

Fabiana Vasconcelos Campos

**Dissociação dependente de voltagem  
da Tityustoxina do sítio de ligação  
em canais de sódio**

Belo Horizonte  
Minas Gerais – Brasil  
2002

Fabiana Vasconcelos Campos

**Dissociação dependente de voltagem  
da Tityustoxina do sítio de ligação  
em canais de sódio**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão

Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia

*A todos que de alguma forma  
contribuíram para a realização deste  
trabalho.*

# Índice

---

<b>Resumo</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2

## **I - Introdução**

<b><i>I.1 - Estrutura e Função dos Canais de Sódio</i></b> .....	3
<i>I.1.1 - Aspectos Gerais</i> .....	3
<i>I.1.2 - O poro Condutor</i> .....	4
<i>I.1.3 - Gating: A Ativação</i> .....	5
<i>I.1.4 - A Inativação</i> .....	6
<i>I.1.5 - O Acoplamento entre a Ativação e a Inativação</i> .....	8
<i>I.1.6 - A Corrente de Sódio</i> .....	9
<b><i>I.2 - Toxinas que atuam em Canais de Sódio</i></b> .....	10
<i>I.2.1 - Sítios de Ligação para Toxinas em Canais de Sódio</i> .....	10
<i>I.2.2 - Toxinas de Escorpião</i> .....	11
<i>I.2.3 - A Tityustoxina</i> .....	13
<i>I.2.4 - Interação entre a Tityustoxina e o Canal de Sódio</i> .....	14

## **II - Objetivos**

<b><i>II.1 - Objetivo Geral</i></b> .....	16
<b><i>II.2 - Objetivos Específicos</i></b> .....	16

## **III - Materiais e Métodos**

<b><i>III.1 - Cultivo Celular</i></b> .....	17
<b><i>III.2 – Soluções</i></b> .....	17
<i>III.2.1 - Soluções para registro de Correntes de Entrada de Sódio</i> .....	17
<i>III.2.2 - Soluções para registro de Correntes de Saída de Sódio (Gradiente Invertido)</i> .....	18

<i>III.3 - Análise, diluição e perfusão da Tityustoxina</i> .....	18
<i>III.4 - Espectrometria de Massa</i> .....	19
<b>III.5 – Eletrofisiologia</b> .....	20
<i>III.5.1 - Temperatura do Banho</i> .....	20
<i>III.5.2 – Protocolos</i> .....	20
• <i>Relação Corrente-Voltagem</i> .....	21
• <i>Relação Condutância-Voltagem</i> .....	21
• <i>Inativação do Estado Estacionário</i> .....	21
• <i>Cinética e Grau da Inativação</i> .....	22
• <i>Dissociação da Tityustoxina</i> .....	22
• <i>Análise dos Dados</i> .....	22
<b>IV - Resultados</b>	
<i>IV.1 - Correntes de Entrada de Sódio em células GH3</i> .....	23
<i>IV.2 - Efeito da Tityustoxina nas Correntes de Entrada de Sódio</i> .....	29
<i>IV.3 - Relação Dose-resposta da Tityustoxina</i> .....	35
<i>IV.4 - Efeito da Despolarização na Dissociação da Tityustoxina do seu Sítio de Ligação em Canais de Sódio</i> .....	38
<i>IV.5 - Efeito da Temperatura na Dissociação da Tityustoxina</i> .....	39
<i>IV.6 - Efeito da Tityustoxina nas Correntes de Saída de Sódio</i> .....	45
<i>IV.7 - Efeito da Despolarização na Dissociação da Tityustoxina do seu Sítio de Ligação em Canais de Sódio sob Gradiente de Sódio Invertido</i> .....	47
<b>V - Discussão</b>	
<i>V.1 - As Correntes de Sódio</i> .....	53
<i>V.2 - A Toxina</i> .....	54
<i>V.3 - A Interação</i> .....	56
<b>VI – Referências Bibliográficas</b> .....	60

## Resumo

---

Os canais de sódio dependentes de voltagem são estruturas que respondem a variações no potencial de membrana, permitindo a entrada seletiva de sódio nas células. No repouso eles se encontram em um estado fechado não condutor. Com a despolarização passam rapidamente por um estado ativado, condutor, que se converte espontaneamente para um estado inativado não condutor. Canais de sódio dependentes de voltagem presentes na membrana das células GH3 foram estudados através de sua interação com a tityustoxina, uma toxina do tipo  $\alpha$  extraída do escorpião *Tityus serrulatus*. Esse tipo de toxina se liga ao sítio 3 de canais de sódio, de um modo dependente de voltagem, modificando o processo de inativação. Este sítio se situa na porção extracelular do canal e compreende estruturas relacionadas ao processo de ativação. Os efeitos da tityustoxina na inativação foram verificados principalmente através da cinética do decaimento das correntes de entrada e saída de sódio, decaimento este que se torna mais lento na presença da toxina. A interação entre a tityustoxina e o canal de sódio mostrou-se estável durante pulsos despolarizantes de 0 mV, o que significa que a dependência de voltagem da ligação não está relacionada ao processo de ativação, que ocorre neste potencial. Entretanto, pulsos mais despolarizantes, variando de +100 a +200 mV foram capazes de deslocar a toxina do seu sítio de ligação. O grau de dissociação da toxina foi dependente da magnitude, da quantidade e da duração dos pulsos despolarizantes, apresentando também dependência de temperatura. Sugerimos que o mecanismo dessa dissociação deve envolver alterações conformacionais que ocorrem em um sensor de voltagem do canal durante despolarizações fortes.

## Abstract

---

Voltage-dependent sodium channels are membrane proteins that suffer conformational changes as result of variations on membrane potential. The ion  $\text{Na}^+$  fluxes into the cells through these channels. In the resting state they are closed. With a depolarization they pass quickly through an open state and go to the inactivated state. Voltage-dependent sodium channels present on GH3 cells membrane were studied using their interaction with tityustoxin (Tstx), an alpha toxin from scorpion *Tityus serrulatus*. These toxins bind to receptor site 3 of the sodium channels in a voltage-dependent way, modifying the inactivation process. Site 3 is on the extracellular surface of the sodium channel and involves structures related with the activation process. The effects of tityustoxin on inactivation were studied using the kinetics of the decay of inward and outward sodium currents. In the presence of the toxin, the kinetics of both currents was slower. Toxin-channel interaction was stable during depolarizing pulses to 0 mV, suggesting that the voltage-dependence of dissociation is independent of the activation process. However, higher depolarizing pulses (+100 to +200 mV) were able to remove the toxin of its binding site. The rate of dissociation depended on the amplitude, duration and number of pulses applied. There was also a dependence of bath temperature. We suggest that the mechanism of voltage-dependent dissociation of the tityustoxin is related to the conformational changes of the a voltage sensor of the channel during high depolarization.

# I - Introdução

---

## I.1 - Estrutura e Função dos Canais de Sódio

### I.1.1 - Aspectos gerais

Em 1952 Hodgkin e Huxley, ao estudarem o mecanismo iônico do potencial de ação no axônio gigante de lula, observaram que a despolarização produzia um aumento transiente na condutância para o  $\text{Na}^+$ , com o seu consequente influxo. O canal de sódio, uma glicoproteína transmembrana, é a estrutura responsável por esse rápido influxo de sódio que ocorre na maioria dos tecidos excitáveis durante a fase ascendente do potencial de ação. A ativação dependente de voltagem, a inativação rápida e a condutância seletiva são as principais características do canal de sódio.

A análise molecular dos canais de sódio começou em 1980 quando Beneski e Catterall isolaram as principais subunidades que constituem o canal de sódio de cérebro de mamíferos, utilizando como marcador uma toxina de escorpião. Estudos de purificação subsequentes mostraram que, nesse tecido, o canal de sódio é constituído de uma subunidade  $\alpha$  (260 kD) e subunidades  $\beta_1$  (36 kD) e  $\beta_2$  (33 kD) (Hartshorne e Catterall, 1981). Em canais de músculo esquelético e cardíaco a subunidade  $\beta_2$  está ausente. Canais funcionais são produzidos quando se expressa somente a subunidade  $\alpha$ , mas a expressão é acentuada e algumas propriedades do canal são alteradas quando se expressa também as subunidades  $\beta$ , que apresentam apenas um papel modulatório (Isom et al., 1992).

Em 1984 Noda et al. deduziram, através da sequência do cDNA, a estrutura primária da subunidade  $\alpha$  do canal de sódio do órgão elétrico do *Electrophorus electricus*. Seus estudos revelaram uma proteína com cerca de 2000 resíduos de aminoácidos formando quatro domínios homólogos com alto grau de semelhança. Análises hidropáticas sugeriram que cada domínio é formado por seis segmentos transmembrana (S1-S6), sendo que os segmentos N e C-terminal se localizam na face citoplasmática da proteína. Esta disposição foi confirmada por vários pesquisadores que se dedicaram ao estudo topológico desta proteína. As alças que conectam os quatro domínios também são citoplasmáticas,

apresentando sítios de fosforilação. A alça que conecta os domínios I e II apresenta quatro sítios de fosforilação para PKA e um para PKC (Rossie e Catterall, 1987; Murphy et al., 1993; Cantrell et al., 1996). A fosforilação nesses sítios reduz a amplitude das correntes de sódio macroscópicas sem alterar a dependência de voltagem da ativação e da inativação (Li et al., 1992; Smith e Goldin, 1996). A alça entre os domínios III e IV, segmento responsável pela inativação do canal (ver seção I.1.4), também apresenta um sítio de fosforilação para PKC (Numann et al., 1991; West et al., 1991). A fosforilação nesse sítio retarda a inativação do canal (Sigel e Baur, 1988; Lotan et al., 1990).

Os canais de sódio são proteínas altamente glicosiladas, principalmente por glicídeos contendo ácido siálico. Os sítios para glicosilação estão localizados principalmente na porção extracelular da alça que liga os segmentos S5 e S6 do domínio I (Catterall, 1992; Gellens et al., 1992). O ácido siálico é negativamente carregado em pH fisiológico, e, como cargas de superfície associadas com o canal podem influenciar o campo elétrico na região do sensor de voltagem, a sua presença pode afetar os processos dependentes de voltagem do canal (Hanck e Sheets, 1992; Hille, 1992; Zhang et al., 1999).

### ***1.1.2 - O poro condutor***

Os quatro domínios provavelmente se agrupam formando uma estrutura cilíndrica com um poro aquoso central, como demonstrado por Sato et al. em 2001, quando determinaram a estrutura tri-dimensional do canal de sódio através de microscopia crio eletrônica e reconstrução de imagens. Os segmentos que formam as paredes do poro foram identificados através de marcação com tetrodotoxina ou saxitoxina, bloqueadores específicos que se ligam ao poro externo e parte do filtro de seletividade do canal de sódio. Em 1989 Noda et al. mostraram que o glutamato 382, situado na porção intramembranosa da alça (denominada alça P ou segmento SS1-SS2) que conecta os segmentos S5 e S6 do domínio I, é um resíduo essencial à ligação da tetrodotoxina e da saxitoxina. Resíduos em posições análogas nos outros três domínios se associam a esse glutamato formando o poro externo do canal. Um anel mais interno formado pelos resíduos DEKA dos domínios I-IV constitui o filtro de seletividade do canal de sódio, como demonstrado por Heinemann et al. em 1992, quando tornaram o canal de sódio seletivo para cálcio substituindo esses resíduos

por glutamato (EEEE). A seletividade também depende, em parte, de fatores estéricos. A influência do tamanho iônico na permeabilidade indica que o canal possui um poro estreito, pois íons que têm diâmetro maior que 5 Å são excluídos. O poro interno do canal foi identificado através do bloqueio por anestésicos locais, substâncias lipossolúveis cujos sítios de ligação compreendem resíduos de aminoácidos do segmento S6 do domínio IV (Ragsdale et al., 1994).

### ***1.1.3 - Gating: A Ativação***

A ativação dos canais de sódio é um processo dependente de voltagem, portanto esses canais devem apresentar estruturas carregadas que se movem sob influência do campo elétrico da membrana. Ao analisarem a sequência de aminoácidos do canal de sódio em 1984, Noda et al. observaram que os segmentos S4 dos domínios I, II, III e IV contêm, respectivamente, 4, 5, 6 e 8 argininas ou lisinas, situadas uma a cada três aminoácidos. Em 1989 Stühmer et al. mostraram que a neutralização dos resíduos básicos no segmento S4 do domínio I reduzia progressivamente a relação entre a abertura do canal e o potencial de membrana. Em outras palavras, diminuía a dependência de voltagem do chamado *gating* do canal, o que foi observado posteriormente também para os segmentos S4 dos outros domínios. Os segmentos S4 são então responsáveis pela sensibilidade à voltagem do canal. Acredita-se que a despolarização proporciona um movimento em espiral dos segmentos S4, acompanhado pelo movimento global de cargas positivas para o lado extracelular da membrana, levando à abertura do canal e à condução de íons Na<sup>+</sup> através do poro. Esse movimento de cargas gera uma corrente, denominada corrente de *gating*. As correntes de *gating*, medidas primeiramente em 1973 por Armstrong e Bezanilla e por Keynes e Rojas, precedem as correntes iônicas geradas pelo fluxo de íons através do poro, sendo menores que essas últimas.

Ainda não existe um consenso em relação ao tipo e à extensão do movimento dos segmentos S4, mas indícios experimentais levam a crer que não são necessários movimentos muito grandes para promover a abertura do canal. Em experimentos onde os resíduos positivos foram substituídos por resíduos de cisteína, o movimento foi relacionado à reação entre os resíduos de cisteína e reagentes externos e internos (Yang e Horn, 1995;

Yang et al., 1996). Observou-se que, com a despolarização, as cisteínas reagem mais com reagentes externos que internos, sendo que o número de resíduos expostos à reação sugeria grandes movimentos, principalmente do segmento S4 do domínio IV. No entanto, se a espessura da membrana for menor na região dos segmentos S4, pequenos movimentos poderiam levar a uma grande exposição dos resíduos de cisteína. De fato, Sato et al. em 2001 observaram a presença de quatro “poros” transmembrana periféricos na estrutura tri-dimensional do canal, por onde os segmentos S4 poderiam se mover durante o *gating*.

O *gating* dos canais de sódio pode ser afetado pela presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no meio externo, que estabiliza o estado de repouso dos canais por alterar o campo elétrico na interface da membrana. A despolarização necessária para promover a abertura dos canais é proporcional à quantidade externa de  $\text{Ca}^{2+}$ , portanto altas concentrações desse íon levam, em última instância, a uma diminuição na excitabilidade celular (Frankenhaeuser e Hodgkin, 1957). O  $\text{Ca}^{2+}$  pode bloquear os canais de sódio em potenciais de membrana negativos, e esse efeito parece estar relacionado com o papel desse íon no *gating* dos canais de sódio (Armstrong e Cota, 1991).

#### ***1.1.4 - A Inativação***

Após a abertura, que dura cerca de 1 ms, os canais de sódio se convertem espontaneamente a um estado inativado não condutor. Esses canais apresentam dois tipos de inativação: uma rápida e uma lenta, que são cinética e funcionalmente independentes (Cummins e Sigworth, 1996). Durante despolarizações prolongadas o canal entra no processo de inativação lenta, do qual se recupera muito lentamente (Almers et al., 1983). A inativação rápida ocorre imediatamente após a abertura do canal, que leva poucos milissegundos para voltar ao repouso. O processo de inativação lenta parece envolver mudanças conformacionais complexas na proteína do canal, não sendo objeto de estudo deste trabalho.

Em 1981 Armstrong observou que a aplicação intracelular de proteases removia a inativação, indicando que as estruturas responsáveis por esse processo estão localizadas na face intracelular do canal. Em 1989 Stühmer et al., ao estudarem os efeitos da deleção ou da clivagem de porções citoplasmáticas do canal, observaram que a clivagem da alça que

conecta os domínios III e IV retardava a inativação. A ligação de anticorpos nessa alça inibe a inativação, inibição esta que é diminuída quando, após uma despolarização, o sítio de ligação para esses anticorpos se torna menos acessível (Vassilev et al., 1988, 1989). Essa alça é rica em resíduos positivamente carregados, que, apesar de afetarem a cinética da inativação, não são fundamentais para o desenvolvimento do processo (Moorman et al., 1990; Patton et al., 1992). Em 1992 West et al. mostraram que um motivo hidrofóbico formado pelos aminoácidos isoleucina, fenilalanina e metionina nas posições 1488 a 1490 era responsável pela inativação de canais de sódio de cérebro de rato, que era removida quando esses resíduos, especialmente a fenilalanina, eram substituídos por glutamina. Esse motivo, denominado IFM ou partícula de inativação, funciona então como um bloqueador que se liga à porção interna do canal, obstruindo o poro (Catterall, 2000). Em 1994 Eaholtz et al. mostraram que a aplicação de peptídeos contendo o motivo IFM restaurava a inativação de canais com a partícula de inativação mutada, o que foi consistente com a função atribuída a esse motivo.

A partícula de inativação bloqueia o poro através da interação com resíduos hidrofóbicos nas porções intracelulares do segmento S6 do domínio IV (McPhee et al., 1995) e nas alças que conectam os segmentos S4 e S5 dos domínios III e IV (Smith e Goldin, 1997; Lerche et al., 1997; Filatov et al., 1998; MCPhee et al., 1998; Tang et al., 1998). Esses resíduos provavelmente formam um receptor para a partícula de inativação (Catterall, 2000). A estabilidade do estado inativado é determinada pela força da interação entre a partícula de inativação e seu receptor, que por sua vez é determinada pela hidrofobicidade do resíduo na posição 1489, como demonstrado por Kellenberger et al. em 1997 ao estudarem o efeito de mutações no IFM.

Diferentes isoformas de canais de sódio podem apresentar propriedades cinéticas distintas quanto à inativação. Curiosamente essas propriedades não são transferidas de uma isoforma para outra com a transferência da alça de inativação, indicando que outras estruturas do canal devem determinar essas propriedades (Hartmann et al., 1994). Mantegazza et al. mostraram em 2001 que o segmento C terminal é responsável pela inativação mais rápida de canais  $Na_v1.2a$ , uma isoforma presente no cérebro, em relação a canais  $Na_v1.5$  cardíacos, influenciando também a dependência de voltagem da inativação. O segmento C terminal pode estar modulando a inativação através de interações com a

partícula de inativação ou com o seu receptor, ou através de modificações alostéricas envolvendo outras porções do canal.

### ***1.1.5 - O Acoplamento entre a Ativação e a Inativação***

Inicialmente assumia-se que a inativação rápida possuía sua própria dependência de voltagem, sendo independente do processo de ativação (Hodgkin e Huxley, 1952). No entanto, evidências sugerem que esses processos são acoplados, o que significa que a inativação não precisa apresentar dependência intrínseca de voltagem (Goldman e Schauf, 1972). Armstrong e Bezanilla observaram em 1977 que não havia correntes de *gating* correspondentes à inativação. Para explicar isso propuseram que a inativação depende do potencial de membrana por estar acoplada à ativação, um processo dependente de voltagem. Essa proposição foi confirmada por outros autores (Patlak, 1991). Eventualmente os canais de sódio podem inativar sem passar pelo processo de ativação (Vandenberg e Horn, 1984), sugerindo que apenas a mudança conformacional que permite a exposição do receptor para a partícula de inativação não é suficiente para promover a abertura do canal. Em 1981 Armstrong propôs um modelo, denominado “pé-na-porta”, para explicar o acoplamento entre a ativação e a inativação. Segundo esse modelo, as estruturas responsáveis pela ativação ficariam impedidas de retornar à posição de repouso devido a um impedimento causado pela ligação da partícula de inativação, que estaria exercendo um efeito de pé-na-porta. Dessa forma as correntes de *gating* correspondentes à desativação do canal, ou seja, à passagem para o estado fechado, não seriam observadas. De fato a inativação causa uma imobilização nas cargas de *gating*, o que comprova a veracidade do modelo.

É bastante razoável admitir que os sensores de voltagem do canal estejam envolvidos no acoplamento entre a ativação e a inativação. E, de fato, mutações dos resíduos carregados situados na porção mais extracelular do segmento S4 do domínio IV afetam seletivamente a inativação (Chen et al., 1996). Os processos de ativação e inativação podem ser desacoplados através da ligação de toxinas do tipo  $\alpha$  (ver seção 1.2.4), cujo sítio de ligação compreende, em parte, a porção extracelular do segmento S4 do domínio IV (Rogers et al., 1996; Sheets et al., 1999), o que constitui mais uma evidência do papel desse

segmento na inativação do canal de sódio. Contudo os mecanismos moleculares do acoplamento ainda permanecem obscuros.

### ***I.1.6 - A Corrente de Sódio***

Em síntese, o canal de sódio transita por diferentes estados conformacionais dependendo do potencial de membrana. Durante o repouso se encontra em um estado fechado não condutor. Com a despolarização ele transita rapidamente por um estado aberto condutor, passando espontaneamente para um estado inativado não condutor. Essa é obviamente uma visão simplificada do funcionamento do canal, que pode apresentar diversos estados fechados e inativados, cineticamente distintos.

O fluxo de sódio através do poro durante o estado aberto gera uma corrente, cujo sentido (entrada ou saída da célula) depende do equilíbrio eletroquímico. O decaimento das correntes de sódio, que se deve à inativação do canal, ocorre de um modo exponencial. Em 1984 Vandenberg e Horn mostraram que esse decaimento, em células GH3, se ajusta com uma única exponencial, com uma constante de tempo em torno de 3 ms em um potencial de 0 mV e na temperatura de ?.

O advento da técnica de *patch clamp* (ver seção III.5) tornou possível o registro das correntes iônicas e posteriormente das correntes de gating, que permitem, mesmo sem o conhecimento exato da estrutura terciária do canal, deduzir, ao menos em parte, os mecanismos que conferem as características fisiológicas dos canais de sódio.

## I.2 - Toxinas que atuam em Canais de Sódio

---

### I.2.1 - Sítios para a Ligação de Toxinas em Canais de Sódio

O papel crucial dos canais de sódio no desenvolvimento do potencial de ação, e, conseqüentemente no desempenho das funções dos tecidos muscular e nervoso, os torna um bom alvo para toxinas produzidas por animais ou plantas. Até o momento foram descritos seis sítios de ligação para toxinas no canal de sódio. Cada sítio é específico para a ligação de um determinado grupo de toxinas, e toxinas que se ligam a sítios diferentes não competem entre si na ligação. No entanto, algumas podem alterar alostericamente outros sítios (Catterall, 1992; Cestèle e Catterall, 2000).

Ao sítio 1, que compreende a porção N-terminal do segmento S6 de cada um dos quatro domínios (Noda et al., 1989; Terlau et al., 1991), se ligam as toxinas que bloqueiam o poro do canal, como as já mencionadas tetrodotoxina e saxitoxina e também as  $\mu$ -conotoxinas. A tetrodotoxina é isolada principalmente dos órgãos internos do peixe *Fugu* (Fuhrman, 1967), a saxitoxina extraída principalmente do dinoflagelado marinho *Gonyaulax catenella* (Schantz et al., 1986) e a  $\mu$ -conotoxinas do veneno do *Conus geographus* (Cruz et al., 1985; Sato et al., 1983).

Ao sítio 2, situado na porção transmembrana do segmento S6 do domínio I (Trainer et al., 1996), se ligam alcalóides como a batracotoxina, extraída da rã colombiana *Phyllobates aurotaenia*, a veratridina, extraída de plantas da família das Liliáceas, e a aconitina, extraída da planta *Acotinum napellus*. A ligação de toxinas ao sítio 2 resulta em uma ativação persistente, causada pela inibição da inativação e pelo deslocamento da ativação para potenciais mais negativos.

Ao sítio 3, que compreende parte da porção extracelular do segmento S4 do domínio IV, se ligam as toxinas de anêmona, as chamadas toxinas do tipo  $\alpha$  de escorpião e algumas toxinas de aranha. Essas toxinas, cuja ligação é dependente de voltagem, inibem a inativação dos canais de sódio (De Lima e Martin-Eauclaire, 1995). As toxinas do tipo  $\alpha$  e seu sítio de ligação serão discutidos com mais detalhes na seção referente às interações entre o canal de sódio e a tityustoxina, utilizada como ferramenta para se estudar os canais de sódio neste trabalho.

Ao sítio 4, que compreende a alça que conecta os segmentos S3 e S4 do domínio II, se ligam as toxinas do tipo  $\beta$  de escorpião. Propõe-se que a ligação dessas toxinas imobiliza o segmento S4 do domínio II na posição ativada, deslocando a dependência de voltagem da ativação dos canais de sódio para potenciais mais negativos (Cestèle et al., 1998).

Ao sítio 5, que compreende a porção transmembrana dos segmentos S6 do domínio I e S5 do domínio IV, se ligam as brevetoxinas e as ciguatoxinas, extraídas respectivamente dos dinoflagelados *Ptychodiscus brevis* e *Gambierdicus toxicus*. Essas toxinas modificam os canais de forma semelhante às toxinas que se ligam ao sítio 2, inibindo a inativação e deslocando a ativação para potenciais mais negativos (Benoit et al., 1986; Huang et al., 1984; Lombet et al., 1987).

E, finalmente, ao sítio 6 se liga a conotoxina-TxVIA isolada do gastrópodo marinho *Conus textile*. Ela se liga com alta afinidade em canais de sódio de moluscos e sistema nervoso de rato, inibindo a inativação de modo independente de voltagem.

### ***1.2.2 – Toxinas de Escorpião***

Os venenos de escorpião contêm uma grande variedade de peptídeos de baixo peso molecular que são tóxicos para vários organismos, inclusive o homem. Os canais iônicos são os principais alvos dessas toxinas, que constituem excelentes ferramentas para a caracterização funcional desses canais. As toxinas de escorpião que se ligam em canais de sódio constituem uma família de proteínas com cerca de 60 a 70 resíduos de aminoácidos, estabilizados por quatro pontes dissulfeto (De Lima e Martin-Eauclaire, 1995). Essas toxinas apresentam aminoácidos positivamente carregados em sua estrutura, o que provavelmente contribui para sua ligação a aminoácidos negativamente carregados presentes na superfície do canal.

As toxinas de escorpião específicas para canais de sódio de mamíferos podem ser divididas em  $\alpha$  ou  $\beta$ -toxinas. O efeito básico atribuído a ambos os tipos de toxina consiste na modificação do *gating* dos canais de sódio (Possani et al., 1999). Entretanto, como já descrito anteriormente, esses dois grupos de toxinas se ligam em sítios diferentes no canal, apresentando portanto efeitos farmacológicos bastante distintos. As  $\alpha$ -toxinas se ligam ao

sítio 3 dos canais de sódio, inibindo a inativação, enquanto as  $\beta$ -toxinas se ligam ao sítio 4 e afetam a ativação.

O escorpião *Tityus serrulatus* é, dentre as espécies encontradas no Brasil, uma das mais estudadas. Foram isolados três componentes tóxicos principais do veneno do *T. serrulatus*: componentes  $\gamma$  e III-8, que apresentam efeitos característicos de  $\beta$ -toxinas, e o componente IV-5, que apresenta efeitos característicos de  $\alpha$ -toxinas (Becerril et al., 1997).

Diferentes métodos para a purificação de toxinas têm sido usados ao longo dos anos, o que, somado a uma nomenclatura bastante confusa e frequentemente a uma incompleta caracterização molecular, torna a classificação e a distinção desses grupos de toxinas uma tarefa árdua. Os componentes  $\gamma$  e III-8 podem também ser encontrados sob os nomes de toxina VII e toxina II respectivamente, e o componente IV-5 sob os nomes de toxina IV ou tityustoxina.

### ***I.2.3 – A Tityustoxina***

O primeiro componente tóxico isolado do veneno do escorpião *T. serrulatus* foi a então denominada tityustoxina (Gomez e Diniz, 1966). Foi também isolada por Coutinho Netto em 1975, que a caracterizou como uma única cadeia polipeptídica com cerca de 60 resíduos de aminoácidos e peso molecular em torno de 7000 daltons. Ela induz a liberação de acetilcolina em fatias de córtex cerebral de rato, efeito que se mostrou dependente da presença de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  externos, além de levar a um aumento na captação desses íons nas fatias (Gomez et al., 1973, 1975). Um dos primeiros indícios de que o canal de sódio seria o alvo da tityustoxina foi o fato de que seu efeito na captação era inibido por tetrodotoxina, um bloqueador clássico de canais de sódio. No entanto a ligação da tityustoxina em canais de sódio não foi afetada pela aplicação de tetrodotoxina, o que é explicado pelo fato de que essas toxinas se ligam em sítios distintos no canal. A tityustoxina compete com a AaHII, uma  $\alpha$ -toxina clássica extraída do escorpião africano *Androctonus australis Hector*, pelo seu sítio de ligação em canais de sódio, o sítio 3, o que leva à classificação da tityustoxina como uma  $\alpha$ -toxina (Barhanin et al., 1982; Martin-Eauclaire et al., 1994). Estudos eletrofisiológicos mostraram que a tityustoxina aumenta a permeabilidade ao sódio, despolarizando as membranas pré e pós-sinápticas de preparações de nervo frênico de diafragma (Warnick et al., 1976). Os efeitos pós-sinápticos da tityustoxina consistem em inibição da inativação e no prolongamento da fase ativa da contração muscular. Pré-sinápticamente ela despolariza o terminal nervoso facilitando a liberação espontânea de neurotransmissores.

Quando a tityustoxina foi purificada em 1966, o único critério utilizado para considerá-la uma fração pura foi sua homogeneidade eletroforética em papel de acetato de celulose. Após ter sido utilizada nessas condições durante 26 anos, Arantes et al. em 1992 mostraram através de cromatografia de troca iônica que a fração correspondente à tityustoxina era na verdade composta de uma mistura de peptídeos. Então os efeitos atribuídos à tityustoxina poderiam ser uma somatória dos efeitos desses peptídeos. Arantes et al. consideram a tityustoxina como um dos peptídeos da fração ‘tityustoxina’, descrita em 1966 por Gomez e Diniz, sendo posteriormente considerada igual à TsIV-5 (Martin-Eauclaire et al., 1994). Na realidade a TsIV-5 deve corresponder à tityustoxina, o peptídeo,

e não à ‘tityustoxina’, a mistura de peptídeos. Becerril et al., em sua revisão a respeito de genes e toxinas do *T. serrulatus* (1997), fizeram considerações bastante plausíveis a respeito da confusão que envolve, entre outros aspectos, a nomenclatura de toxinas: ‘*The incomplete characterization and the lack of uniformity in the nomenclature of toxins from the venom of the scorpion T. serrulatus have motivated the appearance of a confusing range of names and symbols to designate these toxins. It is necessary to persuade authors in the field to avoid any more confusing names. If a new toxin is going to be reported, it should actually be new and it should be named with a consistent name, giving cross-reference to analogues described by other authors*’. É necessário esclarecer que a toxina utilizada neste trabalho, mesmo sendo chamada de tityustoxina, corresponde na verdade a uma mistura de peptídeos, como será mostrado. Nos referiremos ao peptídeo correspondente à tityustoxina pura como TsIV-5.

#### ***1.2.4 – A Interação entre Toxinas tipo $\alpha$ e o Canal de Sódio***

As toxinas do tipo  $\alpha$  são peptídeos que contêm de 60 a 70 resíduos de aminoácidos ligados por quatro pontes dissulfeto, sendo classificadas de acordo com sua especificidade para canais de sódio de mamíferos ou insetos, e pelas propriedades de ligação nos mesmos (Cestèle e Catterall, 2000). Toxinas tipo  $\alpha$  específicas para mamíferos ou insetos se ligam em sítios homólogos mas não idênticos, ambos denominados sítio 3, nos canais de sódio desses organismos.

Através da utilização de derivados fotoreativos de toxinas do tipo  $\alpha$  específicas para mamíferos, verificou-se que o sítio 3 do canal de sódio de cérebro de rato compreende as alças entre os segmentos S5 e S6 dos domínios I e IV (Tejedor e Catterall, 1988). Resíduos de aminoácidos básicos presentes na estrutura das toxinas tipo  $\alpha$  são responsáveis pela ligação com o canal e, através de mutagênese sítio dirigida, os resíduos de aminoácidos do canal envolvidos na interação foram identificados. Observou-se em canal de sódio de cérebro de rato (rIIa) que um resíduo de glutamato na posição 1613, na alça entre os segmentos S3 e S4 do domínio IV, era crucial para a ligação da toxina (Rogers et al., 1996). Posteriormente observou-se que resíduos de aspartato nas isoformas de canal de sódio

cardíaco e muscular, nas posições 1612 e 1428 respectivamente, desempenhavam o mesmo papel do glutamato 1613 do canal de sódio de cérebro de rato (Benzinger et al., 1998).

O principal efeito das toxinas do tipo  $\alpha$  consiste na inibição da inativação, um fenômeno causado pelo movimento da alça intracelular entre os domínios III e IV. Se as toxinas, que não são capazes de passar pela membrana, não podem afetar diretamente este movimento, então elas devem afeta-lo alostericamente, possivelmente alterando o acoplamento entre a ativação e a inativação. De fato o segmento S4 do domínio IV, cuja alça extracelular faz parte do sítio 3, é uma estrutura importante no acoplamento entre a ativação e a inativação.

A afinidade da ligação de toxinas do tipo  $\alpha$  em canais de sódio de mamíferos é dependente de voltagem, diminuindo em potenciais despolarizantes (Catterall, 1977; Catterall et al., 1976; Couraud et al., 1978). Isso indica que a estrutura do sítio 3 é afetada pelo potencial de membrana. Em 2000 Chen et al., estudando a modulação de canais de sódio de músculo esquelético ( $\mu 1$ ) por toxinas do tipo  $\alpha$  isoladas do escorpião *Leiurus quinquestriatus*, verificou que a dissociação dessas toxinas era dependente de voltagem. Isso foi observado posteriormente também para isoformas de canais de sódio cardíaco e neuronal (Chen et al., 2001; Gilles et al., 2001), e os resultados indicaram que a dependência de voltagem da dissociação se devia exclusivamente a propriedades do canal, sendo independente da toxina utilizada. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela dependência de voltagem da dissociação não são ainda muito claros.

O estudo das interações entre as toxinas e o canal de sódio pode portanto elucidar aspectos importantes do funcionamento e da estrutura do canal.

## **II - Objetivos**

---

### ***II.1 - Objetivo Geral***

Estudo dos efeitos da tityustoxina em canais de sódio de células GH3, visando-se estabelecer o seu mecanismo de ação.

### ***II.2 – Objetivos Específicos***

- Estudo dos canais de sódio dependentes de voltagem presentes em células GH3 através da medida direta de correntes de sódio;
- Caracterização cinética da corrente de sódio;
- Caracterização e quantificação do efeito da tityustoxina em canais de sódio, principalmente no que se refere às modificações causadas na inativação;
- Verificação da dependência de voltagem da dissociação da tityustoxina do seu sítio de ligação em canais de sódio;
- Estudo do efeito de variações de temperatura na dependência de voltagem da dissociação da tityustoxina.

### **III - Materiais e Métodos**

---

#### ***III.1 - Cultivo celular***

Foram utilizadas células GH3, linhagem proveniente de tumor da pituitária anterior de rato e obtida da American Type Culture Collection (ATCC). As células foram cultivadas em garrafas de 250 ml, mantidas em meio de cultura do tipo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA), sendo incubadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio era suplementado com bicarbonato de sódio 3,7 g/L, 10% de soro fetal bovino (CULTILAB) e 1% de solução penicilina/streptomicina (GIBCO), sendo esterilizado através de filtração. Quando começavam a atingir confluência, as células eram repicadas, sendo removidas através do tratamento com solução de tripsina 0,1%, e transferidas para placas de Petri em lamínulas de vidro para a realização dos experimentos.

#### ***III.2 - Soluções***

##### ***III.2.1 - Soluções para registro de correntes de entrada de Na<sup>+</sup>:***

Solução do banho (em mM):

NaCl 140

CsCl 5,4

CaCl<sub>2</sub> 1,8

glicose 5

HEPES 10

pH igual a 7,4 ajustado com NaOH.

Solução interna (em mM):

CsF 100

TEACl 40 (cloreto de tetraetilamônio)

EGTA 5

HEPES 10

pH igual a 7,2 ajustado com CsOH.

### ***III.2.2 - Soluções para registro de correntes de saída de Na<sup>+</sup> (gradiente invertido):***

Solução do banho (em mM):

ChoCl 140 (cloreto de colina)\*

CsCl 5,4

CaCl<sub>2</sub> 1,8

glicose 5

HEPES 10

pH igual a 7,4 ajustado com CsOH

\*Em alguns experimentos foi feita restituição parcial (20 ou 40 mM) e equimolar por NaCl.

Solução interna (em mM):

NaCl 130

EGTA 5

HEPES 10

pH igual a 7,2 ajustado com NaOH.

### ***III.3 - Análise, diluição e perfusão da Tityustoxina***

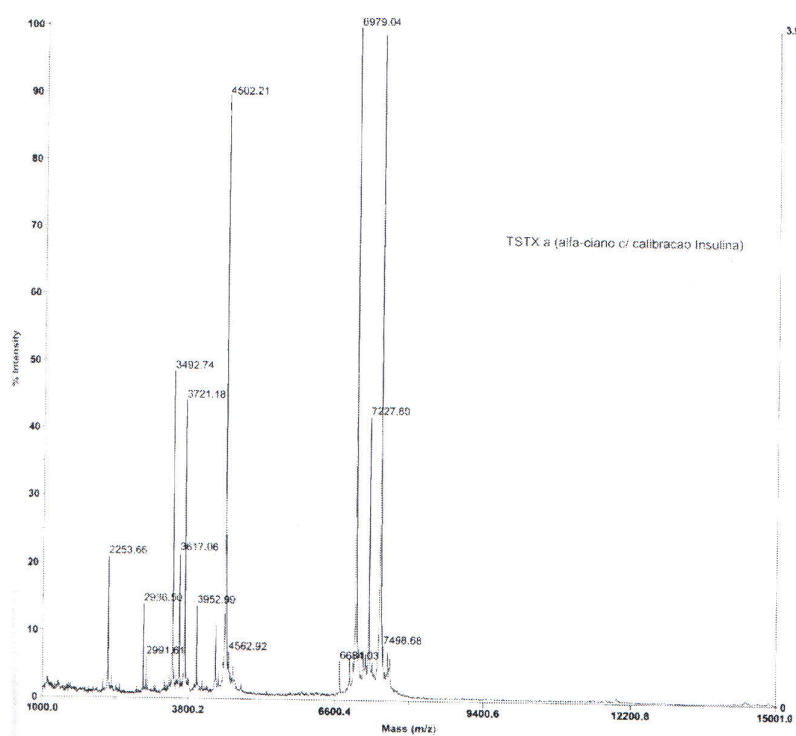
Os experimentos foram realizados com dois lotes (I e II) de tityustoxina (gentilmente cedidos pelo Prof. Tasso Moraes Santos). Os experimentos eram realizados utilizando-se inicialmente 14 µg/ml de tityustoxina (lote I), que era diluída em solução externa contendo 50 µg/ml de Citocromo C (SIGMA), para prevenir a adsorção da toxina. O Citocromo C não apresenta nenhum efeito sobre as correntes de Na<sup>+</sup>. Posteriormente variou-se a concentração de tityustoxina (lote II) para a realização de experimentos dose-resposta, sendo utilizada nas concentrações 0,07 µg/ml, 0,21 µg/ml, 0,7 µg/ml, 3,5 µg/ml, 7 µg/ml e 70 µg/ml, sendo esta última a concentração utilizada na maioria dos experimentos.

A tityustoxina era perfundida no banho através de um sistema de microperfusão concebido e construído por nós para a realização deste projeto. O sistema consiste na perfusão, por cerca de 1 segundo, de uma célula selecionada. A solução de perfusão, contendo a toxina, fica contida em uma micropipeta de borossilicato cuja ponta, medindo cerca de 80 µM de diâmetro, fica próxima à célula. A perfusão se faz por pressão ajustável

de uma coluna de água, construída a partir de uma pipeta de vidro de 2 ml. O controle de perfusão é feito acionando-se uma válvula solenóide, o que permite a utilização de volumes pequenos (cerca de 30  $\mu$ l) de solução contendo toxina. A perfusão era testada através da utilização de uma solução onde o NaCl era substituído por cloreto de colina. O desaparecimento da corrente de sódio durante a perfusão servia de controle da sua eficácia. Esse sistema é adequado para o estudo da tityustoxina, que se liga firmemente ao seu alvo, fazendo com que seu efeito permaneça mesmo muito tempo após o término da perfusão, e permitindo o uso de quantidades muito pequenas da toxina.

### III.4 - Espectrometria de Massa

Amostras dos lotes de tityustoxina foram submetidas à espectrometria de massa para a verificação da composição do material, e as análises mostraram que os lotes eram compostos de vários peptídeos. O espectro de massa representado abaixo é um exemplo do que foi observado. As espectrometrias de massa foram gentilmente realizadas pelos Professores Mário Palma e Carlos Bloch Jr.



Um dos picos obtidos neste espectro corresponde à massa da TsIV-5, cuja presença na mistura foi confirmada por experimentos eletrofisiológicos, descritos adiante.

### **III.5 - Eletrofisiologia**

As correntes eram registradas através da técnica de *patch-clamp* na modalidade *whole-cell*. Uma vedação de alta resistência (selo  $> 1 \text{ G}\Omega$ ) é formada entre a micropipeta de *patch*, conectada a um eletrodo de Ag/AgCl, e a membrana citoplasmática, que é então rompida através de pressão negativa. Dessa forma, há uma continuidade física e elétrica entre a solução contida na micropipeta (solução interna) e o citoplasma. As micropipetas, cujas resistências variavam em torno de  $2,5 \text{ M}\Omega$ , foram confeccionadas em vidro comum neutro, através de um estirador vertical de duas etapas (Narishige, modelo PP-83). A resistência em série era compensada em 50% para minimizar os erros de voltagem nos registros. As correntes eram filtradas em 5 kHz e registradas com uma frequência de amostragem de 10 kHz a cada 2 segundos. A aquisição dos dados foi feita através do programa PClamp 6, que controla o amplificador de *patch-clamp* Axopatch 200B (Axon Instruments) durante os experimentos, que foram monitorados através de um microscópio invertido *Nikon* montado sobre uma mesa antivibratória.

#### **III.5.1 – Temperatura do Banho**

A temperatura do banho era medida através de um termômetro digital (PSLB) e controlada através de um dispositivo (célula) *Peltier* ligado a um gerador de corrente (SINCLER SPS 2520.A). O *peltier* era conectado à saída da perfusão contínua, podendo resfriar ou aquecer a solução de acordo com a polaridade da corrente aplicada. A maioria dos experimentos era realizada em temperatura ambiente (temperatura do banho de  $24\text{--}26^\circ\text{C}$ ), sendo posteriormente mantida em  $20$  ou  $30^\circ\text{C}$ .

#### **III.5.2 - Protocolos**

Em todos os protocolos utilizados as células eram mantidas em um potencial de  $-80 \text{ mV}$  (*holding*). Antes do pulso teste, em geral  $0 \text{ mV}$  por  $40 \text{ ms}$ , era aplicado um pré-pulso hiperpolarizante de  $-100 \text{ mV}$  por  $80 \text{ ms}$ , suficiente para a remoção total da inativação.

### ***Relação Corrente-Voltagem***

A relação corrente x voltagem (I x V), que informa o estado conformacional do canal (aberto/fechado) dependendo do potencial aplicado, era feita aplicando-se potenciais que variavam de -80 a +90 mV por 40 ms. O pico das correntes (I) era medido durante a aplicação de cada potencial e então colocado como uma função da voltagem (V).

A dependência de voltagem das correntes foi observada através da equação:

$$(1) \quad I(V) = [g_{(m\acute{a}x)} \cdot (V_m - V_{rev})] / \{1 + \exp [(V_{1/2} - V_m) / k]\}$$

Onde I é a amplitude da corrente,  $g_{(m\acute{a}x)}$  é a condutância máxima ao íon em questão,  $V_m$  é o potencial de membrana,  $V_{rev}$  é o potencial de reversão da corrente,  $V_{1/2}$  é o potencial que ativa 50 % da condutância máxima e k é o fator de inclinação.

### ***Relação Condutância-Voltagem***

A condutância ao sódio em cada potencial foi calculada com base no pico da corrente em cada potencial dividida pela diferença entre o potencial e o potencial de reversão (obtido na equação 1). A condutância era então dividida pela condutância máxima, cujo valor era obtido através do ajuste da relação corrente-voltagem com a equação 1. Obtém-se então uma relação entre a condutância e a voltagem, através da curva da condutância dividida pela condutância máxima ( $g/g(max)$ ) em função da voltagem.

A dependência de voltagem da ativação da corrente foi observada através do ajuste da curva com uma função de Boltzmann:

$$(2) \quad g/g(max) (V) = 1/(1+\exp((V_g-V)/kg))$$

Onde V é o potencial aplicado,  $V_g$  é o potencial no qual 50% dos canais estão ativados e kg o fator de inclinação.

### ***Inativação do estado estacionário***

Para a inativação do estado estacionário, processo no qual o canal sofre inativação sem passar pelo estado aberto, o pré-pulso era substituído por pulsos condicionantes de 100 ms variando de -120 a 0 mV, que eram aplicados antes do pulso teste. As correntes resultantes eram normalizadas pela corrente máxima observada (I/I máx).

A dependência de voltagem do estado estacionário da inativação foi observada através de uma função de Boltzmann:

$$(3) \quad I/I_{\text{máx}}(V) = a + b/(1+\exp((V-V_h)/k_h))$$

Onde  $a$  é o *offset*,  $b$  é a amplitude máxima da relação  $I/I_{\text{máx}}$  ( $1-a$ ),  $V$  é o potencial aplicado,  $V_h$  é o potencial que inativa 50% dos canais e  $k_h$  o fator de inclinação.

### **Cinética e Grau da Inativação**

A cinética e o grau da inativação, bem como a extensão do efeito da tityustoxina, eram quantificados pelo ajuste do decaimento das correntes, obtido através das equações:

$$(4) \quad I(t) = a \cdot \exp(-t / \tau_1) + c$$

$$(5) \quad I(t) = [a \cdot \exp(-t / \tau_1)] + [b \cdot \exp(-t / \tau_2)] + c$$

Onde  $a$  e  $b$  são fatores de amplitude dos componentes rápido e lento, respectivamente,  $\tau_1$  e  $\tau_2$  são as constantes de tempo do decaimento,  $t$  o tempo a partir do pico da corrente e  $c$  o componente de amplitude da corrente não inativante.

A quantificação do efeito da tityustoxina nas correntes era feita através do cálculo da contribuição do componente lento do decaimento, dado pelo fator de amplitude  $b$  da equação 4. Para isso  $\tau_1$  e  $\tau_2$  eram fixados de acordo com a média de um experimento representativo de cada dia, para se minimizar o efeito de variações geradas nos ajustes individuais. Os critérios para a escolha dos registros representativos eram baseados na qualidade do experimento, especialmente no que diz respeito à resistência do selo, à amplitude da corrente e à extensão do efeito da toxina.

### ***Dissociação da Tityustoxina***

No intuito de se observar a dependência de voltagem da dissociação da tityustoxina de seu sítio de ligação, pulsos despolarizantes de 5, 20 ou 80 ms de duração variando de +60 a +200 mV, eram aplicados imediatamente após o pulso teste.

O grau de dissociação era observado através do grau de permanência do efeito da tityustoxina, quantificado pelas funções exponenciais já descritas.

### **Análise dos Dados**

A análise estatística foi feita através do teste  $t$  de *Student* ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o *software* Sigma Plot para confecção de gráficos e ajustes, através das equações citadas.

## IV – Resultados

---

### *IV.1 – Correntes de Entrada de Sódio em células GH3*

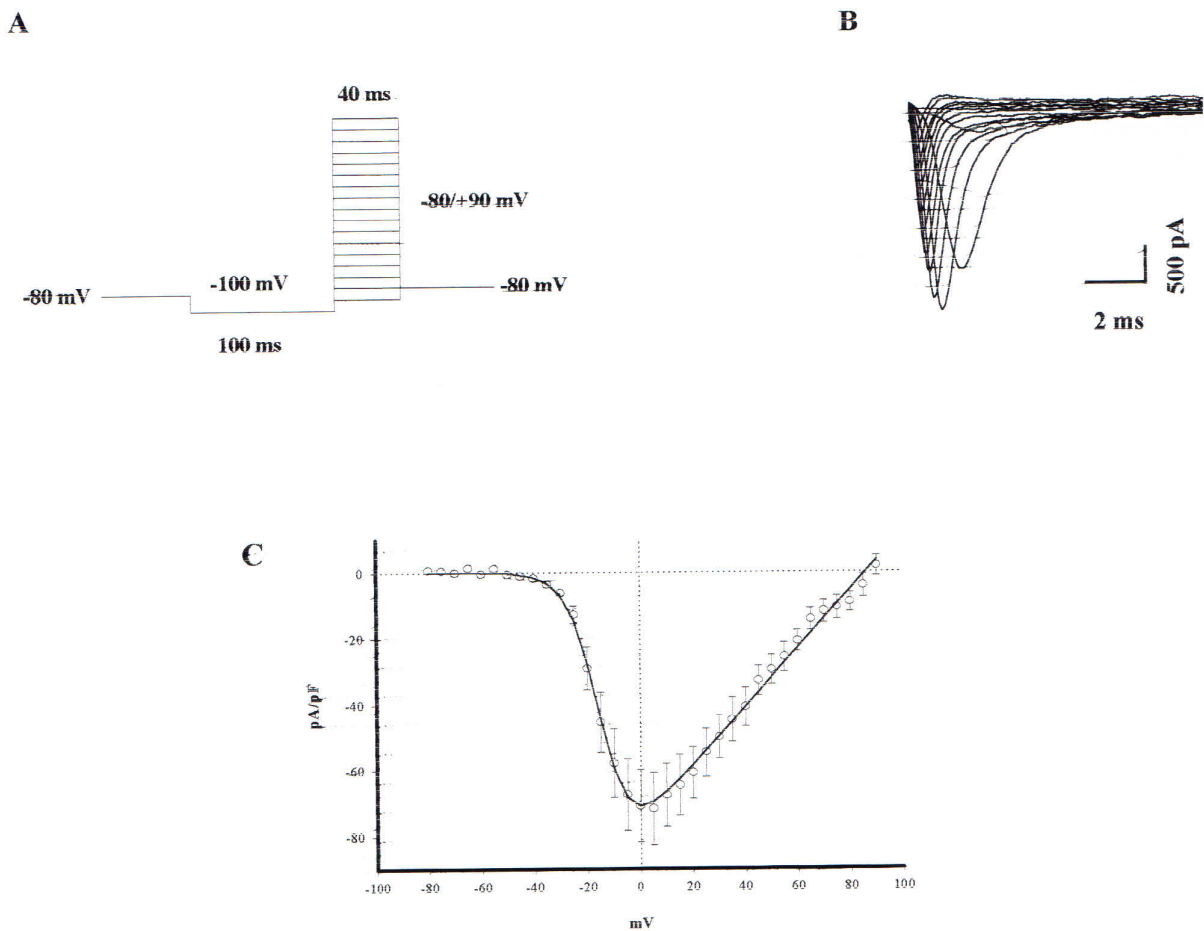
A presença de canais de sódio dependentes de voltagem em células GH3 foi confirmada através da medida direta de correntes macroscópicas de entrada de sódio, aplicando-se o protocolo ilustrado na figura 1A. A figura 1B mostra a sobreposição dos registros obtidos em cada potencial, medidos na temperatura ambiente. A dependência de voltagem das correntes foi confirmada através da relação corrente-voltagem ( $I \times V$ ), representada na figura 1C. Para a composição da figura foi calculada a densidade de corrente, na qual a amplitude das correntes é dividida pela capacitância de cada célula, ou seja, leva-se em conta a área de membrana plasmática das células utilizadas, que é proporcional à capacitância. A curva mostra que a densidade de corrente varia com o potencial, confirmando a dependência de voltagem das correntes de sódio nessas células, como o esperado. Observa-se que os canais começam a ativar em torno de  $-30$  mV, atingindo um pico de corrente em torno de  $0$  mV. O ajuste da relação  $I \times V$  com a equação 1 indica o potencial onde ocorre a reversão da corrente, parâmetro que caracteriza o íon carreador dessa corrente, bem como a condutância máxima para esse íon. Estes e os demais parâmetros obtidos através do ajuste estão mostrados na tabela 1.

Para se estudar a ativação dos canais de sódio, que é um processo dependente de voltagem, observou-se a variação da condutância em função de cada potencial aplicado, como mostra a relação condutância-voltagem representada na figura 2. Para a obtenção dos pontos, a condutância em cada potencial é dividida pela condutância máxima, calculada a partir do ajuste da relação corrente-voltagem com a equação 1. A dependência de voltagem da ativação da corrente, quantificada através do ajuste da curva com a equação 2, é bastante acentuada, dado que pequenas variações de potencial causam grandes variações na condutância em potenciais próximos a  $-20$  mV. Os parâmetros obtidos através do ajuste estão mostrados na tabela 2.

A relação  $I \times V$  (figura 1) mostrou que a corrente máxima foi obtida em  $0$  mV. Por este motivo esse potencial foi escolhido para o estudo cinético das correntes. A figura 3 mostra um registro representativo de uma corrente de entrada de sódio (negativa, por

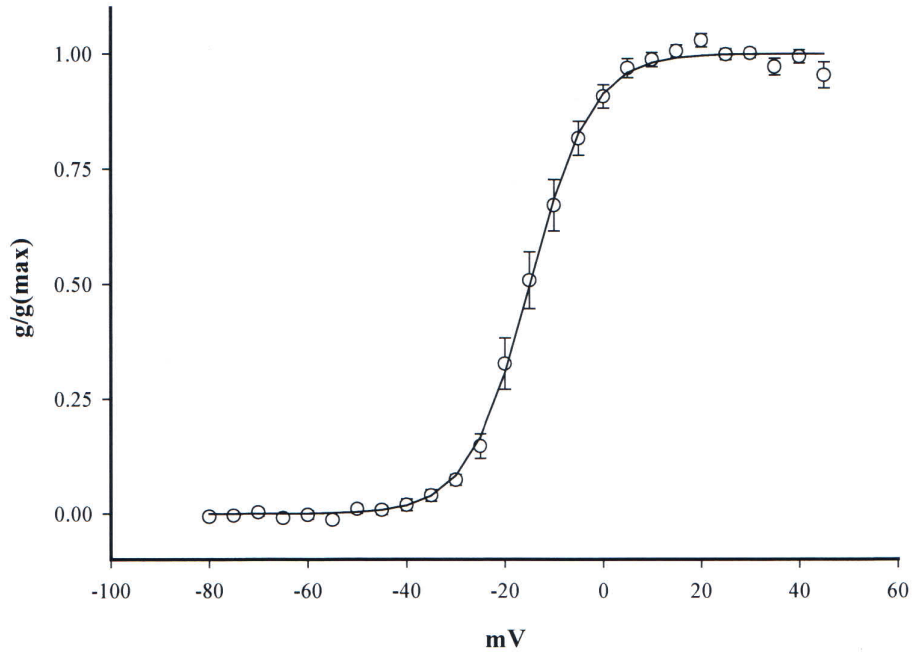
convenção) obtido na temperatura ambiente. Observa-se que, após o pico, a corrente decai rapidamente, sendo que este decaimento reflete o processo da inativação rápida. O método escolhido para o estudo da inativação foi então o ajuste exponencial do decaimento da corrente. Os melhores ajustes foram obtidos com duas exponenciais (equação 5), com uma constante de tempo rápida e uma constante de tempo lenta, cuja contribuição é, no entanto, muito pequena. Os parâmetros obtidos através do ajuste estão mostrados na tabela 3.

Mesmo não apresentando dependência intrínseca de voltagem, a inativação varia em função do potencial por estar acoplada à ativação. O estudo da dependência de voltagem da inativação se faz através do estado estacionário da inativação, que verifica a corrente remanescente após a aplicação de um pré-pulso de potencial variado, como mostrado no protocolo da figura 4A. A corrente remanescente é então normalizada pela corrente máxima e observada em função do potencial do pré-pulso, como mostrado na figura 4B. Observa-se que com a aplicação de pré-pulsos hiperpolarizantes a corrente registrada é máxima, diminuindo com a aplicação de pré-pulsos despolarizantes. A dependência de voltagem foi quantificada através do ajuste da curva com a equação 3, e os parâmetros obtidos estão mostrados na tabela 2.



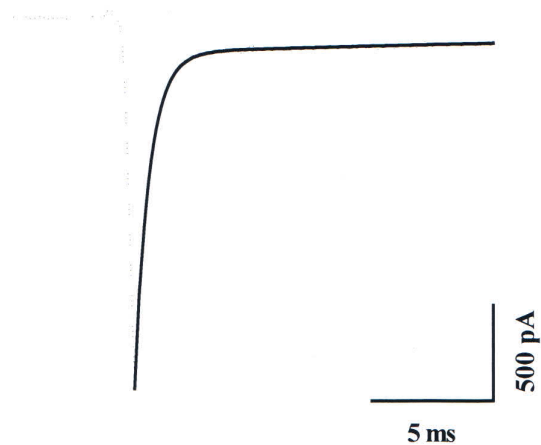
**Figura 1 – Correntes de Entrada de Sódio em Células GH3**

A) Protocolo de voltagem utilizado para se registrar as correntes de sódio. As células eram mantidas em um potencial de  $-80$  mV, e, após a aplicação de um pré-pulso hiperpolarizante de  $-100$  mV por 100 ms, eram despolarizadas durante 40 ms para potenciais que variavam de  $-80$  a  $+90$  mV. B) Família de registros superpostos representativos das correntes de entrada de sódio registradas em temperatura ambiente, obtidas com a aplicação do protocolo acima. A relação corrente-voltagem para essas correntes está representada na figura 1C. A ordenada expressa a densidade de corrente (em pA/pF), ou seja, a corrente máxima registrada em cada potencial (pA) dividida pela capacitância de cada célula (pF). Os símbolos vazados são os valores obtidos experimentalmente (média  $\pm$  SEM,  $n=11$ ) e a linha contínua representa o melhor ajuste obtido com a equação 1. Os parâmetros resultantes estão agrupados na tabela 1.



**Figura 2- Dependência de Voltagem da Ativação das Correntes de Sódio**

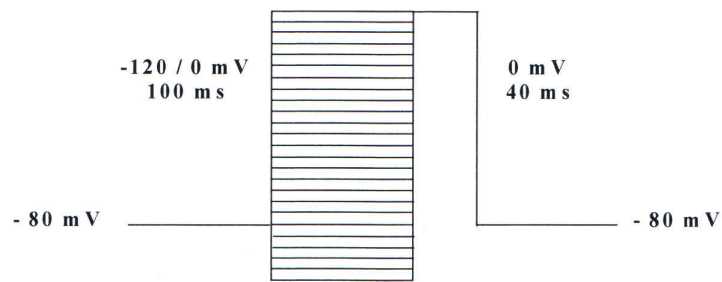
A relação entre a condutância e a voltagem foi obtida através do cálculo da condutância ao sódio ( $g$ ) no pico da corrente obtida em diferentes potenciais, calculada através da relação  $g = I_V / (V - V_{rev})$ , onde  $I_V$  corresponde à corrente registrada em cada potencial,  $V$  é o potencial e  $V_{rev}$  o potencial de reversão, dividida pela condutância máxima ( $g/g(max)$ ), em função da voltagem (mV). Os símbolos vazados representam os pontos experimentais (média  $\pm$  SEM,  $n=10$ ) e a linha contínua representa o ajuste obtido através da aplicação da equação 2, cujos parâmetros estão mostrados na tabela 2.



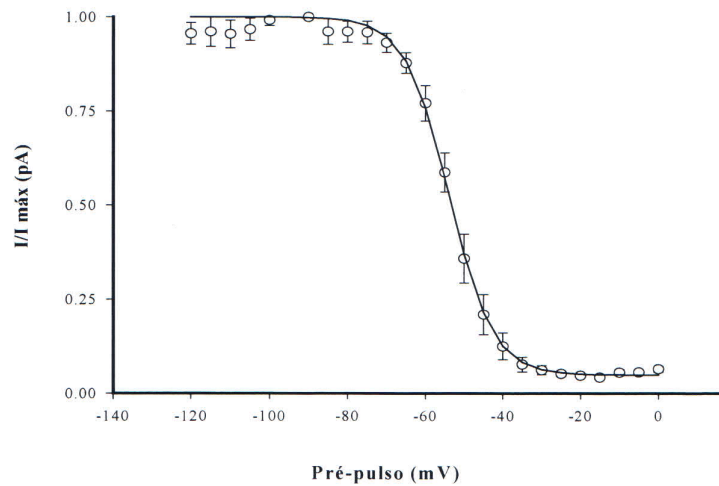
### **Figura 3 – O Curso Temporal do Decaimento da Corrente de Sódio**

Registros de correntes de sódio foram obtidos com a aplicação de pulsos de 40 ms para 0 mV. A linha pontilhada mostra um registro representativo da corrente de sódio. O melhor ajuste (linha contínua) para o decaimento desta corrente foi obtido com duas exponenciais, com uma constante de tempo rápida e uma lenta ( $\tau_1=0,61$  e  $\tau_2=29,6$  ms). No entanto a contribuição do componente lento no decaimento foi de apenas 6,95 % do total.

A



B



#### Figura 4 – Dependência de Voltagem da Inativação do Estado Estacionário

A) Protocolo utilizado para a obtenção da curva de inativação do estado estacionário. Após a aplicação de um pré pulso que variava de  $-120$  a  $0$  mV durante 100 ms, media-se a corrente remanescente em  $0$  mV durante 40 ms. B) Corrente normalizada pela corrente máxima ( $I/I_{\text{máx}}$ ) em função do potencial do pré-pulso. Os valores obtidos (símbolos vazados) foram ajustados com a equação 3 e os parâmetros resultantes do ajuste (mostrado na curva contínua) estão agrupados na tabela 2.

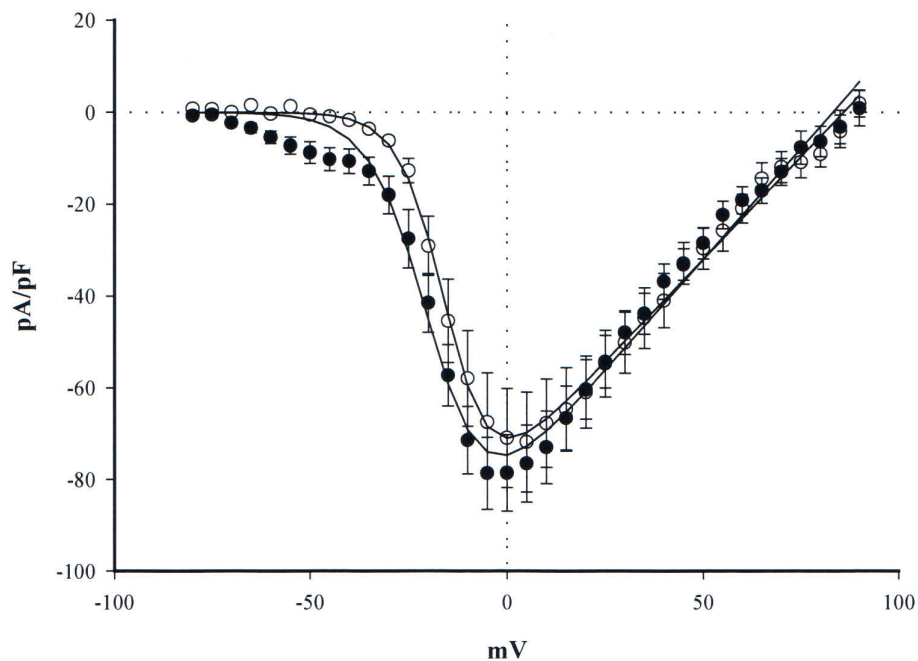
#### *IV.2 – Efeito da Tityustoxina nas Correntes de Entrada de Sódio*

Caracterizada então a corrente de sódio em condições controle, partiu-se para o estudo dos efeitos da tityustoxina nessas correntes. Os experimentos eram realizados inicialmente com uma concentração final de tityustoxina de 14  $\mu\text{g/ml}$ . No entanto, o efeito observado com a aplicação desta quantidade de material nem sempre era suficiente para uma análise confiável dos resultados. Então na maioria dos experimentos a concentração de tityustoxina foi elevada a 70  $\mu\text{g/ml}$ , uma vez que desejava-se um efeito saturante. Dados a utilização de diferentes concentrações, bem como de dois lotes distintos de tityustoxina, as especificações necessárias sobre o material serão apresentadas em cada experimento realizado.

Uma visão geral dos efeitos da tityustoxina foi obtida comparando-se as relações  $I \times V$  na ausência e na presença da toxina, como mostrado na figura 5. Observa-se que com a aplicação da toxina ocorre um aumento no pico da corrente, que permanece em torno de 0 mV. Na presença da toxina as correntes começam a ativar em potenciais bem mais negativos, o que não condiz com os efeitos atribuídos às toxinas do tipo  $\alpha$ , como será discutido posteriormente. Ambas as curvas foram ajustadas com a equação 1, sendo que para o ajuste da curva na presença da tityustoxina foram descartados os pontos obtidos de  $-80$  a  $-35$  mV, no intuito de analisar apenas o que se conhece como efeito  $\alpha$  (ver Discussão). Através dos ajustes, cujos parâmetros estão mostrados na tabela 1, observa-se que a presença da toxina não altera a seletividade do canal, dado que o potencial de reversão não foi modificado nessas condições. A condutância máxima ao sódio também não é modificada pela presença da toxina. O efeito da tityustoxina na dependência de voltagem da ativação foi então verificado, através da comparação das curvas de condutância, mostradas na figura 6. Através do ajuste das curvas com a equação 2, cujos parâmetros estão mostrados na tabela 2, observou-se que a dependência de voltagem da ativação das correntes, dada pela inclinação das curvas, não foi alterada. O potencial no qual metade da corrente está ativada não foi significativamente alterado pela presença da toxina, sendo que, também para este ajuste, os pontos experimentais obtidos de  $-80$  a  $-35$  mV foram desconsiderados, pelos motivos explicados acima.

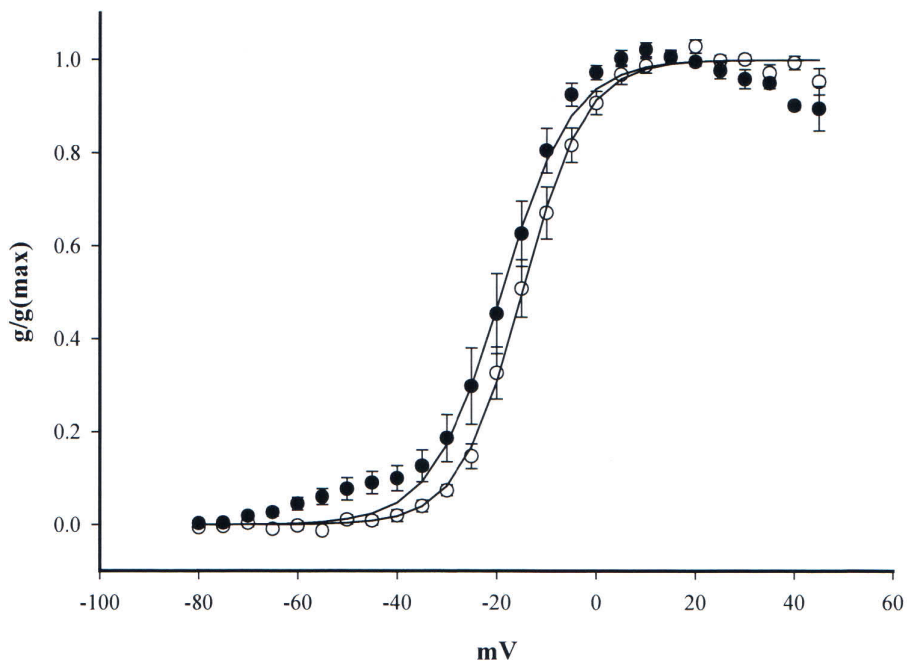
Dado que a tityustoxina não causou modificações significativas no que diz respeito à ativação das correntes de sódio, os efeitos na inativação foram então estudados. A figura 7 compara as correntes de sódio de registros representativos, obtidos da mesma célula, mostrados a partir do pico, na ausência e na presença da tityustoxina. Observa-se que o decaimento da corrente fica mais lento na presença da toxina, que também leva a um aumento no pico. A figura também mostra os melhores ajustes para o decaimento da corrente que, em ambas as condições experimentais, foram obtidos com duas exponenciais, com uma constante de tempo rápida e uma lenta. Entretanto a contribuição do componente lento no decaimento da corrente na presença da toxina aumenta em relação ao seu equivalente em condições controle. Curiosamente, além de diminuir a contribuição do componente rápido no decaimento exponencial, a toxina aumentou significativamente o valor da constante de tempo relativa a esse componente.

Caracterizado então um efeito bastante claro da tityustoxina na inativação dos canais de sódio, através da modificação do decaimento das correntes, os efeitos da toxina da dependência de voltagem da inativação foram então analisados. A figura 8 compara as curvas da inativação do estado estacionário na ausência e na presença da tityustoxina, obtidas como descrito na figura 4. Observa-se que a toxina desloca a curva para potenciais menos negativos. A figura também mostra os ajustes de ambas as curvas com equação 3, e os parâmetros obtidos (tabela 2) indicam que a toxina diminui a dependência de voltagem da inativação, e desloca o potencial no qual se obtém metade da corrente inativada para valores menos negativos. Verifica-se também que uma parcela significativa dos canais (14%)<sup>14</sup> resiste à inativação mesmo em potenciais tão despolarizantes como 0 mV.



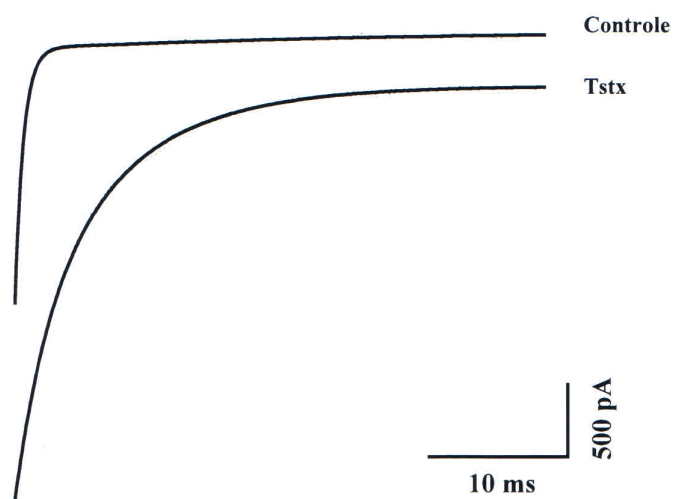
**Figura 5 – Efeito da Tityustoxina na Relação Corrente-Voltagem das correntes de Sódio**

O protocolo utilizado foi o mesmo descrito na figura 1A. Os símbolos vazados foram obtidos nas condições controle e os cheios na presença de 70  $\mu\text{g/ml}$  de tityustoxina (lote II) (média  $\pm$  SEM,  $n=11$ ). As linhas contínuas mostram os ajustes obtidos com a equação 1, cujos parâmetros estão agrupados na tabela 1. Para o ajuste na presença da tityustoxina não foram consideradas as correntes obtidas em potenciais entre  $-80$  e  $+35$  mV.



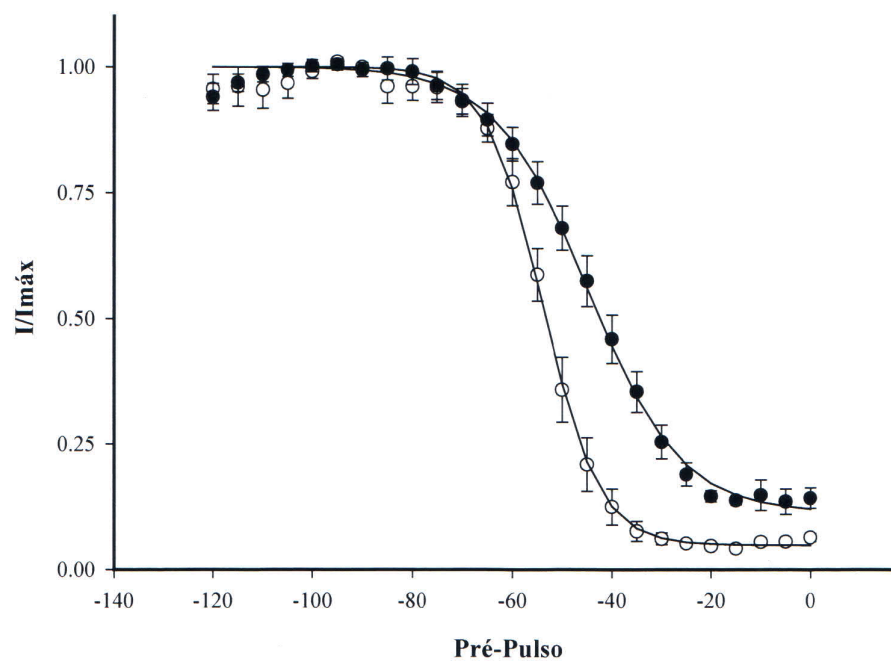
**Figura 6 - Efeito da Tityustoxina na Dependência de Voltagem da Ativação das Correntes de Sódio**

As relações condutância-voltagem foram obtidas como descrito na figura 2. Os símbolos vazados mostram a relação condutância-voltagem na condição controle (média  $\pm$  SEM,  $n=10$ ), e os símbolos cheios na presença de  $70 \mu\text{g/ml}$  de tityustoxina (lote II) (média  $\pm$  SEM,  $n=9$ ). As curvas foram ajustadas com a equação 2 e as linhas pretas mostram os melhores ajustes obtidos, cujos parâmetros estão representados na tabela 2. Para o ajuste na presença da toxina foram desconsideradas as condutâncias nos potenciais  $-80$  a  $-35$  mV.



**Figura 7 – Efeito da Tityustoxina no Decaimento da Corrente de Sódio**

As linhas pontilhadas mostram o decaimento de correntes de sódio (obtidas em 0 mV) na ausência e na presença de tityustoxina. O melhor ajuste para a corrente controle foi obtido com duas exponenciais ( $\tau_1=0,61$  e  $\tau_2=29,6$  ms). Na presença de 70  $\mu\text{g/ml}$  de toxina (lote II) o melhor ajuste foi obtido também com duas exponenciais ( $\tau_1=2,50$  e  $\tau_2=7,14$  ms). Entretanto, nessas condições, a contribuição do componente lento no decaimento foi de 59,3% do total. As linhas contínuas representam os ajustes obtidos em ambas as condições.



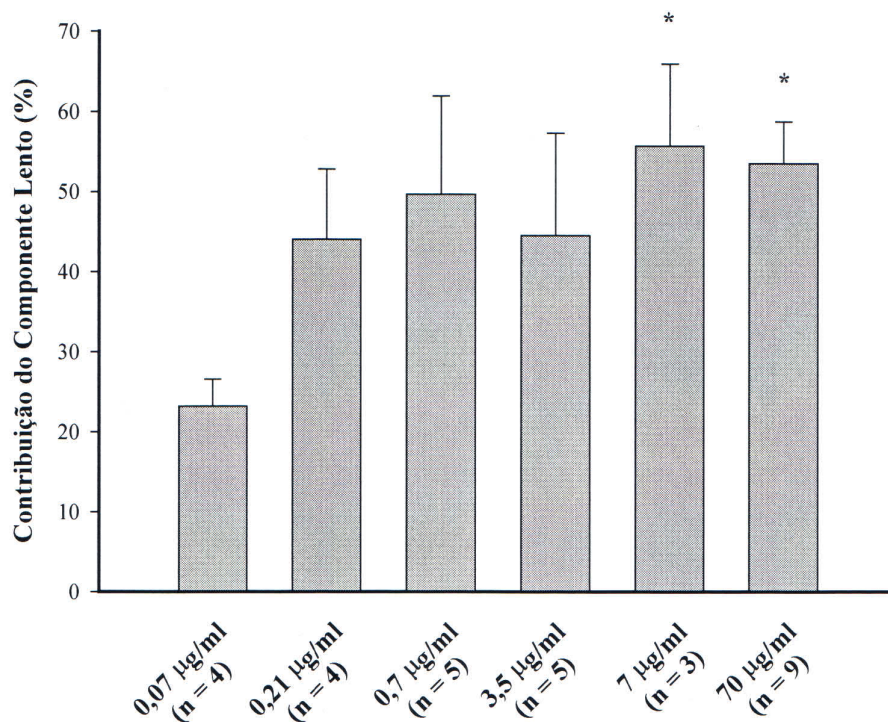
**Figura 8 – Efeito da Tityustoxina na Dependência de Voltagem da Inativação do Estado Estacionário**

As curvas de inativação do estado estacionário foram obtidas como descrito na figura 4. Os símbolos vazados mostram as curvas obtidas no controle (média  $\pm$  SEM, n=7) e os símbolos cheios na presença de 70  $\mu\text{g/ml}$  de tityustoxina (lote II) (média  $\pm$  SEM, n=7). As curvas foram ajustadas com a equação 3 (linhas pretas), e os parâmetros resultantes estão mostrados na tabela 2.

### ***IV.3 – Relação Dose-Resposta da Tityustoxina***

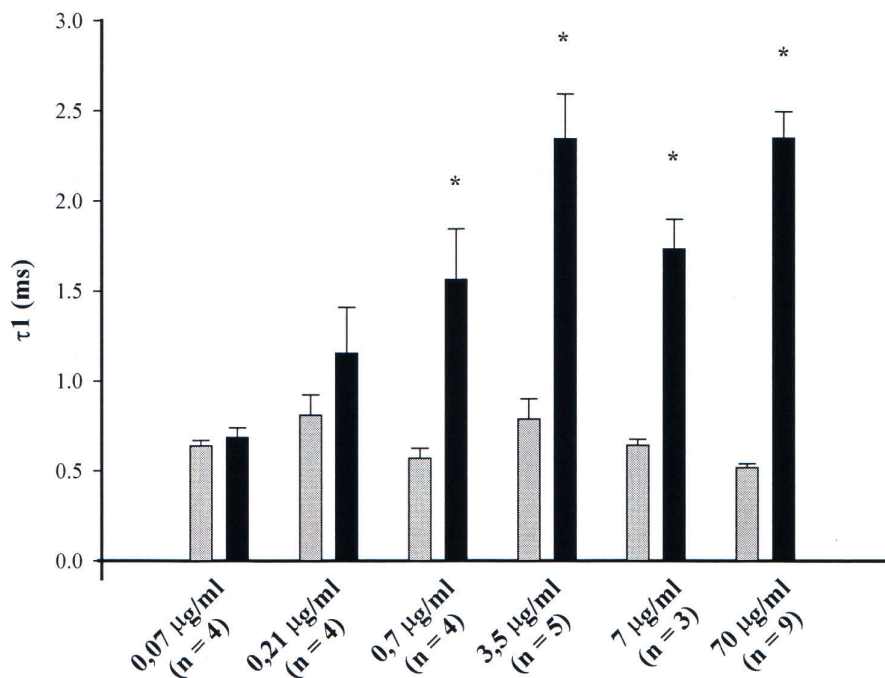
Os experimentos realizados até então mostraram que a tityustoxina exerce um efeito nítido no decaimento da corrente de sódio, aumentando a contribuição do componente lento bem como modificando a constante de tempo rápida do decaimento. Experimentos dose-resposta foram então realizados para se verificar o efeito de variações na concentração de toxina nas modificações observadas anteriormente. As correntes de sódio foram medidas na ausência e na presença de tityustoxina, em concentrações que variaram de 0,07 a 70 µg/ml. O decaimento das correntes, em todas as condições experimentais, foi ajustado com duas exponenciais, e os parâmetros obtidos estão mostrados na tabela 3.

Inicialmente o efeito de concentrações crescentes de tityustoxina foi comparado no que se refere à contribuição do componente lento do decaimento, como mostrado na figura 9. Observa-se que a contribuição aumenta com o aumento da concentração da toxina, aproximando-se de uma saturação. Verificou-se então o efeito de concentrações crescentes da tityustoxina na constante de tempo rápida do decaimento, como mostrado na figura 10, que compara os valores encontrados na presença e na ausência da toxina. Observa-se que em concentrações mais baixas da toxina a constante de tempo rápida é semelhante à sua equivalente no controle, sendo modificada com o aumento da concentração.



**Figura 9 – Efeito da Tityustoxina na Contribuição do Componente Lento do Decaimento da Corrente de Sódio**

A figura mostra o efeito da aplicação de concentrações crescentes de tityustoxina (lote II) na contribuição do componente lento do decaimento das correntes de sódio (média  $\pm$  SEM). Os asteriscos indicam existência de significância estatística, sempre em comparação ao grupo 0,07  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 10 – Efeito da Tityustoxina na Constante de Tempo Rápida do Decaimento das Correntes de Sódio**

A figura compara a constante de tempo rápida do decaimento em condições controle (barras cinza, média  $\pm$  SEM) e na presença de concentrações crescentes de tityustoxina (barras pretas, média  $\pm$  SEM) (lote II). Os asteriscos indicam existência de significância estatística entre as condições comparadas.

#### *IV.4 – Efeito da Despolarização na Dissociação da Tityustoxina do seu Sítio de Ligação em Canais de Sódio*

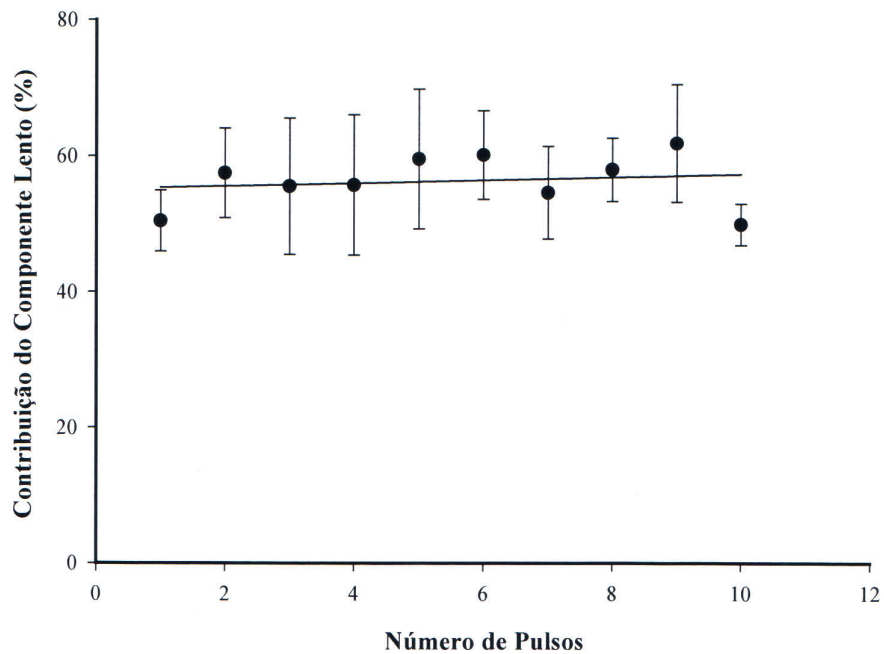
Sabe-se que a interação entre toxinas do tipo  $\alpha$  e o canal de sódio se faz de modo dependente de voltagem, e o efeito da despolarização na associação e na dissociação dessas toxinas tem sido estudado por vários pesquisadores. No entanto, as bases dessa dependência de voltagem ainda não estão totalmente esclarecidas. Daí o interesse de se estudar a dependência de voltagem da interação entre a tityustoxina, cujos efeitos na corrente de sódio foram caracterizados até então, e o canal de sódio, especialmente no que diz respeito à dissociação.

Observou-se que durante a aplicação de protocolos como da figura 3, ou seja, durante pulsos de 20 ms de duração para 0 mV, não havia dissociação significativa da tityustoxina, como mostrado na figura 11, onde se observa que a contribuição do componente lento permanece inalterada nessas condições. Para testar se pulsos despolarizantes mais fortes levariam à dissociação da toxina, o protocolo ilustrado na figura 12A foi aplicado. Os resultados apresentados inicialmente se referem a 15 pulsos para +120 mV de 20 ms de duração. Posteriormente a quantidade, a magnitude e a duração dos pulsos foram variadas, sendo os valores especificados em cada resultado apresentado. O registro obtido com a aplicação do primeiro pulso do protocolo foi tomado como controle, dado que, se nenhuma despolarização forte foi aplicada antes desse primeiro pulso, nenhuma dissociação deve ser observada. A figura 12B mostra a sobreposição dos registros obtidos com a aplicação do 1º e do 15º pulso do protocolo acima descrito. Observa-se que o decaimento da corrente volta a ser rápido após os 15 pulsos despolarizantes, o que pôde ser confirmado através dos ajustes exponenciais, também representados na figura. A figura 12C mostra as contribuições dos componentes rápido e lento do decaimento em função dos pulsos despolarizantes aplicados. Observa-se que a contribuição do componente lento, que representa, ao menos em parte, a proporção da corrente modificada pela toxina, diminui à medida que se aumenta o número de pulsos despolarizantes aplicados. A contribuição do componente lento decai exponencialmente, e o ajuste desse decaimento com uma função exponencial simples (equação 4) define o número de pulsos necessários para deslocar a toxina de 'e' vezes.

Mostrou-se então que a despolarização a +120 mV desloca a toxina do seu sítio de ligação. Posteriormente foram realizados experimentos nos quais variou-se a magnitude do pulso despolarizante, no intuito de se verificar a dependência de voltagem da dissociação. A figura 13 mostra o efeito da aplicação de pulsos despolarizantes crescentes na dissociação da toxina. Observa-se que o número de pulsos necessários à dissociação diminui significativamente, em relação a pulsos de +100 mV, à medida que se aumenta a magnitude do pulso despolarizante, sugerindo uma dissociação dependente de voltagem. Até então os experimentos foram realizados com pulsos despolarizantes de 20 ms de duração. Para verificar se a duração do pulso afeta a dissociação, pulsos de +120 mV com 5, 20 ou 80 ms de duração foram aplicados. A figura 14 mostra que o número de pulsos necessários à dissociação aumenta significativamente com a diminuição da duração do pulso. Então não apenas a magnitude, como também a duração do pulso, influi no grau de dissociação causado pela despolarização.

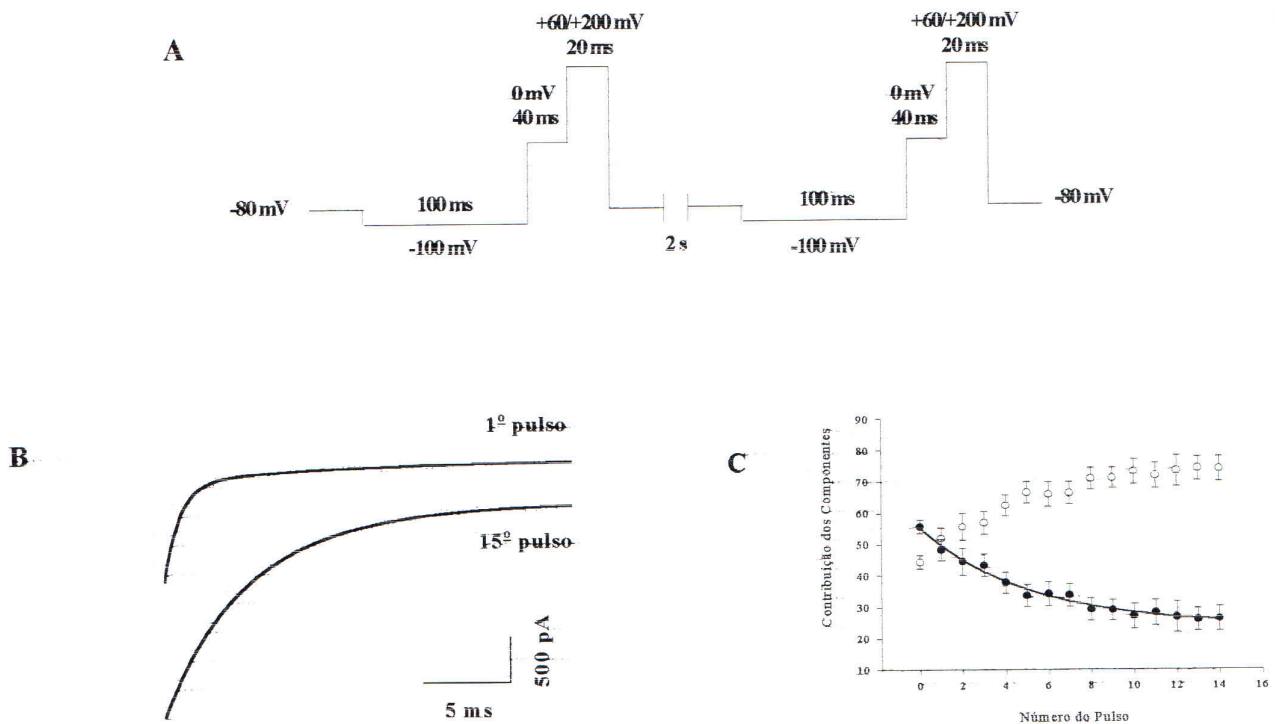
#### ***IV.5 – Efeito da Temperatura na Dissociação da Tityustoxina***

Até então os experimentos foram realizados em temperatura ambiente, sendo que nessas condições a temperatura do banho variou entre 24 e 26°C. Para investigar a dependência térmica da interação da tityustoxina com o canal de sódio, partiu-se para a verificação dos efeitos de variações na temperatura nos graus de associação e dissociação da, medidos através da modificação da velocidade da inativação. Os experimentos foram então realizados com a temperatura do banho mantida em 20 e 30°C. A figura 15 mostra o efeito da variação da temperatura na dissociação da tityustoxina do seu sítio de ligação. Observa-se que em temperaturas mais baixas o número de pulsos (no caso +120 mV durante 20 ms) necessários para remover a toxina aumenta significativamente, mostrando que variações na temperatura afetam a dissociação dependente de voltagem da tityustoxina.



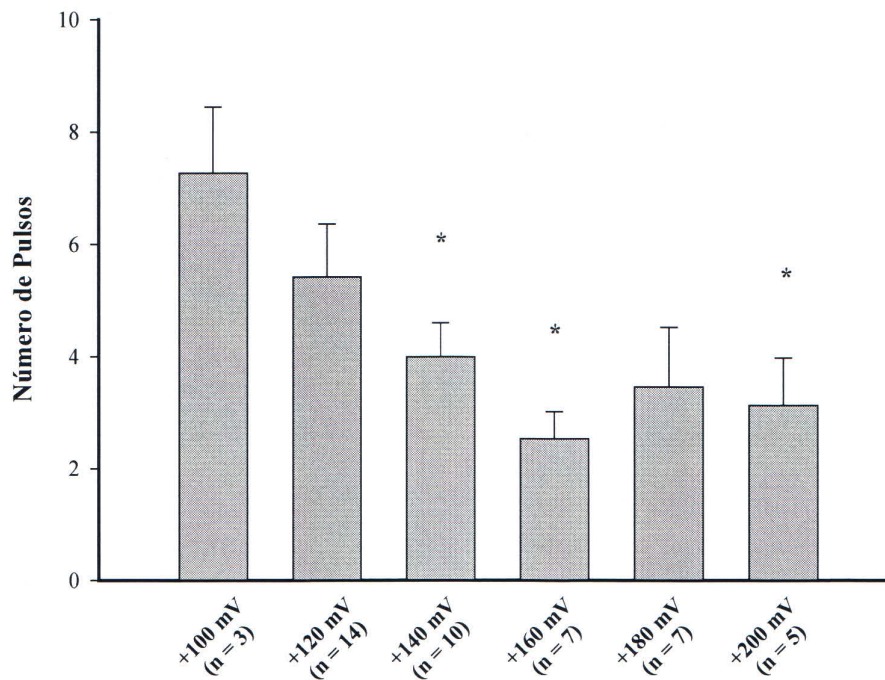
**Figura 11 – Efeito da Aplicação do Pulso Teste para 0 mV na Dissociação da Tityustoxina**

A contribuição do componente lento no decaimento das correntes de sódio, na presença de 14  $\mu\text{g/ml}$  de tityustoxina (lote I), foi usada como parâmetro para quantificar a fração da corrente modificada pela toxina. O gráfico mostra o efeito de 10 pulsos despolarizantes, com 2 s de intervalo, para 0 mV durante 40 ms. Os símbolos cheios representam a contribuição do componente lento durante a aplicação dos 10 pulsos (média  $\pm$  SEM,  $n=3$ ). A linha contínua mostra a regressão linear feita para os pontos obtidos.



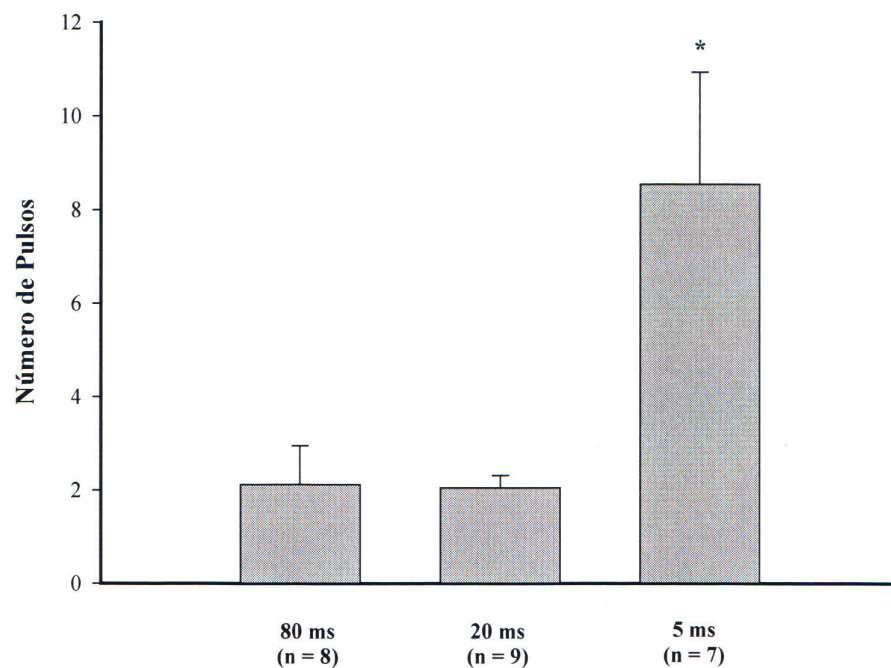
**Figura 12 – Efeito da Despolarização na Dissociação da Tityustoxina de seu Sítio de Ligação em Canais de Sódio**

A) Protocolo de pulsos utilizado para se observar o efeito da despolarização na dissociação da tityustoxina (14  $\mu\text{g/ml}$ , lote I). As células eram mantidas em  $-80\text{ mV}$ , hiperpolarizadas para  $-100\text{ mV}$  durante 100 ms e, logo após a aplicação de um pulso teste de  $0\text{ mV}$  por 40 ms, despolarizadas durante 20 ms para potenciais que variavam de  $+60$  a  $+200\text{ mV}$ . O protocolo era repetido a cada 2 segundos. B) Efeito da aplicação do protocolo descrito acima (pulso despolarizante para  $+120\text{ mV}$ ). As linhas pontilhadas mostram as correntes medidas na 1<sup>a</sup> e na 15<sup>a</sup> aplicação do protocolo, com os respectivos ajustes exponenciais (linhas contínuas). Em ambas as situações os melhores ajustes foram obtidos com duas exponenciais ( $\tau_1=2,59$ ,  $\tau_2=5,59$  e  $\tau_1=0,89$ ,  $\tau_2=10,4$  ms, para o 1<sup>o</sup> e o 15<sup>o</sup> pulso, respectivamente). C) Contribuições relativas dos componentes rápido (símbolos vazados, média  $\pm$  SEM,  $n=11$ ) e lento (símbolos cheios, média  $\pm$  SEM,  $n=11$ ) no decaimento da corrente durante a aplicação do protocolo. O ajuste foi feito com uma função exponencial simples e 5,1 foi o número de pulsos necessários para deslocar a toxina de 'e' vezes.



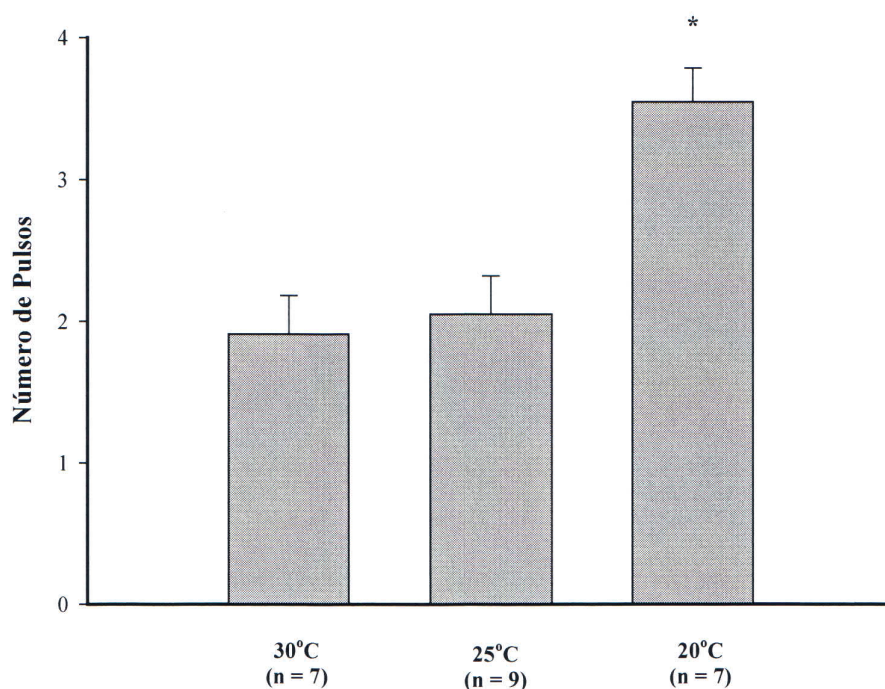
**Figura 13 - Dependência de Voltagem da Dissociação da Tityustoxina de seu Sítio de Ligação em canais de Sódio**

A dependência de voltagem da dissociação da tityustoxina (14 µg/ml, lote I) foi observada através da aplicação de pulsos despolarizantes de 20 ms de duração variando de +100 a +200 mV, através do protocolo descrito na figura 12A. O número de pulsos necessários para deslocar a toxina foi obtido através do ajuste do decaimento da contribuição do componente lento com uma função exponencial simples, como descrito na figura 12C. As barras cinza (média ± SEM) mostram o número de pulsos necessários para deslocar a tityustoxina em cada potencial estudado. Os asteriscos indicam existência de significância estatística ( $p < 0,05$ ) entre as condições, quando comparadas ao grupo +100 mV.



**Figura 14 - Efeito do Tempo de Despolarização na Dissociação da Tityustoxina de seu Sítio de Ligação em Canais de Sódio**

O efeito do tempo de despolarização na dissociação da tityustoxina (70 µg/ml, lote II) foi observado através da aplicação de pulsos despolarizantes para +120 mV, com duração de 5, 20 ou 80 ms, segundo o protocolo descrito na figura 12A. O número de pulsos necessários para deslocar a toxina foi obtido através do ajuste do decaimento da contribuição do componente lento com uma função exponencial simples, como descrito na figura 12C. As barras cinza (média ± SEM) mostram o número de pulsos necessários para deslocar a tityustoxina em cada tempo de despolarização estudado. O asterisco indica existência de significância estatística ( $p < 0,05$ ) na diferença observada entre o grupo 5 ms e os demais.



**Figura 15 - Efeito da Temperatura do Banho na Dissociação da Tityustoxina de seu Sítio de Ligação em Canais de Sódio**

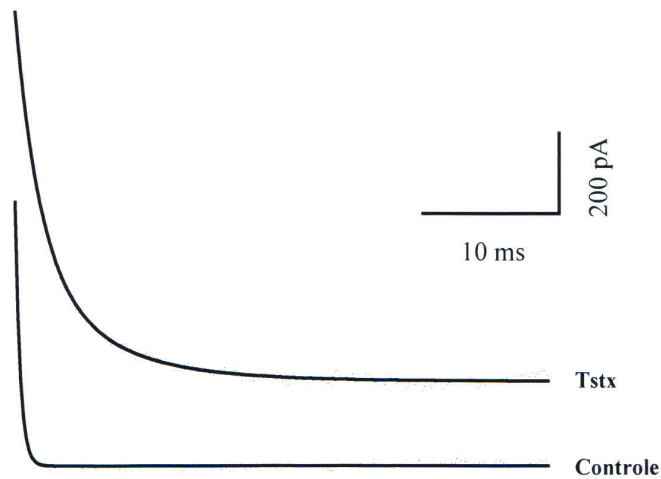
Os procedimentos para o controle da temperatura do banho foram descritos na seção III.4.1. Pulsos despolarizantes de 20 ms de duração para +120 mV foram aplicados através do protocolo descrito na figura 12A. O efeito da despolarização na dissociação da tityustoxina (70 µg/ml, lote II) foi observado em condições nas quais a temperatura do banho era mantida em 20, 25 ou 30°C. O número de pulsos necessários para deslocar a toxina foi obtido através do ajuste do decaimento da contribuição do componente lento com uma função exponencial simples, como descrito na figura 12C. As barras cinza (média ± SEM) mostram o número de pulsos necessários para deslocar a tityustoxina em cada temperatura estudada. O asterisco indica existência de significância estatística ( $p < 0,05$ ) entre as condições comparadas.

#### ***IV.6 – Efeito da Tityustoxina nas Correntes de Saída de Sódio***

Os experimentos anteriores sugerem que pulsos muito despolarizantes podem deslocar a tityustoxina de seu sítio de ligação em canais de sódio. No entanto esta não é a única explicação possível para o fenômeno observado. Uma hipótese alternativa seria a de que a reversão da corrente de sódio, que nestas condições experimentais ocorre em potenciais acima de +86,8 mV, portanto durante a aplicação dos pulsos despolarizantes empregados, poderia deslocar mecanicamente a toxina do seu sítio de ligação, que estaria situado próximo à boca externa do poro condutor.

Para testar essa hipótese as soluções interna e externa foram alteradas, conforme a descrição na seção III.2.2, de modo a permitir a obtenção de correntes de saída de sódio. Dessa forma, se o efluxo de sódio for responsável pelo deslocamento da tityustoxina, nos experimentos em condições nas quais o gradiente de sódio foi invertido, ou seja, quando as correntes de sódio passam a ser de saída, o deslocamento deve ocorrer mesmo em potenciais de 0 mV, nos quais não ocorria efluxo quando o gradiente de sódio era normal.

A figura 16 mostra registros de correntes de saída de sódio obtidos em 0 mV, representados a partir do pico, na ausência e na presença de 14 µg/ml de tityustoxina (lote I). Na ausência da toxina o decaimento das correntes se ajusta melhor com uma única exponencial, com uma constante de tempo rápida (tabela 4), sendo ainda mais rápida que sua equivalente no decaimento das correntes de entrada de sódio. Na presença da tityustoxina os melhores ajustes para o decaimento das correntes foram obtidos com duas exponenciais, com uma constante de tempo rápida, mais lenta que a constante de tempo obtida na ausência da toxina, e uma lenta (tabela 4). Ora, se a tityustoxina foi capaz de se ligar e, principalmente, de permanecer ligada ao canal nessas condições experimentais, então o efluxo de sódio não pode ser responsável pelo deslocamento da toxina do seu sítio de ligação.

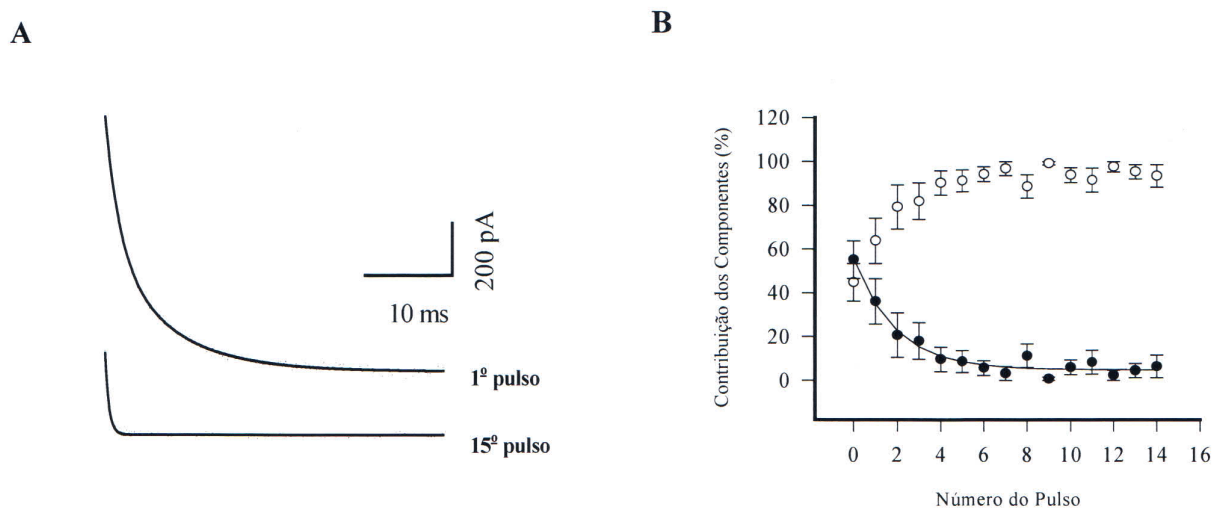


### Figura 16 - Efeito da Tityustoxina nas Correntes de Saída de Sódio

Correntes de saída de sódio foram registradas através da aplicação do protocolo descrito na figura 1. As linhas pontilhadas mostram o decaimento das correntes, obtidas em 0 mV, na ausência e na presença de 14  $\mu\text{g/ml}$  de tityustoxina (lote I). O melhor ajuste para o decaimento na condição controle foi obtido com uma única exponencial com uma constante de tempo rápida ( $\tau_1=0,36$  ms). Na presença da toxina o melhor ajuste foi obtido com duas exponenciais, com uma constante de tempo rápida e uma lenta ( $\tau_1=1,77$  e  $\tau_2=5,65$  ms). Ambos os ajustes são representados pelas linhas contínuas.

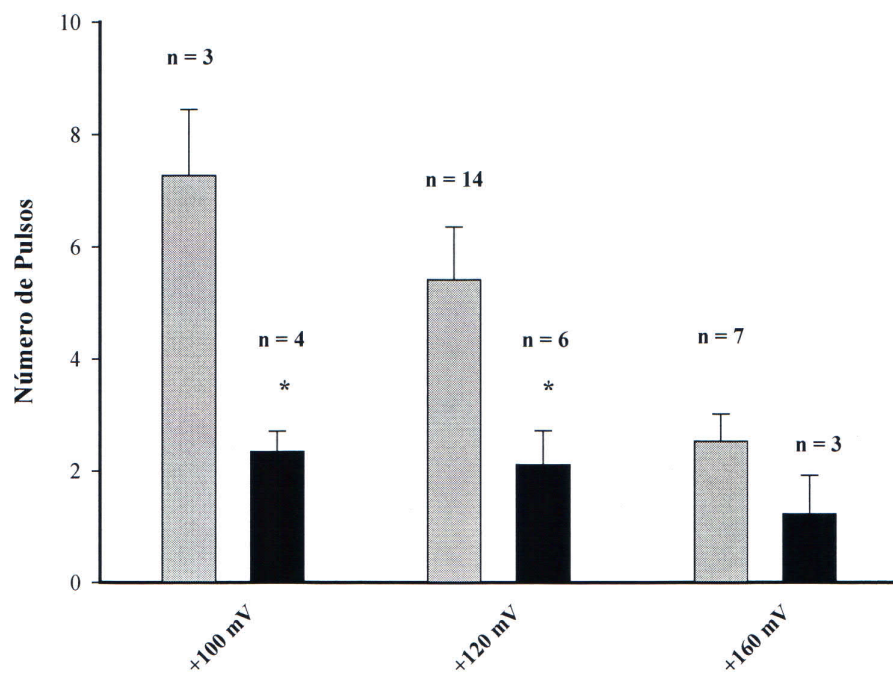
#### ***IV.7 – Efeito da Despolarização na Dissociação da Tityustoxina do seu Sítio de Ligação em Canais de Sódio sob Gradiente de Sódio Invertido***

Visto que a ligação entre a tityustoxina e o canal permanece estável em 0 mV também para as correntes de saída de sódio, o efeito da aplicação de pulsos despolarizantes mais fortes na dissociação da toxina foi então observado nessas condições experimentais, através da aplicação do protocolo descrito na figura 12A. A figura 17A mostra a sobreposição dos registros das correntes de saída de sódio em 0 mV na presença tityustoxina, e após a aplicação de 14 pulsos despolarizantes de 20 ms para +120 mV. Observa-se que, como ocorre para as correntes de entrada de sódio, a aplicação de pulsos despolarizantes fortes foi capaz de deslocar a toxina do seu sítio de ligação. O decaimento das correntes após a aplicação do protocolo volta a ser rápido, sendo que os melhores ajustes foram obtidos com uma única exponencial, com uma constante de tempo rápida como no controle. A figura 17B mostra a diminuição progressiva da contribuição do componente lento da inativação da corrente de sódio durante a aplicação do protocolo. Como para as correntes de entrada, o decaimento da contribuição do componente lento foi ajustado com uma função exponencial simples. Observa-se que o número de pulsos necessários para deslocar a toxina de 'e' vezes nessas condições experimentais foi significativamente mais rápido se comparada ao gradiente de sódio normal, como mostrado na figura 18, que compara o efeito da aplicação de pulsos despolarizantes para +100, +120 e +160 mV, na dissociação da toxina em gradiente normal e invertido. Então, embora a toxina exerça seu efeito mesmo em condições nas quais o gradiente de Na<sup>+</sup> foi invertido, o sentido da corrente de algum modo afeta a interação entre a toxina e o canal, como será discutido posteriormente.



**Figura 17 - Efeito da Despolarização na Dissociação da Tityustoxina do seu Sítio de Ligação em Canais de Sódio sob Gradiente Invertido**

O protocolo descrito na figura 12A foi aplicado para se estudar o efeito da despolarização na dissociação da tityustoxina nessas condições experimentais. A) Sobreposição dos registros (linhas pontilhadas) obtidos através da 1ª e da 15ª aplicação do protocolo (pulso despolarizante de 20 ms para +120 mV). Com a aplicação do protocolo o decaimento da corrente volta a ser rápido, como indicam os ajustes exponenciais representados pelas linhas contínuas. O melhor ajuste para o decaimento do 1º registro foi obtido com duas exponenciais, com uma constante de tempo rápida e uma lenta ( $\tau_1=1,67$  e  $\tau_2=6,90$  ms). Para o decaimento do 15º registro o melhor ajuste foi obtido com uma única exponencial, com uma constante de tempo rápida semelhante à sua equivalente no controle ( $\tau_1=0,43$  ms). B) Contribuições relativas dos componentes rápido (símbolos vazados, média  $\pm$  SEM, n=6) e lento (símbolos cheios média  $\pm$  SEM, n=6) no decaimento da corrente durante a aplicação do protocolo.



**Figura 18 - Dependência de Voltagem da Dissociação da Tityustoxina de seu Sítio de Ligação em canais de Sódio sob Gradiente de Sódio Invertido**

A figura compara a dependência de voltagem da dissociação da tityustoxina (14 µg/ml, lote I) sob gradiente normal (barras cinza, média ± SEM) e invertido (barras pretas, média ± SEM), sendo que os pulsos despolarizantes aplicados foram de +100, +120 e +160 mV. Os asteriscos indicam existência de significância estatística entre as condições comparadas.

	$V_{rev}$	$V_{1/2}$	$g_{(max)}$	$k$
<b>Controle</b> (n = 10)	85,79 ± 3,56	-14,60 ± 1,43	0,86 ± 0,11	5,76 ± 0,43
<b>Tstx (70 µg/ml)</b> (n = 10)	85,01 ± 4,64	-19,63 ± 2,30	0,97 ± 0,11	6,71 ± 0,66

**Tabela 1 – Efeito da Tityustoxina na dependência de voltagem das correntes de sódio.**

Os valores representam a média ± SEM para todos os parâmetros estudados. Com exceção do  $V_{1/2}$ , as diferenças observadas entre os grupos controle e Tstx não foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

	<b>Ativação</b> (controle n = 10; Tstx n = 9)		<b>Inativação</b> (n = 9)	
	$V_g$	$kg$	$V_h$	$kh$
<b>Controle</b>	-14,60 ± 1,43	5,72 ± 0,42	-53,05 ± 1,43	5,05 ± 0,31
<b>Tstx (70 µg/ml)</b>	-18,24 ± 2,04	6,23 ± 0,64	-44,08 ± 1,98	9,56 ± 1,11

**Tabela 2 - Efeito da Tityustoxina nas dependências de voltagem da ativação e da inativação da corrente de sódio.**

Os valores representam a média ± SEM para todos os parâmetros estudados. Em relação aos parâmetros referentes à dependência de voltagem da ativação as diferenças observadas, entre os grupos controle e Tstx, não foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Em relação à inativação as diferenças observadas entre os grupos foram significativas ( $p < 0,05$ ), para todos os parâmetros estudados.

	<b>a (%)</b>	<b><math>\tau</math>1 (ms)</b>	<b>b (%)</b>	<b><math>\tau</math>2 (ms)</b>
<b>Controle</b> (n = 10)	87,97 ± 1,53	0,51 ± 0,02	12,02 ± 1,53	7,73 ± 2,45
<b>Tstx (70 µg/ml)</b> (n = 9)	46,48 ± 5,23	2,35 ± 0,14	53,51 ± 5,23	7,07 ± 0,41
<b>Tstx (7 µg/ml)</b> (n = 3)	44,28 ± 10,22	1,73 ± 0,16	55,71 ± 10,22	5,22 ± 0,66
<b>Tstx (3,5µg/ml)</b> (n = 4)	59,64 ± 15,54	2,40 ± 0,30	40,35 ± 15,54	22,57 ± 9,72
<b>Tstx (0,7µg/ml)</b> (n = 3)	61,62 ± 13,78	1,73 ± 0,32	38,37 ± 13,78	9,35 ± 3,83
<b>Tstx(0,21µg/ml)</b> (n = 4)	44,92 ± 12,21	1,25 ± 0,31	55,07 ± 12,21	4,87 ± 0,92
<b>Tstx(0,07µg/ml)</b> (n = 4)	76,79 ± 3,35	0,68 ± 0,05	23,20 ± 3,35	6,92 ± 3,48

**Tabela 3 - Relação dose-dependência da Tityustoxina**

Os valores representam a média ± SEM para todos os parâmetros estudados. Foi utilizado o lote II da Tityustoxina para a realização dos experimentos. Os valores utilizados como controle correspondem aos experimentos realizados com 70 µg/ml de toxina.

	Gradiente Normal de Na <sup>+</sup> (n = 6)		Gradiente Invertido de Na <sup>+</sup> (controle n = 7; Tstx n = 8)	
	Controle	Tstx (14 µg/ml)	Controle	Tstx (14 µg/ml)
<b>a (%)</b>	84,38 ± 2,93	42,46 ± 13,21	100	44,89 ± 10,76
<b>τ1 (ms)</b>	0,45 ± 0,02	1,47 ± 0,20	0,51 ± 0,07	1,35 ± 0,12
<b>b (%)</b>	15,61 ± 2,93	57,53 ± 13,21	-	55,10 ± 10,76
<b>τ2 (ms)</b>	15,33 ± 6,53	8,46 ± 3,15	-	5,98 ± 1,49

**Tabela 4 – Efeito da Tityustoxina em correntes de entrada e saída de sódio.**

Os valores representam a média ± SEM para os parâmetros estudados, exceto para o valor referente à contribuição do componente rápido no decaimento (a) no controle dos experimentos com gradiente invertido, visto que das oito células estudadas, todas apresentaram 100 % de contribuição deste componente. Em relação aos parâmetros observados em gradiente normal de sódio, apenas a diferença entre os valores de τ2 não foi significativa (p<0,05). Em relação aos parâmetros observados em gradiente invertido de sódio, a diferença entre os valores de t1, único parâmetro a ser comparado, foi significativa (p<0,05).

## V – Discussão

---

### *V.1 – As Correntes de Sódio*

As células GH3 expressam canais de sódio em quantidade suficiente para o registro confiável das correntes macroscópicas de sódio. De modo geral as correntes registradas neste trabalho estão de acordo com o que tem sido observado para essas células, ou seja, apresentaram ativação rápida e dependente de voltagem e, após o pico, um rápido decaimento. Em potenciais positivos as correntes não apresentaram nenhuma propriedade de retificação, sendo conduzidas tão bem para fora das células como para dentro, dependendo apenas do gradiente de  $\text{Na}^+$  nas soluções utilizadas.

Algumas diferenças foram observadas em relação à cinética do decaimento das correntes de entrada de sódio. Vandenberg e Horn observaram em 1984 que o decaimento das correntes de sódio, em células GH3, se ajustava melhor com uma única exponencial, com uma constante de tempo em torno de 3 ms. Nós obtivemos melhores ajustes com duas exponenciais, com uma constante de tempo rápida e uma lenta, sendo que a contribuição dessa última no decaimento é muito pequena. Entretanto, em experimentos preliminares (não apresentados nos resultados), nos quais foram utilizadas as mesmas condições experimentais, os melhores ajustes foram obtidos com uma única exponencial, com uma constante de tempo em torno de 1 ms. A constante de tempo foi mais rápida se comparada à obtida por Vandenberg e Horn porque nossos experimentos eram realizados na temperatura ambiente.

O aparecimento de um segundo componente no decaimento das correntes de sódio poderia ser devido a uma contaminação dessas correntes com correntes de cálcio. As células GH3 expressam canais de cálcio constitutivamente, e as correntes geradas pela passagem de  $\text{Ca}^{2+}$  por algumas isoformas desses canais apresentam um decaimento lento, se comparado ao decaimento das correntes de sódio. Então, mesmo na baixa concentração utilizada nos experimentos, o  $\text{Ca}^{2+}$ , que não pode ser retirado da solução pois garante a estabilidade do selo, poderia estar afetando os ajustes. A adição de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , que é um bloqueador de canais de cálcio, deveria então abolir esse segundo componente, o que não foi observado (experimentos não mostrados). As causas que levaram ao aparecimento do segundo componente no decaimento permanecem então desconhecidas. Curiosamente,

nas correntes de saída de sódio esse segundo componente não aparece, dado que os melhores ajustes para o decaimento nessas condições foram obtidos com uma única exponencial, com uma constante de tempo rápida, ainda mais rápida que sua equivalente nas correntes de entrada. Isso mostra que, o que estiver causando o aparecimento de um segundo componente lento no decaimento o faz de modo dependente do sentido da corrente.

## ***V.2 - A toxina***

O efeito de toxinas do tipo  $\alpha$  na inativação dos canais de sódio é alvo de vários estudos, não apenas farmacológicos e biofísicos como também bioquímicos, no sentido de se inferir a estrutura do canal com base na ligação específica dessas toxinas. Em linhas gerais, os resultados por nós obtidos com a tityustoxina estão de acordo com o que tem sido observado para toxinas do tipo  $\alpha$ . Ela afeta especificamente a inativação dos canais de sódio, o que pôde ser constatado principalmente através dos efeitos na cinética do decaimento das correntes de sódio. Na presença da toxina o decaimento foi mais lento, ajustando-se melhor com duas exponenciais, sendo que a contribuição do componente lento aumentou. Em relação às constantes de tempo, observou-se que na presença da toxina a constante de tempo rápida é significativamente mais lenta se comparada à sua equivalente no controle, enquanto a constante de tempo lenta, mais variável, não é significativamente alterada.

Inicialmente a contribuição do componente lento no decaimento havia sido usada para se quantificar a proporção de canais modificados pela toxina, dado que no controle esse componente é inexistente ou muito pequeno. No entanto, a modificação que a toxina causa no componente rápido inviabilizou esse tipo de conclusão, pois do contrário a proporção de canais modificados poderia ser subestimada. A relação entre esses dois tipos de modificação observados na cinética do decaimento foi estudada através de experimentos dose-resposta, inferindo-se uma possível dependência de concentração nas modificações observadas. Verificou-se que a modificação na constante de tempo rápida do decaimento era dependente da concentração da toxina nos mesmos níveis que a modificação da contribuição do componente lento. Houve inclusive uma saturação do efeito em ambos os casos.

A explicação mais simples e provável para esses resultados seria a presença de, pelo menos, dois peptídeos tipo  $\alpha$  na tityustoxina utilizada nos experimentos, ambos se ligando ao sítio 3 de canais de sódio, porém provocando efeitos com diferentes intensidades na velocidade da inativação. O que significa que, em concentrações saturantes da tityustoxina, parte dos canais presentes na membrana estará ligada a um dos peptídeos e, o restante dos canais, ao outro peptídeo. Em baixas concentrações da tityustoxina tem-se a contribuição de uma outra população de canais, ou seja, aqueles que não foram de forma alguma modificados, o que explicaria o desaparecimento dos efeitos causados por ambos os peptídeos nessas condições experimentais. Ora, se os dois peptídeos se ligam ao mesmo sítio, eles devem competir pela ligação, o que explicaria porque, mesmo em concentrações saturantes da mistura a contribuição do componente lento nunca se aproxima de 100%. Os resultados obtidos com a espectrometria de massa, realizada em todos os lotes de tityustoxina utilizados, mostram a presença de 3 ou 4 peptídeos, alguns sem efeito conhecido.

Uma hipótese alternativa, se houver apenas um único peptídeo com efeito  $\alpha$  na tityustoxina, seria a existência de diferentes configurações conformacionais envolvendo a ligação desse peptídeo no canal. Desta forma, seria possível o canal de sódio inativar mais rápida ou mais lentamente, dependendo da conformação. Se esta hipótese for verdadeira, o comportamento observado no presente trabalho deverá ser observado mesmo com a toxina pura, e em experimentos de correntes unitárias.

Outra possibilidade, que não podemos descartar, seria a presença de duas populações distintas de canais de sódio na membrana dessas células. Entretanto, apesar de não existir ainda uma caracterização molecular dos tipos de canais de sódio presentes nessas células, toda a literatura do assunto mostra um comportamento homogêneo destes canais, sugerindo que, mesmo que existam diferentes isoformas de canais expressos em células GH3, eles se comportam funcionalmente como pertencendo a uma única população.

Os efeitos da tityustoxina no decaimento das correntes de sódio seriam suficientes para se afirmar que essa toxina afeta o processo de inativação. Mas além disso os efeitos da toxina também foram observados no que se refere à dependência de voltagem do estado estacionário da inativação, que é diminuída pela tityustoxina. Na verdade, como a inativação não apresenta dependência intrínseca de voltagem, esse efeito se deve a uma

alteração do acoplamento da inativação com o processo de ativação, que é dependente de voltagem, na presença da toxina (Goldman e Schauf, 1972). Daí a necessidade de um pré-pulso mais despolarizante para se inativar a mesma proporção de canais que estaria inativada na ausência da toxina. A tityustoxina também aumentou a proporção de canais não inativante, o que deve indicar que a toxina ou retarda a passagem dos canais para o estado inativado, ou altera o equilíbrio entre os estados conformacionais fechados e inativados.

Não se esperava que a tityustoxina pudesse exercer algum efeito na ativação dos canais de sódio, dada a especificidade do seu efeito na inativação. Entretanto, embora a dependência de voltagem não tenha sido alterada, observou-se que na presença da toxina a ativação de uma pequena proporção de canais ocorria em potenciais mais negativos, o que não é característico de um efeito causado por toxinas do tipo  $\alpha$ . Esse efeito é típico de toxinas do tipo  $\beta$ , que deslocam a ativação para potenciais mais negativos através da imobilização do segmento S4 do domínio II na posição ativada (Cestèle et al., 1998). Dado que os experimentos foram realizados com uma mistura de peptídeos, o efeito observado poderia ser explicado pela presença de alguma toxina do tipo  $\beta$  na mistura. Os resultados obtidos com as análises de espectrometria de massa são compatíveis com esta interpretação.

Um dos objetivos deste trabalho foi o estudo de um efeito bastante específico no canal de sódio, o efeito  $\alpha$ , e não propriamente a toxina que o causa. Por este motivo, apesar da clara necessidade de purificação do material utilizado, foi possível a realização deste estudo.

### ***V.3 - A Interação***

O principal interesse no estudo da interação entre a tityustoxina e o canal de sódio neste trabalho é o esclarecimento de aspectos funcionais do canal. A dependência de voltagem da ligação da tityustoxina foi apenas o método escolhido para a realização deste objetivo. A dependência de voltagem da associação de toxinas do tipo  $\alpha$  com o canal de sódio tem sido demonstrada através de vários estudos (Catterall, 1992; Rogers et al., 1996; Chen et al., 2000), que mostram que a despolarização favorece a dissociação. Esse fenômeno poderia estar relacionado com a dependência de voltagem da ativação, dado que esse processo, ao contrário da inativação, apresenta dependência intrínseca de voltagem.

Entretanto, a interação entre a toxina e o canal em 0 mV, potencial no qual grande parte dos canais está ativada, é bastante estável, como pôde ser constatado através da aplicação de pulsos consecutivos para este potencial. Logo, a dependência de voltagem da ligação da toxina não pode ser explicada com base na dependência de voltagem da ativação. Por outro lado, a aplicação de pulsos mais despolarizantes foi capaz de deslocar totalmente a toxina de modo dependente de voltagem, dado que a dissociação aumenta com a magnitude do pulso. Além disso, pulsos despolarizantes mais longos foram mais eficazes em promover o deslocamento. Isso indica que tanto despolarizações repetidas como também persistentes são capazes de deslocar a toxina do seu sítio de ligação, sendo que estes fenômenos demonstraram dependência de temperatura. Esses resultados indicam que a despolarização favorece a dissociação da tityustoxina de alguma forma independente do processo de ativação.

Uma explicação poderia se basear no sentido da corrente de sódio. Em potenciais muito despolarizantes o sentido da corrente de sódio se inverte, e o então efluxo de  $\text{Na}^+$  poderia ser responsável pelo deslocamento da toxina observado nesses potenciais. Os experimentos com gradiente de  $\text{Na}^+$  invertido, nos quais registrava-se correntes de saída de sódio na presença da tityustoxina, mostraram que a hipótese do deslocamento pelo efluxo de  $\text{Na}^+$  não é verdadeira, pois em 0 mV, onde o efluxo é grande, a toxina permanece firmemente ligada ao canal. Esses resultados indicam que a despolarização deve ser então diretamente responsável pelo deslocamento da toxina.

A aplicação de pulsos muito despolarizantes foi capaz de deslocar a tityustoxina também em condições nas quais o gradiente de  $\text{Na}^+$  foi invertido. Entretanto o deslocamento foi significativamente mais rápido nessas condições experimentais se comparado aos resultados obtidos em gradiente de  $\text{Na}^+$  normal. Cruz et al. observaram em 2000, estudando o potencial de ação composto no nervo ciático de rã, que a tityustoxina depende da presença de  $\text{Na}^+$  extracelular para exercer plenamente seu efeito. Nos experimentos realizados com gradiente invertido, todo o  $\text{Na}^+$  extracelular foi substituído por cloreto de colina, e dessa forma a toxina poderia se ligar ao canal com menos afinidade, sendo deslocada mais facilmente. Experimentos preliminares nos quais parte do  $\text{Na}^+$  (20 mM) foi restituída à solução externa mostraram que nessas condições o deslocamento volta a ser mais lento (não mostrado). No entanto, essa mudança não foi estatisticamente

significativa se comparada aos experimentos nos quais não havia  $\text{Na}^+$  externo. Outras explicações possíveis para os resultados observados deveriam implicar em mudanças na estrutura do canal, principalmente no que diz respeito ao sítio de ligação para a tityustoxina, dependendo do sentido de condução da corrente.

A principal conclusão deste trabalho é que a despolarização leva à dissociação da tityustoxina do seu sítio de ligação, de um modo independente do processo de ativação. Chen et al. em 2001 obtiveram resultados semelhantes, quando testaram os efeitos da despolarização na dissociação de toxinas do escorpião *Leiurus quinquestriatus* de canais de sódio cardíacos. Eles basearam suas conclusões em um possível efeito de toxinas do tipo  $\alpha$  na inativação lenta dos canais de sódio. A inativação lenta também é um processo acoplado à ativação, ou seja, a ligação de toxinas do tipo  $\alpha$  na porção extracelular do segmento S4 do domínio IV deve afetar também este processo. Entretanto, os efeitos observados em relação à dependência de voltagem da dissociação das toxinas não podem ser totalmente explicados com base na modificação da inativação lenta. Isso porque a afinidade de ligação ao canal varia entre os tipos de toxinas tipo  $\alpha$  conhecidas e, para toxinas que se dissociam mais rapidamente, ou seja, não têm tempo de modificar a inativação lenta, também se observa uma dissociação dependente de voltagem.

Nós sugerimos um mecanismo para explicar este fenômeno, baseado apenas na mecânica da interação entre a toxina e o canal. A associação entre a toxina e o canal ocorreria em potenciais próximos ao repouso, quando este se encontrasse no estado fechado. Nessas condições o segmento S4 do domínio IV, cuja porção extracelular deve estar ligada à toxina, permanece totalmente inserido na membrana. Com despolarizações para 0 mV, onde ocorre a ativação do canal, o segmento S4 se move em direção à porção extracelular. Entretanto a presença da toxina impede que este movimento seja completo. Dessa forma o sítio para a ligação da alça da inativação não pode ser exposto imediatamente, explicando porque a inativação fica mais lenta na presença da toxina. Despolarizações mais fortes seriam capazes de impulsionar totalmente o segmento S4, fazendo com que este deslocasse a toxina do seu sítio de ligação, expondo o sítio para a ligação da alça da inativação, permitindo que esta ocorra normalmente. A veracidade deste modelo pode ser comprovada através da medida de correntes de *gating* que, como mencionado anteriormente, se devem ao movimento dos segmentos S4 na região do campo

elétrico da membrana. Ora, se a tityustoxina impedir o movimento do segmento S4 do domínio IV, a corrente de *gating* associada a este segmento deverá ser afetada pela presença da toxina.

## VI – Referências Bibliográficas

---

Almers W, Stanfield PR, Stuhmer W. 1983. Slow changes in currents through sodium channels in frog muscle membrane. *J Physiol* 339:253-71.

Arantes EC, Sampaio SV, Vieira CA, Giglio JR. 1992. What is tityustoxin? *Toxicon* 30(7):786-9.

Armstrong CM, Bezanilla F. 1973. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 242(5398):459-61.

Armstrong CM, Bezanilla F. 1977. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol* 70(5):567-90.

Armstrong CM. 1981. Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev* 61(3):644-83.

Armstrong CM, Cota G. 1991. Calcium ion as a cofactor in Na<sup>+</sup> channel gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(15):6528-31.

Barhanin J, Giglio JR, Leopold P, Schmid A, Sampaio SV, Lazdunski M. 1982. Tityus serrulatus venom contains two classes of toxins. Tityus gamma toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 257(21):12553-8.

Becerril B, Marangoni S, Possani LD. 1997. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus Tityus. *Toxicon* 35(6):821-35.

Beneski DA, Catterall WA. 1980. Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(1):639-43.

Benoit E, Legrand AM, Dubois JM. 1986. Effects of ciguatoxin on current and voltage clamped frog myelinated nerve fibre. *Toxicon* 24(4):357-64.

Benzinger GR, Kyle JW, Blumenthal KM, Hanck DA. 1998. A specific interaction between the cardiac sodium channel and site-3 toxin anthopleurin B. *J Biol Chem* 273(1):80-4.

Cantrell AR, Ma JY, Scheuer T, Catterall WA. 1996. Muscarinic modulation of sodium current by activation of protein kinase C in rat hippocampal neurons. *Neuron* 16(5):1019-26.

Catterall WA, Ray R, Morrow CS. 1976. Membrane potential dependent binding of scorpion toxin to action potential Na<sup>+</sup> ionophore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(8):2682-6.

Catterall WA. 1977. Membrane potential-dependent binding of scorpion toxin to the action potential Na<sup>+</sup> ionophore. Studies with a toxin derivative prepared by lactoperoxidase-catalyzed iodination. *J Biol Chem* 252(23):8660-8.

Catterall WA. 1992. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev* 72(4 Suppl):S15-48.

Catterall WA. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26(1):13-25.

Cestele S, Qu Y, Rogers JC, Rochat H, Scheuer T, Catterall WA. 1998. Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* 21(4):919-31.

Cestele S, Catterall WA. 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82(9-10):883-92.

Chen LQ, Santarelli V, Horn R, Kallen RG. 1996. A unique role for the S4 segment of domain 4 in the inactivation of sodium channels. *J Gen Physiol* 108(6):549-56.

Chen H, Gordon D, Heinemann SH. 2000. Modulation of cloned skeletal muscle sodium channels by the scorpion toxins Lqh II, Lqh III, and Lqh alphaIT. *Pflugers Arch* 439(4):423-32.

Chen H, Heinemann SH. 2001. Interaction of scorpion alpha-toxins with cardiac sodium channels: binding properties and enhancement of slow inactivation. *J Gen Physiol* 117(6):505-18.

Couraud F, Rochat H, Lissitzky S. 1978. Binding of scorpion and sea anemone neurotoxins to a common site related to the action potential Na<sup>+</sup> ionophore in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 83(4):1525-30.

Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM, Zeikus RD, Kerr L, Yoshikami D, Moczydlowski E. 1985. Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem* 260(16):9280-8.

Cruz JS, Matavel AC, Leao-Filho HM, Moraes-Santos T, Beirao PS. 2000. Tityustoxin effect on nerve compound action potentials requires extracellular sodium. *Neurosci Lett* 282(1-2):25-8.

Cummins TR, Sigworth FJ. 1996. Impaired slow inactivation in mutant sodium channels. *Biophys J* 71(1):227-36.

De Lima ME, Martin-Eauclaire MF. 1995. The toxins purified from *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello) venom. *J. Toxicol* 14(3):457-81

Eaholtz G, Scheuer T, Catterall WA. 1994. Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 12(5):1041-8.

Filatov GN, Nguyen TP, Kraner SD, Barchi RL. 1998. Inactivation and secondary structure in the D4/S4-5 region of the SkM1 sodium channel. *J Gen Physiol* 111(6):703-15.

Fuhrman FA. 1967. Tetrodotoxin. It is a powerful poison that is found in two almost totally unrelated kinds of animal: puffer fish and newts. It has been serving as a tool in nerve physiology and may provide a model for new local anesthetics. *Sci Am* 217(2):60-71.

Gellens ME, George AL, Jr., Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL, Kallen RG. 1992. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(2):554-8.

Gilles N, Leipold E, Chen H, Heinemann SH, Gordon D. 2001. Effect of depolarization on binding kinetics of scorpion alpha-toxin highlights conformational changes of rat brain sodium channels. *Biochemistry* 40(48):14576-84.

Goldman L, Schauf CL. 1972. Inactivation of the sodium current in *Myxicola* giant axons. Evidence for coupling to the activation process. *J Gen Physiol* 59(6):659-75.

Gomez MV, Diniz CR. 1966. Separation of toxic components from the brazillian scorpion *Tityus serrulatus* venom. *Mem Inst Butantan* 33(3):899-902.

Gomez MV, Dai ME, Diniz CR. 1973. Effect of scorpion venom, tityustoxin, on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain. *J Neurochem* 20(4):1051-61.

Gomez MV, Diniz CR, Barbosa TS. 1975. A comparison of the effects of scorpion venom tityustoxin and ouabain on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain. *J Neurochem* 24(2):331-6.

Hanck DA, Sheets MF. 1992. Extracellular divalent and trivalent cation effects on sodium current kinetics in single canine cardiac Purkinje cells. *J Physiol* 454:267-98.

- Hartmann HA, Tiedeman AA, Chen SF, Brown AM, Kirsch GE. 1994. Effects of III-IV linker mutations on human heart Na<sup>+</sup> channel inactivation gating. *Circ Res* 75(1):114-22.
- Hartshorne RP, Catterall WA. 1981. Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(7):4620-4.
- Heinemann SH, Terlau H, Stuhmer W, Imoto K, Numa S. 1992. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 356(6368):441-3.
- Huang JM, Wu CH, Baden DG. 1984. Depolarizing action of a red-tide dinoflagellate brevetoxin on axonal membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 229(2):615-21.
- Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H, Walsh K, Goldin AL, Catterall WA. 1992. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256(5058):839-42.
- Kellenberger S, West JW, Scheuer T, Catterall WA. 1997. Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol* 109(5):589-605.
- Keynes RD, Rojas E. 1973. Characteristics of the sodium gating current in the squid giant axon. *J Physiol* 233(1):28P-30P.
- Lerche H, Peter W, Fleischhauer R, Pika-Hartlaub U, Malina T, Mitrovic N, Lehmann-Horn F. 1997. Role in fast inactivation of the IV/S4-S5 loop of the human muscle Na<sup>+</sup> channel probed by cysteine mutagenesis. *J Physiol* 505 ( Pt 2):345-52.
- Li M, West JW, Lai Y, Scheuer T, Catterall WA. 1992. Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron* 8(6):1151-9.

Lombet A, Bidard JN, Lazdunski M. 1987. Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel. FEBS Lett 219(2):355-9.

Lotan I, Dascal N, Naor Z, Boton R. 1990. Modulation of vertebrate brain Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels by subtypes of protein kinase C. FEBS Lett 267(1):25-8.

Mantegazza M, Yu FH, Catterall WA, Scheuer T. 2001. Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. Proc Natl Acad Sci U S A 98(26):15348-53.

Martin-Eauclaire MF, Ceard B, Ribeiro AM, Diniz CR, Rochat H, Bougis PE. 1994. Biochemical, pharmacological and genomic characterisation of Ts IV, an alpha-toxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. FEBS Lett 342(2):181-4.

McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA. 1995. A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. J Biol Chem 270(20):12025-34.

McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA. 1998. A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation. J Biol Chem 273(2):1121-9.

Moorman JR, Kirsch GE, Brown AM, Joho RH. 1990. Changes in sodium channel gating produced by point mutations in a cytoplasmic linker. Science 250(4981):688-91.

Murphy BJ, Rossie S, De Jongh KS, Catterall WA. 1993. Identification of the sites of selective phosphorylation and dephosphorylation of the rat brain Na<sup>+</sup> channel alpha subunit by cAMP-dependent protein kinase and phosphoprotein phosphatases. J Biol Chem 268(36):27355-62.

Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N and others. 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312(5990):121-7.

Noda M, Suzuki H, Numa S, Stuhmer W. 1989. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* 259(1):213-6.

Numann R, Catterall WA, Scheuer T. 1991. Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science* 254(5028):115-8.

Patlak J. 1991. Molecular kinetics of voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels. *Physiol Rev* 71(4):1047-80.

Patton DE, West JW, Catterall WA, Goldin AL. 1992. Amino acid residues required for fast Na<sup>+</sup>-channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22):10905-9.

Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. 1999. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. *Eur J Biochem* 264(2):287-300.

Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA. 1994. Molecular determinants of state-dependent block of Na<sup>+</sup> channels by local anesthetics. *Science* 265(5179):1724-8.

Rogers JC, Qu Y, Tanada TN, Scheuer T, Catterall WA. 1996. Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na<sup>+</sup> channel alpha subunit. *J Biol Chem* 271(27):15950-62.

Rossie S, Catterall WA. 1987. Cyclic-AMP-dependent phosphorylation of voltage-sensitive sodium channels in primary cultures of rat brain neurons. *J Biol Chem* 262(26):12735-44.

Sato S, Nakamura H, Ohizumi Y, Kobayashi J, Hirata Y. 1983. The amino acid sequences of homologous hydroxyproline-containing myotoxins from the marine snail *Conus geographus* venom. FEBS Lett 155(2):277-80.

Sato C, Ueno Y, Asai K, Takahashi K, Sato M, Engel A, Fujiyoshi Y. 2001. The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. Nature 409(6823):1047-51.

Schantz EJ. 1986. Chemistry and biology of saxitoxin and related toxins. Ann N Y Acad Sci 479:15-23.

Sheets MF, Kyle JW, Kallen RG, Hanck DA. 1999. The Na channel voltage sensor associated with inactivation is localized to the external charged residues of domain IV, S4. Biophys J 77(2):747-57.

Sigel E, Baur R. 1988. Activation of protein kinase C differentially modulates neuronal Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and gamma-aminobutyrate type A channels. Proc Natl Acad Sci U S A 85(16):6192-6.

Smith RD, Goldin AL. 1996. Phosphorylation of brain sodium channels in the I-II linker modulates channel function in *Xenopus* oocytes. J Neurosci 16(6):1965-74.

Smith MR, Goldin AL. 1997. Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. Biophys J 73(4):1885-95.

Stuhmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. Nature 339(6226):597-603.

Tang L, Chehab N, Wieland SJ, Kallen RG. 1998. Glutamine substitution at alanine1649 in the S4-S5 cytoplasmic loop of domain 4 removes the voltage sensitivity of fast inactivation in the human heart sodium channel. J Gen Physiol 111(5):639-52.

Tejedor FJ, Catterall WA. 1988. Site of covalent attachment of alpha-scorpion toxin derivatives in domain I of the sodium channel alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(22):8742-6.

Terlau H, Heinemann SH, Stuhmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K, Numa S. 1991. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 293(1-2):93-6.

Trainer VL, Brown GB, Catterall WA. 1996. Site of covalent labeling by a photoreactive batrachotoxin derivative near transmembrane segment IS6 of the sodium channel alpha subunit. *J Biol Chem* 271(19):11261-7.

Vandenberg CA, Horn R. 1984. Inactivation viewed through single sodium channels. *J Gen Physiol* 84(4):535-64.

Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA. 1988. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241(4873):1658-61.

Vassilev P, Scheuer T, Catterall WA. 1989. Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(20):8147-51.

Warnick JE, Albuquerque EX, Diniz CR. 1976. Electrophysiological observations on the action of the purified scorpion venom, tityustoxin, on nerve and skeletal muscle of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 198(1):155-67.

West JW, Numann R, Murphy BJ, Scheuer T, Catterall WA. 1991. A phosphorylation site in the Na<sup>+</sup> channel required for modulation by protein kinase C. *Science* 254(5033):866-8.

West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, Catterall WA. 1992. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na<sup>+</sup>-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22):10910-4.

Yang N, Horn R. 1995. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* 15(1):213-8.

Yang N, George AL, Jr., Horn R. 1996. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 16(1):113-22.

Zhang Y, Hartmann HA, Satin J. 1999. Glycosylation influences voltage-dependent gating of cardiac and skeletal muscle sodium channels. *J Membr Biol* 171(3):195-207.