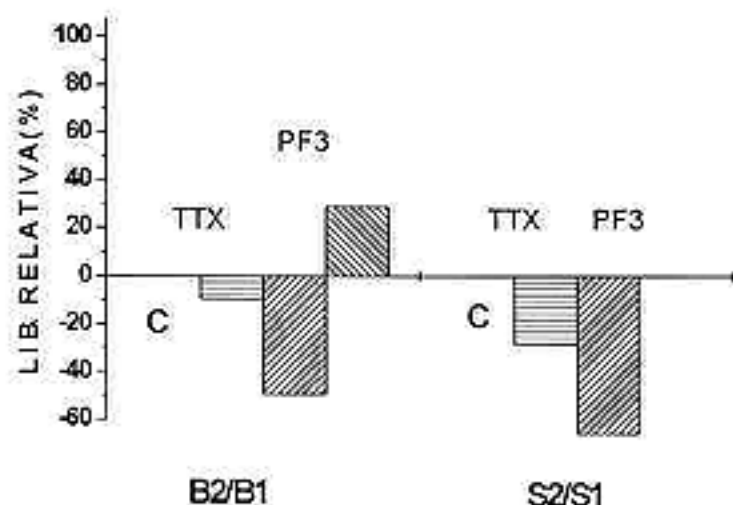


Figura 5. Comparação das liberações fracionais (%) das toxinas tetrodotoxina (TTX) e paralisia flácida (PF3 - na presença e ausência de Ca^{++}) com o controle (C).

CONCLUSÕES

Estes ensaios permitiram comprovar a aplicabilidade do método nos estudos com neurotoxinas.

Considerando que a ação de qualquer substância sobre o sistema nervoso central pode ser avaliada pela interferência com o padrão normal de liberação, este método pode ser utilizado: na triagem de atividades neurotóxicas em venenos brutos e em frações semi-purificadas pode estabelecer os mecanismo de ação de toxinas puras pode avaliar alterações do tecido cerebral após exposição a agentes químicos ou físicos potencialmente lesivos a este tecido.

Apoio financeiro CNEN e FAPESP

REFERÊNCIAS

- [1] Stocker, K.F., **Medical use of Snake Venom Proteins**, CRC Press, Florida., 1990.
- [2] Shier, W.T. and Mebs, D., **Handbook of Toxinology**, Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1990.
- [3] Camillo, M.A.P., Troncone, L.R.P. and Rogero, J.R., "In vitro" labelled neurotransmitters release for the study of neurotoxins. ENAN 3, Joint Nuclear

Conferences, vol 2, p.963-968, 1995.

[4] Chang, C.C., **Neurotoxins and phospholipase activity in snake venoms**. Proc.Natl.Sci., vol 9, p 126-142, 1985.

[5] Cardi, B.A., Nascimento, N., Rogero, J.R. and Andrade Jr., H.F., **Immunochemical detection of purified crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* in the motor end plate of striated muscle in CBA/J.mice.**, Braz.J.Med.Biol., vol 25, p 905-908, 1992.

[6] Troncone, L.R.P., Lebrum, I., Magnoli, F. and Yamane, T., **Biochemical and Pharmacological studies on a lethal neurotoxic polypeptide from *Phoneutria Negriverter* spider venom**. Neurochem., vol 20, p 879-883, 1995.

ABSTRACT

During the last two decades much progress in neurochemistry and neurophysiology was achieved, partly due to the successful use of toxins as tools to elucidate structural and physiological functions of neuronal systems. Additionally, the development of the "in vitro" tritiated neurotransmitters perfusion method made the access of several neuronal transmission steps possible, at only one assay. This procedure maintains an active uptake/release function which is fairly changed by membrane polarization state, ion channel activation and enzymatic activity as well as other still unknown steps involved in neurotransmission. This paper shows the results with some toxins (tetrodotoxin, crotoxin and flaccid paralysis) using 3H .Dopamine or 3H .Acetylcholine and K^+ 20 mM or Glu 100 μ M.