

Alessandra Cristine de Souza Matavel

**Tx2-6, uma toxina da aranha
Phoneutria nigriventer que modifica os
canais de Na⁺ sensíveis à voltagem**

Belo Horizonte
Minas Gerais
1999

Alessandra Cristine de Souza Matavel

**Tx2-6, uma toxina da aranha
Phoneutria nigriventer que modifica os
canais de Na⁺ sensíveis à voltagem**

Orientador: Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão

Co-orientador: Dr. Jader dos Santos Cruz

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.

Sumário

Abreviações	3
Resumo	4
Abstract.....	5
Introdução	6
O canal para Na ⁺	7
Toxinas que agem em canais para Na ⁺	12
Toxinas da aranha Phoneutria nigriventer	14
Objetivos.....	17
Objetivo geral	18
Objetivos específicos	18
Materiais e Métodos	19
Músculo semitendinoso	20
Loose patch voltage clamp	20
Toxina	22
Soluções.....	22
Análise Estatística	23
Equações.....	23
Resultados	26
Tx2-6 reduz o pico da corrente de Na ⁺	27
Tx2-6 desloca o potencial de ativação da corrente de Na ⁺	28
Tx2-6 afeta o estado estacionário da inativação da corrente de Na ⁺	30
Tx2-6 bloqueia a inativação rápida da corrente de Na ⁺	31
Tx2-6 desacelera a recuperação da inativação da corrente de Na ⁺	32
Tx2-6 não modifica a desativação da corrente de Na ⁺	33
Modificação do canal pela Tx2-6 é dependente de concentração.....	34
Discussão	36
Conclusão.....	42
Referências Bibliográficas.....	44

Abreviações

4-AP	4-aminopiridina
AaHII	Toxina II do escorpião <i>Androctonus australis</i>
CsEv3	Variante 3 da toxina do escorpião <i>Centruroides scapulatus</i>
DE ₅₀	Dose para 50% dos animais apresentarem o efeito observado
DL ₅₀	Dose letal a 50% dos animais
K _{0.5}	Concentração na qual a toxina que apresenta metade do efeito máximo
F _{max}	Proporção máxima de canais modificados pela toxina
R _p	Resistência da pipeta
R _s	Resistência do selo
hH1	Identificação do clone do canal de sódio cardíaco humano
rSkM1	Identificação do clone do canal de sódio do músculo esquelético de rato
TTX	Tetrodotoxina
STX	Saxitoxina
RTX	Robustoxina
VTX	Vesustoxina
TsTxV	<i>Tityus</i> toxin V
TxVII	<i>Tityus</i> toxin V
μ-CTX	μ-Conotoxina

Resumo

Muitos organismos produzem polipeptídeos com atividade tóxica sobre outros organismos. Os canais de sódio dependentes de voltagem são os principais alvos de muitas toxinas estudadas até o momento. Dois sítios de ligação específicos de toxinas polipeptídicas têm sido particularmente caracterizados sobre o canal de sódio. Toxinas que se ligam ao sítio 3 causam ativação persistente do canal de sódio por inibir sua inativação. Toxinas que se ligam ao sítio 4 deslocam a dependência de voltagem da ativação para potenciais mais negativos. A toxina Tx2-6, obtida da fração PhTx2 do veneno da aranha brasileira *Phoneutria nigriventer*, é um peptídeo básico que apresenta 48 resíduos de aminoácidos, rico em cisteínas. Este peptídeo é muito tóxico para camundongos e reproduz os principais sintomas do veneno total.

A proposta deste estudo é a caracterização do efeito da Tx2-6 sobre os canais de sódio de músculo esquelético de rã, utilizando a técnica modificada do *loose patch clamp* como método para o estudo das correntes de sódio macroscópicas.

Nossos resultados mostram que a Tx2-6 modifica a cinética dos canais de sódio de maneira dose-dependente. A Tx2-6 na concentração de 1 μM prolonga a constante de tempo da inativação e desloca a dependência de voltagem da ativação e da inativação para valores mais negativos (-7,4 e -10 mV, respectivamente). A toxina também diminui o potencial de reversão em 10 mV e reduz o pico da corrente de sódio em 48%. No entanto, a toxina não mostrou nenhum efeito sobre a recuperação da inativação ou sobre a desativação da corrente de sódio. Estas complexas alterações podem explicar o efeito tóxico da Tx2-6. Esta toxina apresentou pouca identidade na sequência primária com toxinas que atuam nos sítios 3 e 4 dos canais de sódio.

Abstract

Many organisms produce polypeptides with toxic activity against other organisms. The voltage-gated sodium channels are the main targets of many toxins studied so far. Two specific binding sites of polypeptide toxins have been particularly characterized on the sodium channels. Toxins which bind to the site 3 cause persistent activation of sodium channel by inhibiting the inactivation. Toxins which bind to the site 4 shift the voltage dependence of activation to more negative potentials. The toxin Tx2-6, obtained from PhTx2 fraction of the Brazilian *Phoneutria nigriventer* spider venom, is a basic peptide that features 48 amino acids, rich in cysteines. This peptide is very toxic to mice and reproduces the predominant symptoms produced by the whole venom.

The purpose of this study is to characterize the effect of Tx2-6 on the sodium channels of frog skeletal muscle, using the modified technique of loose patch clamp as a method for the study of the macroscopic sodium currents.

Our results show that the Tx2-6 modifies the kinetics of sodium channels in a dose-dependent manner. The Tx2-6 at 1 μm prolongs the inactivation time constant and shifts the voltage dependence of both activation and steady-state inactivation to more negative values (-7.4 and -10 mV, respectively). The toxin also decreases the potential for reversal in 10 mV and reduces the sodium current peak by 48%. However, the toxin showed no effect on recovery from inactivation or the deactivation of the sodium current. Together, these complex changes can explain the toxic effect of Tx2-6. This toxin shows little primary sequence identity with toxins that acts on site 3 and 4 of the sodium channels.

Introdução

Canais iônicos são estruturas presentes na membrana celular, sendo os principais responsáveis pela excitabilidade e condução de sinais nas células. Os canais iônicos são, geralmente, descritos em termos de sua seletividade iônica e propriedades de abertura e fechamento (*gating*), podendo ser divididos em canais sensíveis a ligantes e canais sensíveis à voltagem (Catterall, 1998).

Os canais iônicos sensíveis à voltagem foram assim classificados por responderem a variações no potencial elétrico da membrana citoplasmática. São os principais responsáveis pela geração e condução dos sinais nervosos. Dentre os canais sensíveis à voltagem destacam-se os canais para K^+ , Ca^{++} , e Na^+ (Spafford ET AL., 1998). Estruturalmente relacionados e altamente seletivos, estes canais são membros de uma única família de genes (Strong ET AL., 1993).

Os canais para Na^+ são os mais recentes membros da família dos canais sensíveis à voltagem (Hille, 1992). Evolutivamente, os canais para Na^+ apareceram primeiro em cnidários, nos quais podem ser encontrados potenciais de ação dependentes de Na^+ (Hille, 1992). Aparentemente derivaram dos canais para Ca^{++} , com os quais possuem alto grau de homologia em seus quatro domínios (Strong ET AL., 1993).

O surgimento evolutivo de canais iônicos específicos para Na^+ provavelmente foi resultado da seleção de correntes iônicas que poderiam mediar sinalização de alta frequência e propagação rápida, para coordenar as atividades de organismos multicelulares, usando um íon abundante e inócuo para a célula (Spafford ET AL., 1998).

O canal para Na^+

Quando a membrana é despolarizada, os canais para Na^+ sensíveis à voltagem passam por uma série de estados fechados não condutores, transitam por um estado aberto condutor, e finalmente entram em pelo menos um estado inativado não condutor (McPhee ET AL., 1998) (figura 1). Uma vez os canais tenham atingido o estado inativado, a membrana precisa ser repolarizada para remover a inativação, de forma que os canais fiquem novamente disponíveis para serem abertos. As transições entre os diferentes estados conformacionais são dependentes do potencial (voltagem) da membrana. Potenciais mais positivos favorecem o estado inativado, potenciais negativos tendem aos estados fechados. A transição do estado inativado para o aberto é possível, porém rara.

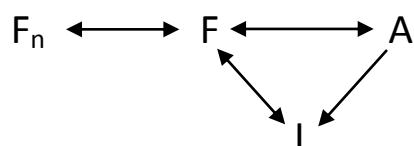


Figura 1: Representação esquemática simplificada dos estados do canal de Na^+ . F_n : outros estados conformacionais fechados; F: fechado; A: aberto; I: inativado.

O canal para Na^+ é uma glicoproteína transmembrana constituída de uma subunidade α , com aproximadamente 260 KDa de massa molecular (cujos segmentos N- e C- terminal estão

localizados na face citoplasmática) que podem ou não estar associada a subunidades modulatórias $\beta 1$ (36 KDa) ou $\beta 2$ (33 KDa).

A subunidade α sozinha é suficiente para formar o canal funcional. Estruturalmente possui 4 domínios homólogos (I-IV), com 6 segmentos transmembrana (S1-S6) em cada (figura 2a). Hille (1989) propôs que o ancestral dos canais iônicos possuiria um único domínio, semelhante aos canais de K^+ (que forma estruturas tetraméricas). Nos canais para Na^+ e para Ca^{++} foi observado que os domínios I e III apresentam maior semelhança, o mesmo ocorrendo com os domínios II e IV. Baseado nestas similaridades, o canais ancestral provavelmente duplicou para constituir um canal com dois domínios, que sofreu mais um ciclo de duplicação gênica, resultando na estrutura de 4 domínios que ocorre nestes canais. A diferenciação dos canais para Na^+ dos canais para Ca^{++} deve ter ocorrido após estes ciclos de duplicações iniciais.

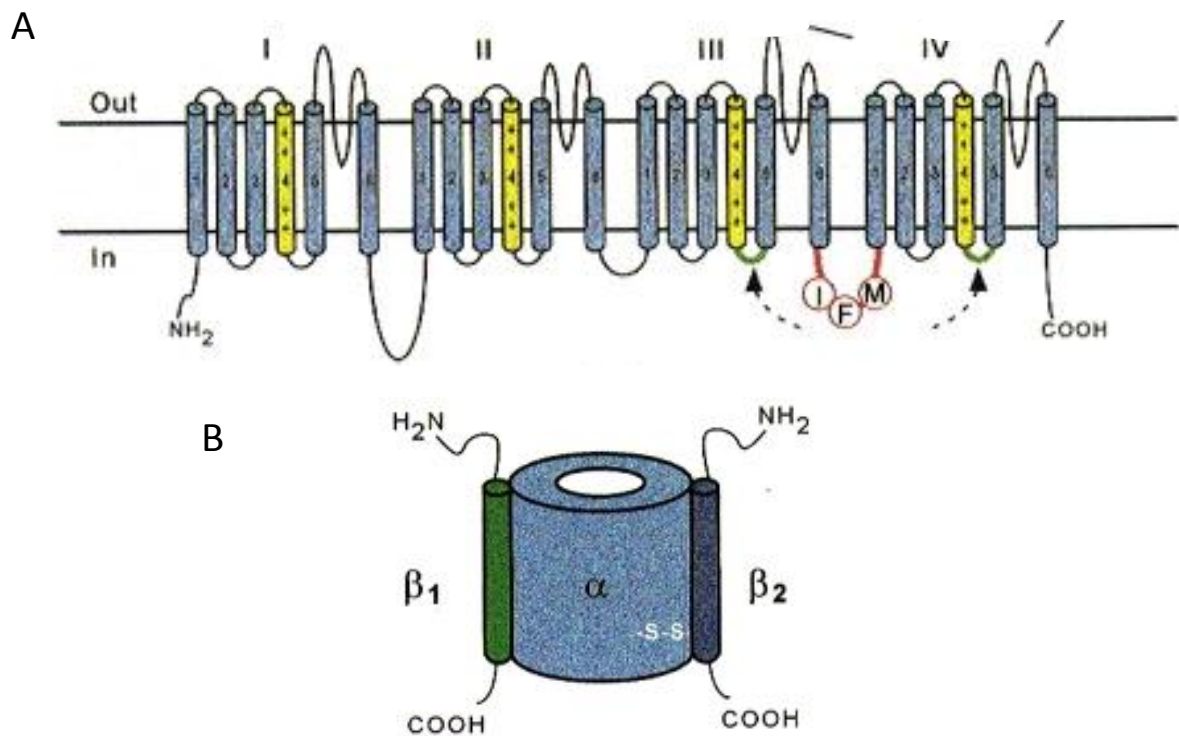


Figura 2: O canal para Na^+ . (A) Estrutura esquemática estendida do canal mostrando os 4 domínios (I-IV) com os 6 segmentos transmembrana (S1-S6) em cada domínio. Os segmentos S4 (sensor de voltagem) estão em amarelo. Em vermelho está sendo mostrado o motivo IFM, responsável pela inativação rápida do canal. (B) Composição do canal de Na^+ , mostrando a interação entre as subunidades α , $\beta 1$ e $\beta 2$. Observe que a interação entre a subunidade $\beta 2$ com a subunidade α acontece através de pontes dissulfeto, enquanto a subunidade $\beta 1$ interage não-covalentemente (figura extraída de Marban ET AL., 1998).

Esforços estão sendo acumulados para entender essa complexa estrutura e como cada segmento contribui para o funcionamento do canal. A clonagem de vários canais iônicos, o desenvolvimento de mutagenese sítio-dirigida e a descoberta de diversas neurotoxinas que se ligam a eles estão

permitindo um melhor entendimento da estrutura molecular dos canais iônicos e dos processos envolvidos no seu funcionamento.

A dependência de voltagem da ativação está intimamente relacionada ao segmento S4, que possui um aminoácido básico (arginina ou lisina) a cada três resíduos, que está sob o campo elétrico da membrana citoplasmática. Muitas evidências mostram que este segmento se desloca em direção ao lado extracelular da membrana quando a mesma é despolarizada, e este movimento está acoplado à abertura do canal (Stühmer ET AL., 1989; Yang & Horn, 1995; Yang ET AL., 1996; Stranrace ET AL., 1997).

A maneira como o movimento do segmento S4 está acoplado à abertura do canal ainda não foi totalmente elucidada. O segmento S4 do domínio I possui quatro cargas carregadas positivamente, enquanto nos domínios II e III possuem cinco, e o segmento S4 do domínio IV possui oito cargas (Keynes, 1994). Desta forma a contribuição de cada domínio para a abertura do canal é assimétrica, sendo que provavelmente o segmento S4 do domínio IV é o que apresenta maior sensibilidade à voltagem, seguido pelos domínios II e III, e finalmente pelo domínio I (Kontis & Goldin, 1997). Mitrovic e colaboradores (1998) mostraram a importância do segmento S4 do domínio II para a abertura do canal. Eles substituíram a arginina mais extracelular por uma cisteína, de modo que essa pudesse ser modificada quimicamente por um reagente cisteíno-específico quando exteriorizada. Por manter este domínio em um estado parcialmente ativado, foi observado um deslocamento para valores hiperpolarizados tanto da corrente máxima medida na relação corrente-voltagem, quanto da cinética de inativação da corrente para Na⁺. Isto significa que voltagens que normalmente não seriam suficientes para abrir os canais para Na⁺, passaram a culminar com sua abertura, mostrando a regulação do *gating* do canal pelo segmento S4 do domínio II.

Entre os segmentos S5 e S6 de cada domínio está um segmento chamado alça P, ou segmento SS1-SS2, ou ainda H5, que se invagina na membrana formando as paredes do poro. A sequência de aminoácidos deste segmento é muito conservada dentro de famílias com a mesma seletividade, mas não entra famílias com seletividades diferentes (Marban ET AL., 1998). Estudos de mapeamento da topologia do segmento P usando mutação sítio-dirigida revelaram assimetria na contribuição de cada domínio para a permeação iônica. Bénitah e colaboradores (1997) propuseram uma estrutura do poro do canal para Na⁺ mostrando as regiões do segmento P que são essenciais na determinação da seletividade: uma lisina (Lys1237) no domínio II é crítica discriminação entre os íons Na⁺ e Ca⁺⁺ (Heinemann ET AL., 1992); alguns resíduos do domínio IV (Trp1531, Asp1532 e Gly1533) Têm um importante papel na discriminação do Na⁺ sobre outros cátions monovalentes (Chiamvimonvat ET AL., 1996; Tsushima ET AL., 1997). O papel proeminente do Trp1531 sugere que este resíduo forme parte do filtro de seletividade. Estudos similares mostraram que a neutralização de resíduos de aspartato e glutamato localizados nos segmentos P dos domínios I e II, respectivamente, drasticamente reduziu o fluxo de Na⁺ (Terlau ET AL., 1991), o que indica que estes aminoácidos também participem do filtro de seletividade do canal para Na⁺.

Os canais para Na⁺ apresentam basicamente dois tipos de inativação: rápida e lenta. A inativação rápida acontece imediatamente após a abertura do canal, requerendo alguns milissegundos de

repolarização para voltar ao estado de repouso. Acreditava-se que o processo de inativação rápida possuía uma dependência de voltagem intrínseca, e fosse um processo independente da ativação do canal (Hodgkin & Huxley, 1952). Estudos mais recentes indicam que a dependência de voltagem da inativação seja devida ao um acoplamento com a ativação, possuindo pouca ou nenhuma dependência intrínseca de voltagem (Goldman & Schauf, 1972; O'Leary ET AL., 1995). De acordo com essa idéia, a despolarização causa uma ativação dependente de voltagem, devido ao movimento de cargas (segmento S4) dentro do campo elétrico da membrana, levando a mudanças conformacionais que permitem a abertura e a inativação rápida do canal. O tratamento da superfície intracelular do canal para Na⁺ com enzimas proteolíticas impede a inativação, evidenciando o papel de componentes citoplasmático no processo de inativação (Armstrong, 1981). A inativação rápida parece ocorrer através de um rearranjo conformacional, no qual aminoácidos presentes em uma alça citoplasmática interagem com resíduos presentes no lado interno da abertura do canal, movendo-se de forma semelhante a uma dobradiça, e obstruindo internamente o poro condutor. Evidências dessa teoria foram propostas por West e colaboradores (1992) que mostraram que mutações de um ou mais dos três aminoácidos hidrofóbicos presentes na alça entre os domínios III e IV (Ile1488, Phe1489 e Met1490; motivo IFM) reduzem significativamente a inativação rápida, destacando a contribuição da felilalanina. Este modelo foi suportado por resultados mostrando que a cisteína introduzida pela mutação F1489C fica inacessível a reagente cisteíno-específicos durante o estado inativado do canal e acessível no estado de repouso (Kollenberger ET AL., 1996). A substituição de duas tirosinas consecutivas (Tyr1494-Tyr1495) elimina a dependência de voltagem do estado estacionário da inativação e aumenta a velocidade de recuperação da inativação. Isto significa que estas duas tirosinas são necessárias para o acoplamento normal entre o sensor de voltagem da ativação e da inativação. McPhee e colaboradores (1998) propuseram que o motivo IFM interaja com os resíduos Phe1651, Leu1660 e Asn1662, na alça S4-S5 do domínio IV estabilizando o estado inativado. Como esta região está intimamente ligada ao segmento S4, é possível que ela esteja envolvida na mudança conformacional que acopla a ativação e a inativação. Experimentos utilizando correntes de *gating* mostraram que o processo de inativação rápida imobiliza os segmentos S4 dos domínios III e IV no estado ativado, sendo que o segmento S4 do domínio IV seja o último a voltar para o estado fechado, por apresentar maior imobilização (Cha ET AL., 1999).

O processo de inativação lenta tem sido descrito em várias preparações de nervo e músculo esquelético. Durante despolarizações prolongadas o canal para Na⁺ entra em um estado inativado do qual se recupera muito lentamente, geralmente necessitando de alguns minutos para se recuperar totalmente (Almers ET AL., 1983a). A inativação lenta é cinética e funcionalmente distinta e independente da inativação rápida. (Cummins & Sigworth, 1996). Os resíduos responsáveis pela inativação lenta são menos conhecidos do que aqueles envolvidos na inativação rápida. No entanto, algumas mutações responsáveis pela paralisia periódica hipercalêmica (T698M e M1585V) suprimem a inativação lenta e parece ser a causa primária da doença (Cummins & Sigworth, 1996; Hayward et AL., 1997).

As subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$ possuem apenas um segmento transmembrana, que separa um grande domínio extracelular N-terminal de um pequeno domínio intracelular C-terminal (McCormick ET

AL., 1998). São glicoproteínas e possuem sequência consenso do domínio V das imunoglobulinas (Isom & Catterall, 1996). Experimentos de deleção e mutação das regiões N- e C-terminal da subunidade $\beta 1$ mostraram que, ao contrario de que acontece nos canais para K^+ e Ca^{++} , na qual a modulação da subunidade α do canal pela subunidade β acontece do lado citoplasmático, nos canais para Na^+ a interação e modulação acontece no domínio extracelular (McCormick ET AL., 1998). Como está mostrado na figura 2B, a subunidade β pode estar associada a subunidade α não covalentemente ($\beta 1$) ou através de pontes dissulfeto ($\beta 2$). Makita e colaboradores (1996) observaram que a modulação do canal pela subunidade $\beta 1$ requer sua interação com aminoácidos entre os segmentos S5-S6 dos domínios I e IV, sugerindo que estes segmentos estejam adjacentes na estrutura terciária. No entanto, o sítio exato de interação ainda não foi elucidado.

Quando presentes, as subunidades β modulam as propriedades cinéticas e de dependência de voltagem normais dos canais. Elas aceleram a ativação, a inativação e a recuperação da inativação, além de deslocar para valores hiperpolarizados a dependência de voltagem do estado estacionário da inativação (Makita ET AL., 1994). O canal para Na^+ de cérebro de rato está associado as subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$, com a estequiometria de $1\alpha:1\beta 1:1\beta 2$. Nos canais para Na^+ de músculo esquelético e cardíaco foi demonstrado apenas a presença da subunidade auxiliar $\beta 1$ (Sutkowski & Catteral, 1990; Makita ET AL., 1994).

A proteína quinase dependente de cAMP (PKA) pode fosforilar a subunidade α do canal para Na^+ na alça entre os domínios I e II em cinco aminoácidos distintos (Rossie & Catteral, 1989). A fosforilação do canal para Na^+ de cérebro de rato causa redução da amplitude da corrente, por reduzir a probabilidade de abertura (Li ET AL., 1992). No entanto, a fosforilação dos canais para Na^+ de células cardíacas aumenta a condutância do canal (Murphy ET AL., 1996), sugerindo um diferente padrão de fosforilação responsável por este efeito funcional. Recentemente foi mostrado que a seletividade do canal para Na^+ cardíaco pode ser alterada, favorecendo a passagem de íons Ca^{++} . Essa alteração parece contribuir para o aumento da força de contração das fibras cardíacas pelas catecolaminas (Cruz ET AL., 1999). O canal para Na^+ muscular esquelético parece não ser alterado pelas PKA (Smith & Goldin, 1992).

Na alça citoplasmática entre os domínios III e IV há um sítio de fosforilação para PKC em todas as isoformas do canal para Na^+ de mamíferos (West ET AL., 1991). Além de reduzir a probabilidade de abertura, a fosforilação neste sítio diminui a taxa de inativação. Como esta alça está diretamente envolvida no processo de inativação (Numann ET AL., 1991), provavelmente a adição de cargas negativas provenientes do grupo fosfato nesta região interfira na interação da dobradiça com a alça S4-S5 do domínio IV (Aidley & Stanfield, 1996). A existência de duas maneiras distintas de fosforilação do canal para Na^+ , com diferentes efeitos funcionais, sugere que há complexas possibilidades para seu controle e adequação a diferentes condições funcionais da célula.

Os canais para Na^+ são glicosilados em todas as subunidades (α , $\beta 1$ e $\beta 2$), podendo ter até 40% de sua massa em carboidratos (Marban ET AL., 1998). A glicosilação por carboidratos carregados influencia a dependência de voltagem do canal através das cargas que se acumulam na superfície do canal. Bennet e colaboradores (1997) mostraram que a remoção do ácido siálico da superfície

do canal por neuraminidase desloca a dependência de potencial do estado estacionário da inativação para valores mais positivos.

Toxinas que agem em canais para Na⁺

A condução nervosa é feita por meio de sinais elétricos tudo ou nada, denominados potenciais de ação. Os potenciais de ação são mudanças no potencial (voltagem) de membrana causada pelo fluxo de íons através da bicamada lipídica. Em 1952, em um clássico trabalho sobre a natureza do impulso nervoso, Alan Hodgkin e Andrew Huxley identificaram os íons Na⁺ e K⁺ como os responsáveis pelo potencial de ação.

O potencial de ação é geralmente composto por dois componentes principais: a *despolarização*, representada por uma fase ascendente que alcança um pico máximo, na qual há inversão de polaridade, ou seja, a membrana que é negativa em seu interior se torna temporariamente positiva; e a *repolarização*, uma fase descendente, quando a membrana retorna o potencial de repouso. A fase inicial, despolarização, é consequência do rápido influxo (fluxo de entrada) dos íons Na⁺, causada pela abertura dos canais para Na⁺ sensíveis à voltagem. A repolarização acontece devido ao efluxo (fluxo de saída) dos íons K⁺, resultado da ativação dos canais para K⁺ sensíveis à voltagem. A inativação dos canais para Na⁺ contribui significativamente para a repolarização, terminando a ação despolarizante resultante do influxo de Na⁺. A coordenação entre ativação e inativação dos canais para Na⁺ garante que o potencial de ação possa ser disparado com alta frequência, isto porque ele possui pequena duração temporal, e também que os canais para Na⁺ recuperaram seu estado fechado logo após o potencial de ação (O'Leary ET AL., 1995). Por serem críticos na excitabilidade, os canais para Na⁺ servem como alvos específicos de muitas neurotoxinas. Estas toxinas ocupam diferentes sítios receptores presentes na superfície dos canais para Na⁺ e têm sido usadas como ferramentas para o mapeamento funcional e caracterização molecular do canal.

Devido a sua especificidade, as toxinas naturais foram inicialmente utilizadas para distinguir as espécies moleculares responsáveis pelas correntes de Na⁺, K⁺ e Ca⁺⁺. Posteriormente elas vêm sendo utilizadas para identificar os subtipos de canais dentro de cada família de canais íon-específicos (Chahine ET AL., 1998).

Toxinas que agem sobre os canais para K⁺ e Ca⁺⁺ agem geralmente inibindo as correntes que passam por estes canais. Porém, as toxinas que agem em canais para Na⁺ podem não apenas bloquear o canal, mas podem também modificar os canais de forma que suas propriedades cinéticas sejam alteradas. . A partir da década de 60, quando a tetrodotoxina (TTX), um potente bloqueador específico para os canais para Na⁺ foi descrito, houve um grande avanço no estudo dos canais iônicos em geral (Hille, 1992), e do canal para Na⁺ em particular. Atualmente diferentes toxinas extraídas e purificadas de algumas espécies de animais, plantas e microorganismos têm sido usadas como ferramentas importantes para identificação, isolamento e estudo de

propriedades cinéticas do canal para Na^+ . A maneira como o canal é modificado dependerá do sítio receptor na superfície do canal ao qual a toxina se liga.

Ao sítio 1 se liga toxinas guanídicas heterocíclicas solúveis em água, como a TTX (Nahashi ET AL., 1960) – inicialmente isolada de uma espécie de baiacu japonês (*Fugu rubripes*), e a saxitoxina – STX (Kao, 1966) – isolada do dinoflagelado marinho *Gonyaulax* spp. Estas toxinas bloqueiam o transmissão nervosa através do bloqueio do fluxo de Na^+ através do canal. (Narahashi ET AL., 1964, 1967; Nakamura ET AL., 1965; Kao & Nishiyama, 1965). Existem toxinas polipeptídicas, como a μ -conotoxinas (μ -CTX – isoladas do molusco marinho *Conus geographus*), que provavelmente também se liga ao sítio 1 dos canais para Na^+ (Yanagawa ET AL., 1987; Sato ET AL., 1991), uma vez que sua ligação é competitiva com a TTX e a STX (Catterall ET AL., 1992) e elas inibem a condução do Na^+ . Estudos recentes mostraram que, embora os sítios destas toxinas estejam sobrepostos, mutações que significativamente afetam a ligação da TTX apenas reduzem fracamente a afinidade da μ -CTX (Chahine ET AL., 1998), indicando que as ligações destas toxinas com o canal para Na^+ deve envolver interações distintas.

Compostos policíclicos solúveis em lipídeos, como a veratridina, aconitina batracotoxina e grayanotoxina, se ligam ao sítio 2 do canal para Na^+ , mantendo uma ativação persistente por bloquear a inativação, deslocar o potencial de ativação para valores mais negativos e reduzir a seletividade do canal (Ulbricht, 1998; Catterall, 1980).

Ao sítio 3 se ligam toxinas de escorpião do tipo α e toxinas de anêmonas do mar. São famílias distintas de polipeptídeos que possuem baixa homologia de sequência (Rogers ET AL., 1996), mas inibem a inativação do canal para Na^+ , estabilizando o canal no estado aberto. A ligação das toxinas do tipo α de escorpião é extremamente dependente de potencial (Thamkun ET AL., 1984). Por serem toxinas básicas, é provável que resíduos carregados negativamente na superfície do canal contribuam para a ligação destas toxinas. A comparação da estrutura das toxinas de escorpião e anêmonas mostrou que cinco resíduos de aminoácidos estão localizados em posições similares em ambas as toxinas (Loret ET AL., 1994). Destes cinco resíduos, quatro são básicos, consistindo dois distintos pólos carregados positivamente sobre a superfície destas toxinas. Estudos de correntes unitárias (El-Sherif ET AL., 1992; Cannon & Corey, 1993) e de *gating* (Sheets & Hanck, 1995) sugerem que a atividade primária da toxina é inibir a inativação do canal se ligando ao estado aberto, sem significativa alteração na ativação ou inativação a partir do estado fechado. Mutações em aminoácidos da alça S3-S4 do domínio IV (como as mutações do Glu1613, do Glu1616 e da Lys1617, entre outros, inclusive resíduos não carregados) do canal para Na^+ cerebral de mamífero (Rogers ET al., 1996) afetaram de maneira desigual a ligação ao sítio 3 de toxinas de escorpião e de anêmona, destacando o papel proeminente do Glu1613. Outras regiões do canal que haviam, inicialmente, sido implicadas na ligação das toxinas do tipo α , como a alça S5-S6 dos domínios I e IV (Tejedor & Catterall, 1988; Thomsen & Catterall, 1989) não foram encontrados resíduos ácidos cruciais para a ligação destas toxinas. No entanto, outros resíduos não ácidos destas regiões podem contribuir para a ligação das toxinas. Embora os sítios das toxinas do tipo α de escorpião e de anêmona se sobreponham, estas toxinas apresentam interações distintas com o canal para Na^+ .

Outro tipo de toxinas escorpiônicas, denominadas toxinas do tipo β , se ligam ao sítio 4 do canal para Na^+ , deslocando a dependência de voltagem da ativação para valores mais negativos (Vijverberg ET AL., 1984). Através de quimeras de canais para Na^+ de músculo esquelético e cardíaco de rato (que apresentam diferentes sensibilidades às toxinas do tipo β), o domínio II foi identificado como responsável pela ligação e efeito de uma toxina tipo β do escorpião *Tityus serrulatus* (Marcotte ET AL., 1997). Cestèle e colaboradores (1998) propuseram um modelo no qual uma potente toxina do tipo β do escorpião *Centruroides suffusus suffusus* (CsslV) se liga a resíduos de aminoácidos que são exteriorizados quando o segmento S4 do domínio II se move, no momento da despolarização, mantendo o canal em um estado parcialmente ativo. Neste estado a inativação é favorecida, reduzindo o número de canais disponíveis e conseqüentemente o pico da corrente de sódio. Isto explica porque a toxina requer pré-pulso despolarizante para sua ligação. Mostraram também que a mutação M845N, na alça próxima ao segmento S4 do domínio II, abole o deslocamento da dependência de voltagem da ativação, por impedir que a toxina se ligue à terminação extracelular da conformação ativada deste segmento, porque introduz desfavoráveis interações estéricas ou polar/apolar.

Poliésteres cíclicos, como as brevetoxinas e as ciguatoxinas, se ligam ao sítio 5 (Catterall & Gainer, 1985) resultando na inibição da inativação e no deslocamento da dependência de potencial da ativação para valores mais negativos. A ligação destas toxinas ao sítio 5 modula a ligação de toxinas que se ligam aos sítios 2 (Trainer ET AL., 1993) e 4 (Cestèle ET AL., 1995).

Mais recentemente foi identificado, em canais para Na^+ de insetos um novo alvo para neurotoxinas, o sítio receptor 6. Este liga as δ -conotoxinas e inibe a inativação da corrente de Na^+ (Gordon ET AL., 1996). Este sítio receptor ainda não foi bem caracterizado.

Toxinas da aranha Phoneutria nigriventer

No Brasil as aranhas que provocam acidentes graves em humanos estão reunidas em quatro gêneros principais: *Phoneutria*, *Loxocles*, *Latrodectus* e *Lycosa*.

A aranha *Phoneutria nigriventer*, popularmente conhecida como armadeira, possui hábitos noturnos, é solitária e agressiva, sendo a principal responsável pelos acidentes de araneísmo na região sudeste. A *P. nigriventer*, descrita originalmente por Keyserling em 1891, pertence à classe Arachnidae, subordem Labidognatha, família Ctenidae. Os sintomas dos acidentes com esta aranha são segundo Vellard (1936): dor excruciente que se irradia do local da picada, câimbras dolorosas, hiperestesia, tremores, convulsões, paralisias tônicas, hipersecreção salivar, nasal e brônquica, sudorese, perturbações visuais, hipotermia, taquicardia, arritmia, retenção urinária, constipação tenaz nos dias subsequentes.

Fontana e Brazil (1985) mostraram que, em preparação nervo-frênico-diafragma de rato, a peçonha da aranha *P. nigriventer* induz despolarização não uniforme da membrana da fibra muscular e aumento na frequência de potenciais miniaturas na placa motora. Este efeito foi

bloqueado por TTX ou por redução da concentração de sódio extracelular, sugerindo um efeito sobre os canais para Na⁺. Brazil e colaboradores (1988) observaram o efeito da mesma peçonha em aurícula isolada de cobaia, revelando que a principal causa dos sintomas cardíacos é a liberação de neurotransmissores pelas terminações nervosas intracardíacas, dados confirmados posteriormente em músculo liso vascular de coelho (Antunes et AL., 1993).

Em 1991, através de cromatografia de troca iônica e gel filtração. Resende Jr. e colaboradores isolaram os peptídeos neurotóxicos do veneno da aranha *P. nigriventer*, encontrando cinco frações ativas: PhTx1, PhTx2, PhTx3, PhTx4 e M. Os efeitos destas frações foram testados em camundongos por injeção intracerebral. A fração PhTx1 causou elevação da cauda, excitação e paralisia espástica das extremidades posteriores (DL₅₀ = 45±4 µg/Kg). O efeito da fração PhTx2 foi acentuadamente excitatório incluindo salivação, lacrimejamento, priapismo, convulsões e paralisia espásticas das extremidades anteriores e posteriores (DL₅₀ = 1,7±0,7 µg/Kg); estes sintomas reproduziram os efeitos predominantes da injeção do veneno total. Experimentos eletrofisiológicos mostraram que esta fração tem efeitos complexos sobre os canais para Na⁺, inibindo a cinética da inativação e deslocando a dependência de potencial tanto da ativação quanto da inativação para valores mais negativos (Araújo ET AL., 1993). A fração PhTx3 induziu efeitos neurotóxicos, caracterizado por paralisia flácida progressiva (DE₅₀ = 0,04 µg/Kg; DL₅₀ = 137±9 µg/Kg). Esta fração inibiu correntes da Ca⁺⁺ tipo L em experimentos eletrofisiológicos utilizando células GH3, da pituitária anterior de rato (Leão ET AL., 1996). A fração PhTx4 é pouco tóxica para camundongos quando injetadas intracerebral. No entanto, esta fração foi é muito tóxica para insetos, sendo a isoforma Tx4(6-1) o componente mais tóxico descrito nesta fração (Figueiredo ET AL., 1995). Nenhum efeito letal da fração M foi observado quando injetada intracerebral em camundongos, embora ela cause contração do músculo liso em íleo de cobaia (Resende Jr. ET AL., 1991).

Na fração PhTx1 foi possível identificar um único peptídeo, enquanto as frações PhTx2, PhTx3, PhTx4 foi possível identificar 9, 6 e 7 isoformas, respectivamente (Cordeiro ET AL., 1992, 1993; Figueiredo ET AL., 1995). Essas toxinas apresentam alta proporção de cisteínas, uma característica comum a muitas outras neurotoxinas (Cordeiro ET AL., 1995).

Tx2-1	ATCAGQDKPCKET- CDCCGERGECVC ALS YEGKYR CI CRQGNFLIAWHK LASCK
Tx2-5	ATCAGQDQ TCKVT-CDCCGERGECV CGGP----- CI CRQGNFLIAAY KLASCKCK
Tx2-6	ATCAGQDQ PCKET-CDCCGERGECV CGGP----- CI CRQGYFWIAWY KLANCK-K
TX2-9	S F CIP-F KPCK SDEN- CKKFK-CK TTG--IVK--- LCRW

Figura 3: Comparação da sequência de aminoácidos das toxinas da fração PhTx2. As sequências foram alinhadas baseando-se nos resíduos de cisteína, em vermelho (Cordeiro ET AL., 1992). Tx2-1, Tx2-5 e Tx2-6 apresentam alto grau de homologia: aproximadamente 71% entre a Tx2-1 e as outras duas e 85% entre a Tx2-5 e Tx2-6. Tx2-9 menos tóxica e menos conservada, apresenta aproximadamente 30% de homologia com as três primeira.

Dentre as nove isoformas presentes na fração PhTx2 (Tx2-1 a Tx2-9), quatro já foram totalmente seqüenciadas: Tx2-1, Tx2-5, Tx2-6 e Tx2-9, sendo toxinas básicas, com 53, 49, 48 e 32 resíduos de aminoácidos, respectivamente. As isoformas Tx2-1, Tx2-5 e Tx2-6 apresentaram alto grau de identidade entre si (figura 3), porém baixo grau quando comparado à Tx2-9. Dados preliminares sugeriram que a isoforma Tx2-6 reproduzia o efeito da fração PhTx2, e conseqüentemente do veneno total (Araújo ET AL., 1993).

Objetivos

Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo caracterizar e quantificar os efeitos da toxina Tx2-6 sobre a corrente de Na⁺.

Objetivos específicos

- Verificar o efeito da Tx2-6 na relação corrente-voltagem da corrente de Na⁺;
- Observar o efeito da toxina sobre a dependência da voltagem da ativação da condutância;
- Verificar o efeito da toxina na remoção da inativação da corrente de Na⁺;
- Medir o efeito da toxina sobre a constante de tempo da inativação;
- Verificar o efeito da Tx2-6 sobre a velocidade da desativação da corrente de Na⁺;
- Observar o efeito da Tx2-6 no estado estacionário da inativação;
- Estimar a proporção de canais modificados em diferentes concentrações da toxina.

Materiais e Métodos

Músculo semitendinoso

Rãs (*Rana catesbeiana*) pesando entre 60 a 80 gramas foram sacrificadas por descerebração e desmedulação. Imediatamente o músculo semitendinoso foi removido e conservado em solução de Ringer Normal (solução fisiológica para anfíbio, para composição ver "Soluções"). O músculo foi fixado através dos tendões em uma placa de petri revestida por *Sylgard*[®], para facilitar a manipulação. Um segmento delgado deste músculo foi dissecado utilizando um microscópio estereoscópico (Olympus) e fixado em uma câmara com sistema de refrigeração (10-12°C), para aquisição dos registros eletrofisiológicos. Uma ponte salina (ágar/KCl 3M) conectou o banho à referência terra (eletrodo de Ag/AgCl) possibilitando os registros.

Embora o canal para Na⁺ de sarcolema de rã ainda não tenha sido clonado, e conseqüentemente não haja trabalhos com a caracterização molecular deste canal, este tecido foi um dos primeiros a ser estudado e sua caracterização eletrofisiológica é bem estabelecida. (Campbell & Hille, 1976; Jaimovich ET AL., 1976; Campbell, 1983).

Loose patch voltage clamp

Para investigar se a toxina da aranha *P. nigriventer* modificava os canais para Na⁺ sensíveis à voltagem foi utilizado o método de *voltage clamp* denominado *loose patch clamp*, similar ao descrito por Stühmer e colaboradores (1983), com as modificações introduzidas por Araújo e colegas (1993). Esse método de registro consegue detectar correntes macroscópicas originadas de uma área de membrana variando entre 50 e 200 μm^2 , usando uma pipeta de *patch* de vidro (feita a partir de capilares para microhematócrito) com resistência da ponta (Rp) entre 0,2 e 0,6 M Ω . Este método é essencialmente idêntico ao *patch clamp* convencional na modalidade *cell attached* (Hamil ET AL., 1981), exceto que a área da membrana cuja voltagem é fixada (*voltage clamp*) é muito maior e não é necessária a formação de um contato de altíssima resistência (gigaselo, $>10^9\Omega$) entre a membrana e a ponta da pipeta, característica do *patch clamp* convencional.

Uma vez que o interior da pipeta apenas toca a membrana externa da célula, o interior da pipeta foi preenchido com Ringer Normal acrescido de 10 mM de 4-aminopiridina (4-AP) para bloquear as correntes para K⁺ (Guillespie & Hutter, 1975), e albumina (0,1%) para evitar adsorção inespecífica da toxina. A albumina sozinha não tinha efeito sobre as correntes para Na⁺. Exceto no controle Tx2-6 em diferentes concentrações era adicionada à solução da pipeta. Para evitar as correntes dos canais presentes na borda da pipeta e, portanto, fora do controle do potencial aplicado pela pipeta, as fibras musculares foram despolarizadas para $-43,4\pm 1,6$ mV usando solução de alto K⁺ (veja a composição em "Soluções") (Araújo ET AL., 1993). Este procedimento é suficiente para inativar todos os canais para Na⁺ não controlado pela pipeta de *patch* (Campbell & Hille, 1976; Almers ET AL., 1983b). O potencial na pipeta foi mantido em +50 mV (no interior da pipeta este potencial era visto com a carga invertida, ou seja, -50 mV), de forma que os canais

para Na^+ presentes na área da membrana controlada pela pipeta de *patch*, e apenas estes, tinham sua inativação removida pela hiperpolarização¹, garantindo que a corrente dos registros se originava somente dos canais sob controle do potencial.

Quando a pipeta estabeleceu um íntimo contato com a membrana da fibra muscular, a resistência da pipeta (R_p) aumentou, formando o chamado "selo", que resultou em uma resistência (R_s) de aproximadamente três vezes o valor de R_p . O fato de R_s atingir valores relativamente pequenos, segundo Stühmer e colaboradores (1983) introduz uma dificuldade: as correntes de fuga através desta resistência podem ser grandes o suficiente para causar significativa queda de voltagem através de R_p . Assim, o potencial elétrico na superfície da membrana será diferente do potencial aplicado pelo amplificador no interior da pipeta, de forma que R_p e R_s atuam como um divisor de voltagem, e o potencial aplicado na pipeta (V_p) aparecerá na superfície da membrana (V_t) de forma atenuada:

$$V_t = V_p \cdot A$$

Onde A é o fator de atenuação

$$A = R_s / (R_p + R_s)$$

O valor de A situava-se entre 0,6 e 0,8.

O amplificador para experimento de *loose patch clamp* (Dagan 8900) com um *probe* para *loose patch clamp* modelo 8970 e um resistor de *feedback* de $10 \text{ M}\Omega$, é capaz de corrigir esta atenuação analogicamente por um circuito em ponte que compensa o divisor de voltagem formado por R_p e R_s . Esse divisor foi balanceado com os resistores variáveis R_1 e R_2 no momento do experimento, de forma que o potencial V_t sempre acompanhou o potencial V_{cmd} conforme mostrado na figura 4.

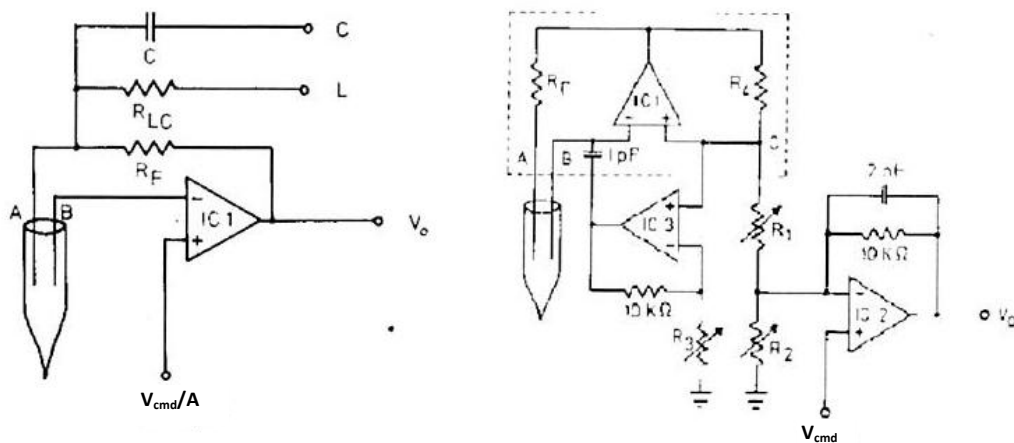


Figura 4: Circuito do *loose patch clamp* (reproduzido de Stühmer ET AL., 1983).

¹ As fibras foram despolarizadas com solução de alto K^+ para -42 mV , somado ao potencial de -50 mV aplicado no interior da pipeta gerava um potencial hiperpolarizante de -92 mV , suficiente para remover a inativação dos canais para Na^+ circunscritos pela pipeta.

As correntes iônicas foram filtradas eletronicamente (filtro passa-baixa com frequência de corte de 10 KHz), amostradas e digitalizadas a uma frequência de 30 KHz através de um conversor analógico-digital de 12 bits (Engenharia Eletro-Eletrônica, São Paulo), e armazenadas para posterior análise. A aquisição e análise dos dados foram realizadas através de um microcomputador IBM-PC 486 utilizando um programa em linguagem Pascal desenvolvido pelo Dr. Paulo S. L. Beirão. As correntes lineares de fuga (*leakage*) e capacitivas foram excluídas dos registros pelo uso do protocolo P/4 (Armstrong & Bezanilla, 1977), que subtraía da corrente total gerada pelo pulso teste o somatório de quatro correntes produzidas por pulsos de ¼ da amplitude do pulso teste, amplitude insuficiente para desencadear a abertura dos canais para Na⁺ e que portanto, continham apenas os componentes resistivos e capacitivos lineares.

Toxina

A toxina Tx2-6 foi purificada e gentilmente cedida pelo Dra. Marta Nascimento Cordeiro e pelo Dr. Carlos Ribeiro Diniz da Fundação Ezequiel Dias (Funed). A fração PhTx2 foi purificada por cromatografia de filtração em gel e cromatografia de fase reversa em sistema FPLC (Resende Jr. ET AL., 1991), a partir da fração solúvel do veneno total da aranha *P. nigriventer*. A isoforma Tx2-6 foi purificada a partir da fração PhTx2 por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC (Cordeiro ET AL., 1992).

Os experimentos foram realizados utilizando as seguintes concentrações de Tx2-6: 100 nM, 300 nM, 500 nM, 1 µM e 5 µM. Para a construção de todos os gráficos (exceto a curva dose-resposta) foi utilizada a concentração de 1 µM.

Soluções

Ringer Normal (solução fisiológica para anfíbio)

Reagente	Concentração (mM)
NaCl	115
KCl	2,5
CaCl ₂	1,8
Hepes	5
pH = 7,2	

Ringer alto K⁺ (solução despolarizante)

Reagente	Concentração (mM)
Acetato de sódio	88
Acetato de potássio	16
Propionato de cálcio	1,8
KCl	11
Hepes	5
pH = 7,2	

Todas as soluções foram feitas com água purificada pelo sistema Milli-Q® e todos os reagentes tinham grau analítico, obtidos de fornecedores nacionais ou internacionais.

Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando o test-t de *Student* e verificou as alterações observadas nos registros obtidos na presença de 1 µM de Tx2-6 em relação ao controle. A significância estatística adotada foi determinada por test-t não pareado, tomando 95% como índice de significância ($p < 0,05$). Símbolos com barras de erro e valores dos parâmetros significam média ± erro padrão da média. Os ajustes foram feitos por cálculo numérico utilizando o programa *SigmaPlot* (Jandel Scientific, San Rafael, USA). Foram utilizadas as equações a seguir para o ajuste dos dados.

Equações

Equação 1

Equação da condutância ao Na⁺

$$g_{Na} = I_{Na} / (V_m - V_r)$$

Na qual g_{Na} é a condutância ao sódio; I_{Na} é a amplitude da corrente; V_m é o potencial de membrana e V_r é o potencial de reversão da corrente de sódio.

Equação 2

Equação de Boltzmann para a ativação da corrente de Na⁺

$$g_{Na} / g_{Na(Max)} = \{1 + \exp [(Vg - Vm) / Kg]\}^{-1}$$

Na qual $g_{Na} / g_{Na(Max)}$ é a condutância ao sódio normalizada; Vg é a voltagem que ativa 50% da condutância máxima e Kg é o fator de inclinação da condutância.

Equação 3

Equação da dependência de voltagem da corrente de Na^+

$$I_{Na} = [g_{Na(Max)} \cdot (Vm - Vr)] / \{1 + \exp [(Vg - Vm) / Kg]\}$$

Na qual $g_{Na(Max)}$ é a condutância máxima.

Equação 4

Equação de Boltzmann para o estado estacionário da inativação da corrente de Na^+

$$h_{\infty} = \{1 + \exp [(V - Vh) / Kh]\}^{-1}$$

Na qual V é o potencial de pré-pulso; Vh é a voltagem que inativa 50% dos canais para Na^+ e Kh é o fator de inclinação da inativação.

Equação 5

Equação da cinética de inativação da corrente de Na^+

$$f = a \cdot \exp (-x/\tau_1) \quad 5.1$$

$$f = [a \cdot \exp (-x/\tau_1)] + [b \cdot \exp (-x/\tau_2)] \quad 5.2$$

Na qual a e b são fatores de amplitude dos componentes rápido e lento, respectivamente; τ_1 e τ_2 são as constantes de tempo de decaimento; e x é o tempo a partir do pico da corrente. As equações exponenciais foram utilizadas para ajustar o decaimento da corrente de Na^+ dos registros. As curvas podiam ser ajustadas com a equação monoexponencial (5.1) no controle, ou com a equação biexponencial (5.2) na presença da toxina.

Equação 6

Equação de recuperação da inativação da corrente de Na⁺

$$f = 1 - \exp(-T/\tau_r)$$

Na qual T é o tempo de hiperpolarização; e τ_r é a constante de tempo de recuperação da inativação.

Equação 7

Equação da dependência da concentração de toxina

$$f = (f_{\text{máx}} \cdot [\text{Tx2-6}]) / (K_{0.5} + [\text{Tx2-6}])$$

Na qual $f_{\text{máx}}$ é a proporção máxima de canais modificados e $K_{0.5}$ é a concentração da toxina que produz 50% do efeito máximo.

Resultados

Tx2-6 reduz o pico da corrente de Na⁺

Foram feitos experimentos nos quais o potencial da área da membrana sob estudo foi subitamente levada do repouso (-92 mV) a valores entre -76 e +68 mV, com incremento de 8 mV, usando pipetas preenchidas com Ringer Normal acrescidas com 10 mM 4-AP, contendo ou não 1 μ M de Tx2-6. Das correntes registradas estão sendo mostradas na figura 5A apenas aquelas obtidas nos potenciais entre -52 e +44 mV, com incremento de 16 mV, para melhor visualização. Os registros na presença de Tx2-6 (1 μ M) mostram uma evidente redução do pico e um decaimento mais lento da corrente de Na⁺ de sarcolema de rã quando comparado ao controle. Para verificar se a toxina alterava as velocidades de transição dos diferentes estados conformacionais do canal (aberto, fechado e inativado), foram utilizados diversos protocolos que permitiram estudar separadamente as possíveis transições conformacionais dos canais.

Na figura 5B está representado o gráfico da relação corrente-voltagem (I-V), que mostra como a amplitude da corrente de Na⁺ varia com o aumento da voltagem aplicada sobre a membrana, na faixa de potencial entre -76 e +68 mV, com incremento de 8 mV. O gráfico mostra o pico da densidade de correntes (na ordenada) obtido em cada potencial teste aplicado (abscissa).

De acordo com o gráfico, os canais para Na⁺ foram ativados em potencial mais hiperpolarizante na presença da toxina que no controle, atingindo seu valor máximo no potencial de -12 mV em ambas as condições, e revertendo no potencial de 68,3 mV no controle e 58,8 mV na presença de 1 μ M da Tx2-6. Adicionalmente, na presença da toxina o pico da corrente de Na⁺ reduziu em 55% da corrente na condição controle, e o potencial onde 50% dos canais estão ativados deslocou para valores mais negativos. As linhas contínuas foram obtidas ajustando a equação 3 aos pontos experimentais. Foram encontrados os seguintes valores para o melhor ajuste para controle e Tx2-6 respectivamente: $g_{Na(Max)} = 54,5 \pm 9,4$ mS/cm² e $26,5 \pm 2,9$ mS/cm²; $V_r = 68,3 \pm 1,7$ mV e $58,8 \pm 1,3$ mV; $V_g = -30,5 \pm 1,6$ mV e $-38,2 \pm 2,6$ mV; $K_g = 5,5 \pm 0,1$ e $7,3 \pm 0,3$. A análise dos parâmetros indica que a toxina modificou estatisticamente ($p < 0,05$) todos os parâmetros analisados para esta curva: a condutância ($g_{Na(Max)}$), ou seja, a capacidade do canal em conduzir corrente, foi reduzida em 51,3%, o que reflete na diminuição do pico da corrente; o potencial de reversão (V_r) foi deslocado em 9,5 mV para valores mais negativos (hiperpolarizados), indicando uma mudança na seletividade do canal; o potencial no qual a condutância é a metade do seu valor máximo (V_g) deslocou 7,6 mV também para valores hiperpolarizados; e o fator de inclinação da curva (K_g), que indica a dependência de voltagem da ativação do canal foi aumentada em 1,8, o que significa que a condutância dos canais modificados pela toxina varia de forma um pouco menos acentuada em relação ao potencial.

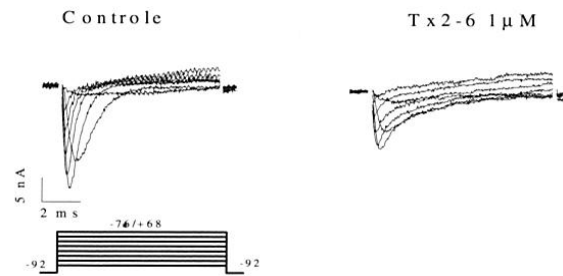
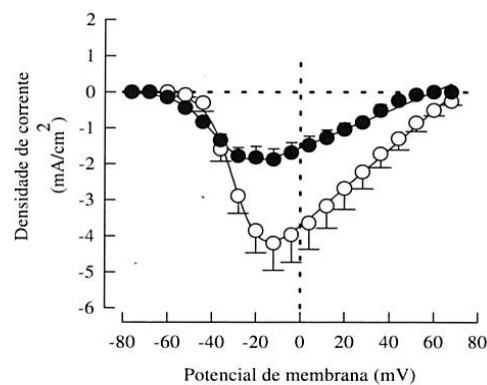
A**B**

Figura 5: Efeito da Tx2-6 sobre as correntes de Na^+ . Temperatura 12°C . A) Família de correntes de Na^+ registradas de uma série de pulsos testes despolarizantes entre -76 e $+68$ mV com incremento de 8 mV (ilustrado pelo protocolo mostrado abaixo da figura). Os registros (obtidos nos potenciais entre -52 e $+44$ mV com incremento de 16 mV, para facilitar a visualização) de controle e Tx2-6 ($1 \mu\text{M}$) mostram que na presença da toxina há uma evidente redução do pico da corrente de Na^+ , além de um decaimento mais lento da mesma. B) Relação corrente-voltagem da corrente de Na^+ . Os canais foram mantidos no potencial de 'holding' de -92 mV e alcançavam o pico em torno de -12 mV. O gráfico foi ajustado segundo a equação 3, obtendo os seguintes parâmetros para controle (círculos brancos, $n=12$) e Tx2-6 (círculos pretos, $n=7$), respectivamente: $g_{\text{Na}(\text{Max})} = 54,5 \pm 4$ mS/cm 2 e $26,5 \pm 2,9$ mS/cm 2 ; $V_r = 68,3 \pm 1,7$ mV e $58,8 \pm 1,3$ mV; $V_g = -30,5 \pm 1,6$ mV e $-38,2 \pm 2,6$ mV; $K_g = 5,5 \pm 0,1$ e $7,3 \pm 0,3$ (média \pm SEM).

Tx2-6 desloca o potencial de ativação da corrente de Na^+

Para melhor caracterizar o deslocamento da dependência de potencial observado na figura 5, foram calculadas as condutâncias ao Na^+ em cada potencial nos diferentes experimentos, utilizando a equação 1, e normalizado em relação a condutância máxima. As médias dos resultados são mostradas na figura 6. Os pontos foram ajustados pela equação 2, que é a equação de Boltzmann para a ativação da corrente de Na^+ , e as curvas com os melhores ajustes foram as

linhas contínuas. Observa-se que, dentro de uma estreita faixa (-50 mV a -10 mV) pequenas mudanças no potencial geram grandes alterações na condutância. Esta dependência foi significativamente diferente ($p < 0,05$) na presença de 1 μM de Tx2-6 ($K_g = 7,7 \pm 0,4$; $n=7$) em relação ao controle ($K_g = 5,8 \pm 0,2$; $n=12$), indicando que a dependência de potencial para ativação do canal na presença da toxina é menor do que no controle, como foi observado na relação I-V. A toxina também deslocou a curva para valores de potencial mais negativos ($V_g = -37,7 \pm 2,9$ mV) quando comparada com o controle ($V_g = -30,3 \pm 1,6$ mV). Isto significa que na presença da toxina, o canal está conduzindo em potenciais que normalmente estaria fechado. Observa-se, por exemplo, que as condutâncias medidas nos potenciais entre -52 mV a -28 mV são significativamente maiores nos experimentos contendo Tx2-6 que no controle. Com base nesses resultados podemos inferir que a transição do estado fechado para o estado aberto do canal para Na^+ está sendo favorecido pela toxina Tx2-6.

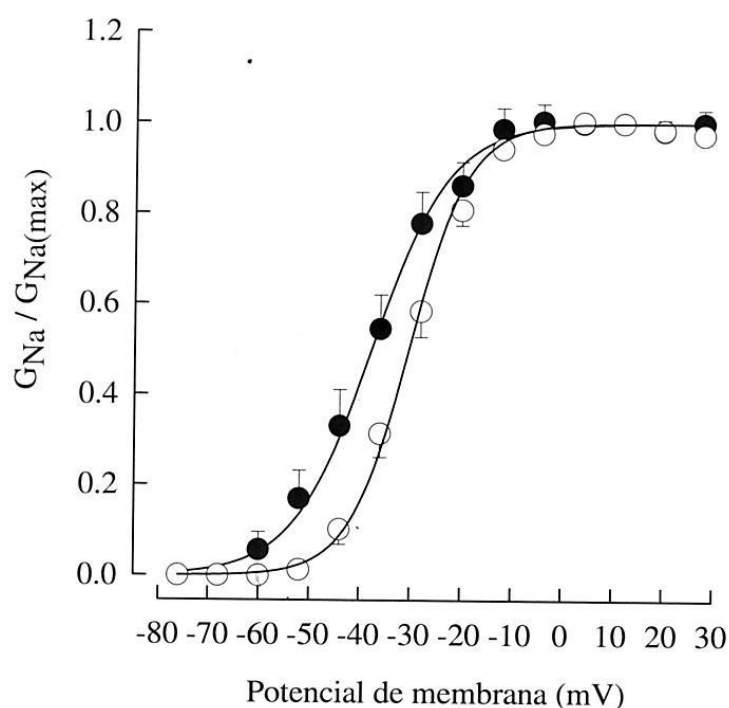


Figura 6: Efeito da Tx2-6 sobre a ativação da condutância da corrente de Na^+ . Foi calculada a condutância e cada potencial (equação 1) e normalizada em relação a condutância máxima. Temperatura 12°C. A curva foi ajustada segundo a equação 2, com os seguintes parâmetros para controle (círculos brancos, $n=12$) e Tx2-6 1 μM (círculos pretos, $n=7$), respectivamente: $V_g = -30,3 \pm 1,6$ mV e $-37,7 \pm 2,9$ mV; $K_g = 5,8 \pm 0,2$ e $7,7 \pm 0,4$ ($p < 0,05$). Nos potenciais de -76, -68, 4, 12 e 20 mV, os pontos experimentais e controle estão superpostos.

Tx2-6 afeta o estado estacionário da inativação da corrente de Na⁺

Como apresentado na introdução, a distribuição dos canais para Na⁺ nos diferentes estados conformacionais (mostrado simplificado na figura 1) depende do potencial da membrana. Potenciais despolarizantes favorecem o estado inativado, enquanto potenciais hiperpolarizantes favorecem os estados fechados (o estado aberto ocorrendo apenas transitoriamente).

Para investigar se a Tx2-6 altera esta distribuição utilizamos o protocolo h_{∞} , mostrado no inserto da figura 7. O pulso teste de -12 mV (por levar a corrente ao valor máximo) era utilizado para revelar a proporção de canais que se encontravam no estado fechado (ou seja, não inativados) e no estado inativado. Eram aplicados pré-pulsos entre -132 e -44 mV, com incremento de 8 mV, suficientemente longos (100 ms) para permitir a redistribuição completa dos canais entre os diferentes estados conformacionais em cada potencial. A corrente gerada com o pulso de -12 mV revelava a quantidade de canais não inativados, e a corrente obtida após cada pré-pulso hiperpolarizantes foi normalizada na figura 7. Como esperado, verificamos que o estado estacionário da inativação depende do potencial de pré-pulso aplicado. Cada curva contínua representa o melhor ajuste dos dados segundo a equação 4. A Tx2-6 (1 μ M) deslocou a curva da dependência de potencial da inativação para valores mais negativos ($-71,8 \pm 2,1$ mV no controle e $-81,8 \pm 2,0$ mV na presença da toxina) alterando também o parâmetro de inclinação da curva ($6,7 \pm 0,2$ no controle e $9,0 \pm 0,9$ na presença da Tx2-6), sendo ambas modificações estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Como mencionado anteriormente, a dependência de voltagem da inativação não é uma propriedade intrínseca deste estado, mas uma consequência do acoplamento com a ativação do canal para Na⁺. Nota-se que a toxina Tx2-6 favorece o estado inativado em uma ampla faixa de potenciais (veja, por exemplo, entre -92 mV e -68 mV).

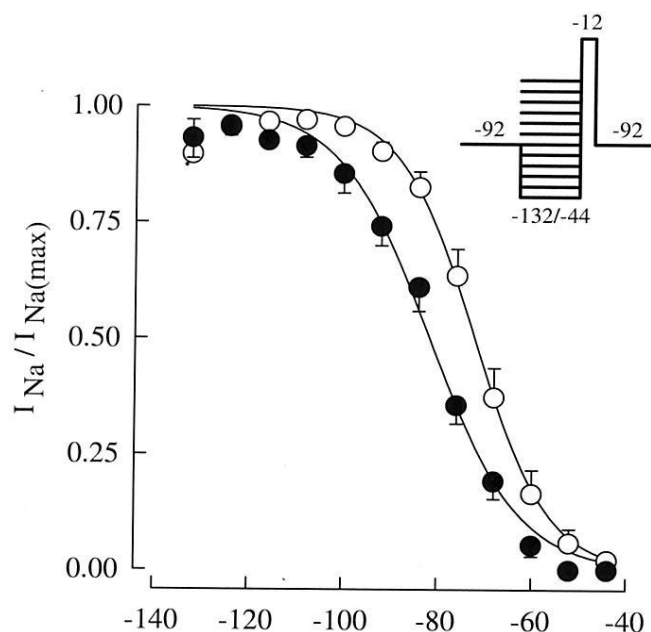


Figura 7: Efeito da Tx2-6 sobre o estado estacionário da inativação da corrente de Na^+ . O pico obtido no potencial de -12 mV precedido por diferentes potenciais pré-pulso (entre -132 e -44 mV, com incremento de 8 mV) com 100 ms de duração foi normalizado. Temperatura 12°C. A curva foi ajustada segundo a equação 4 com os seguintes parâmetros para controle (círculos brancos, n=12) e Tx2-6 1 μM (círculos pretos, n=7), respectivamente: $V_h = -71,8 \pm 2,1$ mV e $-81,8 \pm 2,0$ mV; $K_h = 6,7 \pm 0,2$ e $9,0 \pm 0,9$ ($p < 0,05$). O inserto mostra o protocolo experimental de voltagem. Os valores obtidos no potencial de -128 mV para experimentais e controle estão superpostos.

Tx2-6 bloqueia a inativação rápida da corrente de Na^+

Outra modificação importante que pode ser observada na figura 5A é que a cinética de inativação das correntes para Na^+ é nitidamente mais lenta. Para quantificar este efeito procedeu-se um ajuste do decaimento da corrente utilizando a equação exponencial 5. O decaimento da corrente a partir do pico foi descrito por uma única exponencial no controle, com constante de tempo rápida ($0,79 \pm 0,10$ ms no potencial de -12 mV). Na presença da toxina, este decaimento foi ajustado com dois componentes exponenciais, refletindo uma constante rápida e outra lenta (medida no potencial de -12 mV: $0,69 \pm 0,08$ e $9,7 \pm 4,24$ ms, respectivamente). Observa-se que a constante de tempo mais rápida (de menor valor) não é significativamente diferente daquela obtida na ausência da Tx2-6. Este dado sugere que uma parcela dos canais não são modificados, passando a parcela modificada a apresentar uma transição para o estado inativado com velocidade significativamente menor. Este padrão foi observado em toda a faixa de potencial entre -36 mV e +28 mV conforme mostrado na figura 8, no qual se vê que a constante de tempo rápida das correntes geradas na presença da toxina tem o mesmo comportamento das constantes de tempo no controle. Por outro lado, a constante de tempo lenta foi, em média, cerca de uma

ordem de grandeza maior que a constante de tempo rápida, sem que se tenha conseguido detectar uma dependência de voltagem significativa. Assim, embora a toxina desloque o equilíbrio entre os estados conformacionais na direção do estado inativado, a velocidade de transição do estado aberto para o inativado é reduzida.

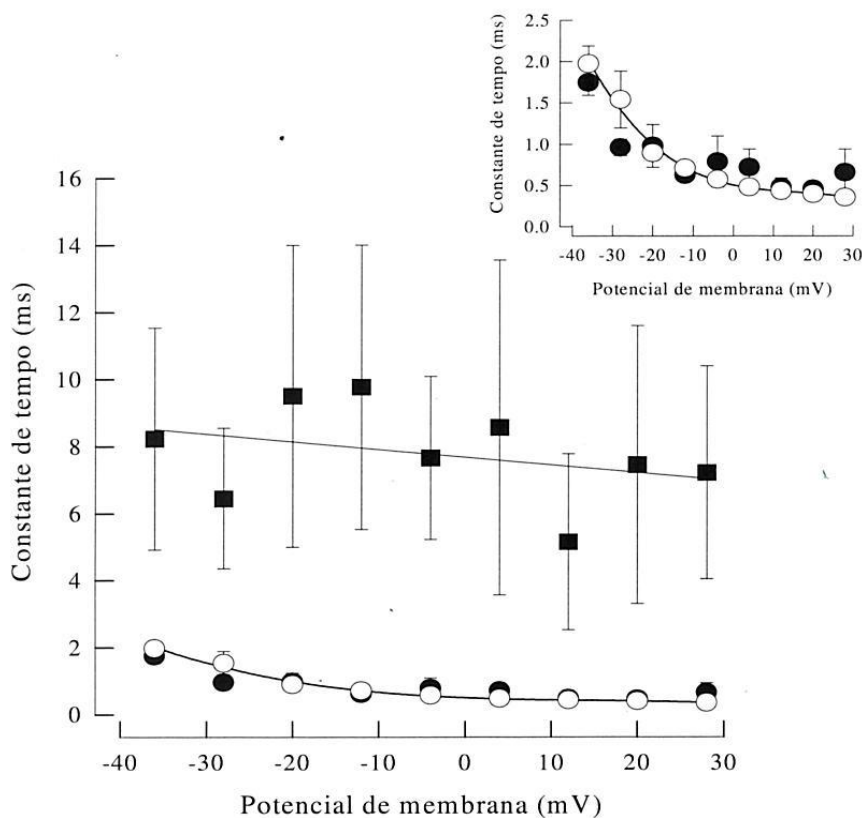


Figura 8: Efeito da Tx2-6 sobre o decaimento exponencial da corrente de Na^+ . Os registros foram analisados no potencial de pico (-12 mV). Temperatura 12°C . O decaimento da corrente foi ajustado a partir do pico com uma equação monoexponencial (círculos brancos, $n=12$) ou biexponencial na presença da toxina (símbolos pretos, círculos para a constante de tempo rápida e quadrados para a constante de tempo lenta, $n=7$), de acordo com a equação 5. Em alguns potenciais as constantes de tempo rápida no controle e na presença da toxina estão superpostos. Símbolos representam médias \pm EPM.

Tx2-6 desacelera a recuperação da inativação da corrente de Na^+

Para observar se a Tx2-6 altera a velocidade de transição do estado inativado para o estado fechado, foi utilizado o seguinte protocolo: era gerado um pré-pulso despolarizante para -44 mV por 100 ms (condição suficiente para levar todos os canais para o estado inativado – ver figura 7), seguido por um pulso hiperpolarizante para -124 mV por um período de tempo que

variou entre 0,5 e 7 ms (com incremento de 0,5 ms) e finalmente outro pulso despolarizante para -12 mV (potencial de pico) por 7 ms, no qual o registro foi obtido. Este protocolo permitiu avaliar o tempo de hiperpolarização necessário para que os canais transitassem do estado inativado para o estado fechado e fornece informação sobre a saída do estado inativado. A equação 6 foi utilizada para o ajuste da curva, e apresentou os seguintes valores da constante de tempo da recuperação da inativação: $1,6 \pm 0,14$ ms e $2,14 \pm 0,23$ ms para controle e experimental, respectivamente. Estes valores não foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

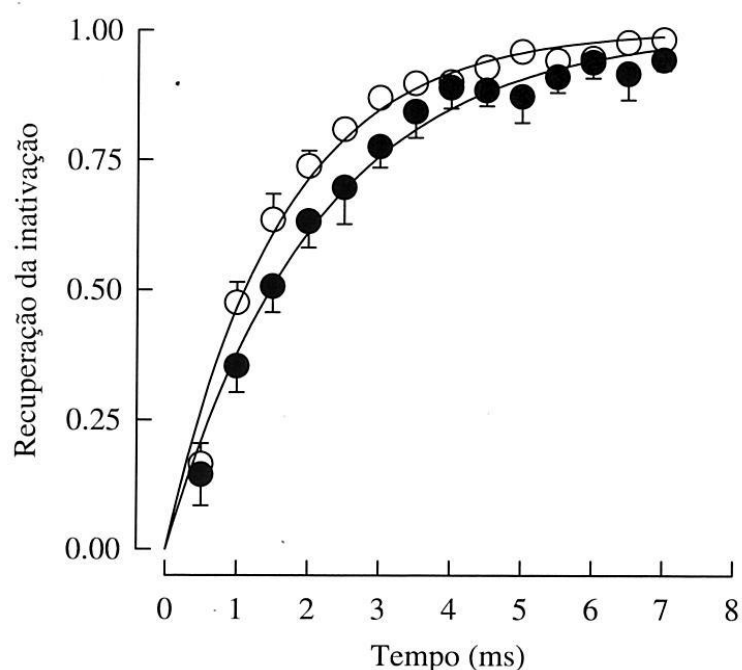


Figura 9: Recuperação da inativação. Foi gerado um pré-pulso despolarizante de -44 mV por 100 ms seguido por um pulso despolarizante que levava os canais para -124 mV por um período de tempo que variou de 0,5 a 7 ms (com incremento de 0,5 ms) e finalmente outro pulso despolarizante de -12 mV (potencial de pico) por 7 ms no qual o registro foi obtido. A equação 6 foi usada para o ajuste da curva com os seguintes valores de constante de tempo da inativação, correspondendo a controle e experimental respectivamente: $1,60 \pm 0,14$ e $2,14 \pm 0,23$.

Tx2-6 não modifica a desativação da corrente de Na⁺

Para avaliar se a Tx2-6 estava modificando a desativação da corrente de Na⁺, foi aplicado um pulso teste despolarizante (-12 mV) com duração que variava entre 0,5 e 7 ms (com incremento de 0,5 ms). Imediatamente após este pulso, o potencial da membrana foi subitamente hiperpolarizado para -92 mV. Desta forma, foi possível avaliar a quantidade de canais que estavam abertos ao final do pulso teste, bem como a velocidade que os mesmos transitaram

diretamente para o estado fechado. Esta transição (desativação) pode ser descrita por uma função exponencial. As constantes de tempo nos tempos de 0,5 ms e 1 ms estão sendo mostrados na tabela 1 e não foram estatisticamente diferentes. Nestes experimentos foi utilizada a concentração de 5 μM de Tx2-6 para modificar maior proporção de canais para Na^+ . Pulsos superiores a 1 ms não puderam ser medidos por ser muito pequenas as correntes de Na^+ remanescentes.

Tabela 1: Desativação das correntes de Na^+ .

	0,5 ms	1,0 ms
Controle (n=15)	0,095 \pm 0,013	0,123 \pm 0,017
Tx2-6 5 μM (n=6)	0,105 \pm 0,013	0,115 \pm 0,013

Dados expressos como média \pm EPM medidos no pico da corrente de Na^+ .

Modificação do canal pela Tx2-6 é dependente de concentração

Se a hipótese de que as constantes de tempo rápidas e lentas da cinética da inativação do canal para Na^+ refletem as proporções de canais modificados e não modificados está correta, é razoável esperar que estas proporções dependam da concentração de Tx2-6 utilizada. A figura 10 mostra que esta hipótese está correta, ou seja, a proporção de corrente modificada e não modificada é dependente da concentração da toxina. Esta proporção foi calculada a partir dos valores obtidos de **a** e **b** da equação 5, tomando como tempo inicial ($t=0$) o pico máximo de corrente. A proporção de canais modificados foi obtida pela relação $b / (a + b)$.

Usando diferentes concentrações de toxina na pipeta, a corrente registrada no potencial de -12 mV (pico da corrente) foi ajustada com uma (controle) ou duas (experimental) exponenciais, como pode ser visto na figura 8. A tabela 2 mostra que as constantes de tempo do componente rápido das correntes modificadas pela toxina não foram estatisticamente diferentes das constantes de tempo rápidas observadas no controle, reforçando a idéia de que elas foram geradas por canais não modificados. De forma similar, as constantes de tempo lentas obtidas dos registros na presença de diferentes concentrações de Tx2-6 não foram estatisticamente diferentes, sugerindo que elas eram causadas por canais para Na^+ que eram igualmente modificados pela toxina. A proporção de canais modificados em relação ao número total de canais variou com a concentração, com um $K_{0,5}$ (concentração que produz metade do efeito máximo) foi de 0,81 μM e f_{max} (proporção máxima de canais modificadas pela toxina) de 0,68, ou seja, 68%.

Tabela 2: Proporção de canais modificados em diferentes concentrações.

[Tx2-6]	τ_1 (ms)	n1	τ_2 (ms)	n2	Proporção de canais modificados
0	0,79±0,095	12			
100 nM	0,53±0,022	4	12±6,65	2	0,05±0,06
300 nM	0,49±0,015	5	17,8±9,84	5	0,06±0,02
500 nM	0,56±0,038	4	8,2±0,225	4	0,31±0,06
1 μ M	0,69±0,080	7	9,8±4,24	7	0,45±0,09
5 μ M	0,64±0,071	6	11,27±2,22	6	0,56±0,12

$\tau \pm$ EPM medidos no pico da corrente de Na^+ (-12 mV).

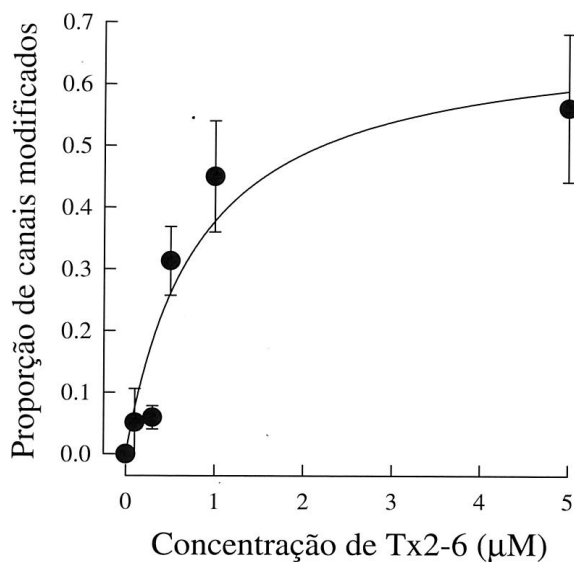


Figura 10: Proporção de canais para Na^+ modificados e não modificados é dependente da concentração de toxina. Usando diferentes concentrações de toxina na pipeta (100 nM, 300 nM, 500 nM, 1 μ M e 3 μ M) a corrente de Na^+ registrada no potencial de -12 mV (pico da corrente) foi ajustada com uma equação mono (controle) ou biexponencial (toxina), utilizando a equação 5. A proporção de canais modificados em relação ao número total de canais variou com a concentração da toxina. A concentração que produziu a metade do efeito máximo ($K_{0,5}$) foi 0,81 μ M e a proporção máxima de canais modificados pela toxina (f_{max}) foi 0,68.

Discussão

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a toxina da aranha *P. nigriventer* Tx2-6 apresenta o mesmo padrão complexo de atividade sobre os canais para Na⁺ apresentado pela fração PhTx2, descrito por Araújo e colaboradores (1993). Isso prova que a complexidade do efeito da PhTx2 sobre as correntes de Na⁺ não se deve à sua heterogeneidade. A Tx2-6 parece possuir um efeito híbrido das toxinas de escorpião do tipo α , por inibir a inativação do canal para Na⁺, e do tipo β , por deslocar o potencial de ativação para valores mais negativos e reduzir o pico da corrente. Além disso, a toxina também desloca a dependência do potencial do estado estacionário da inativação para valores também hiperpolarizados e altera a cinética das transições conformacionais, como assinalado na figura 11.

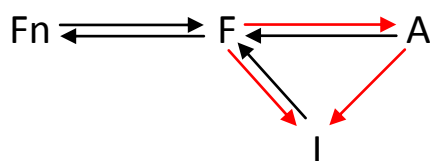


Figura 11: Representação esquemática simplificada dos estados do canal de Na⁺, mostrando as transições que são modificadas pela Tx2-6 (setas vermelhas). F_n: outros estados conformacionais fechados; F: fechado; A: aberto; I: inativado. Portanto a toxina facilita a transição do estado fechado para o aberto (ativação da corrente, figura 5) dificulta a transição do aberto para inativado (decaimento da corrente, figura 7) e facilita a transição do estado fechado para o inativado (estado estacionário da inativação, figura 6). A transição do estado inativado para o fechado não foi modificada (recuperação da inativação, figura 8), bem como a transição do estado aberto para o fechado. As transições entre as diferentes conformações dos estados fechados não puderam ser avaliadas pelos protocolos e experimentos utilizados.

A comparação da estrutura primária da Tx2-6 com a de toxinas de escorpião típicas α e β mostrou baixo grau de identidade com ambos os tipos (no máximo 18%), como mostrado na figura 12. As toxinas do tipo α que foram escolhidas para a comparação foram as toxinas TsTxV e AaHII, isoladas dos escorpiões *Tityus serrulatus* e *Androctonus australis*, respectivamente. As toxinas do tipo β escolhidas foram as toxinas dos escorpiões *Tityus serrulatus*, TxVII, e do *Centruroides sculpturatus*, CsEv3. O motivo da escolha das toxinas do escorpião *Tityus serrulatus* foi pelo fato desta espécie ser endêmica da região sudeste do Brasil e ter seu efeito bem caracterizado. As outras duas toxinas foram escolhidas por serem de escorpiões que não estão diretamente relacionados ao *Tityus serrulatus*, e têm suas estruturas terciárias resolvidas. Adicionalmente a estrutura primária da Tx2-6 foi comparada com duas outras toxinas de aranha que afetam os canais para Na⁺: VTX e RTX, isoladas das aranhas *Hedronyche versuta* e *Atrax robustus*, respectivamente. Estas toxinas possuem efeitos muito semelhantes aos da Tx26, reduzindo o pico e a inativação da corrente, além de deslocar os potenciais de ativação e inativação no estado estacionário para valores mais negativos (Nicholson ET AL., 1996; Pallaghy ET AL., 1997). Entretanto a Tx2-6 apresentou baixa identidade com a VTX (19%) e com a RTX (21%).

A análise da estrutura terciária das toxinas β , CsEv3 (Zhao et al., 1992), e α de escorpião, AaHII (Fontecilla-Camps ET AL., 1988) mostrou que embora estas toxinas se liguem a sítios distintos e possuam efeitos distintos, elas apresentam um motivo estrutural comum, conservado também em outras toxinas que agem em canais para Na^+ (Pintar ET AL., 1999). Este motivo é constituído por três fitas β anti-paralelas e uma α hélice que são estabilizadas por quatro pontes dissulfeto, como mostrado na figura 13. A análise estrutural destas toxinas, AaHII e CsE-v3, tem concentrado a atenção sobre uma região da toxina que é rica em aminoácidos hidrofóbicos aromáticos conservado (sobretudo Tyr e Phe) e aminoácidos carregados positivamente (Lys e Arg), essenciais à interação específica entre estas toxinas e o canal (Fontecilla-Camps ET AL., 1988; Zhao ET AL., 1992), além do arranjo espacial da toxina (Zilberberg ET AL., 1997). Rogers e colaboradores (1996) mostraram que os resíduos carregados Glu1613, Glu1616 e Lys1617, juntamente com seis outros aminoácidos não carregados presentes entre os segmentos S3 e S4 do domínio IV do canal para Na^+ cerebral (tipo IIA) de mamífero, são importantes para a ligação das toxinas do tipo α ao canal para Na^+ . Possivelmente aqueles resíduos básicos da toxina contribuem para a formação de um potencial eletrostático que pode estar envolvido na interação com cargas negativas presentes na superfície do canal. Possivelmente aqueles resíduos básicos da toxina contribuem para a formação de um potencial eletrostático que pode estar envolvido na interação com as cargas negativas presentes na superfície do canal.

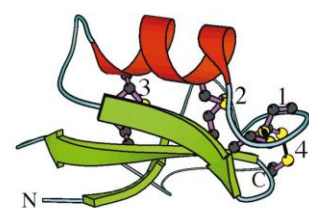
```

TsTxV  KKDGYPVEY-DNCAYICWNY-DNAYCDKLCCKDKKADSGYCYWVHIL---CYCYGLPDSEPTKTNGCKKSGKK
AaHII  VKDGYIVDD-VNCTYFCG---RNAYCNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKLPDHVRTKGPGRCH----
TxVII  -KEGYLMDH-EGCKLSCFIR-PSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPA-----CYCYGLPNWVKVWDRATNKCGKK
CsEv3  -KEGYLVKKS DGCKYGC LKLG ENEGCDTECKAKNQGGs---YGYCYAFACWCEGLPESTPTYPLPNKSC---
VTX    -----CAKK-RN---WCG---KTEDC--CCPMKCVYA----WYNEQG---SCQSTISALWKK-----C-----
RTX    -----CAKK-RN---WCG---KNEDC--CCPMKCIYA----WYNQOG---SCETTITGLFKK-----C-----
Tx2-6  ---ATCAGQ-DQ---PCK-----ETCD-CCGERGECV----CGGP----CICRQGYFWIAWYKLANCKK---

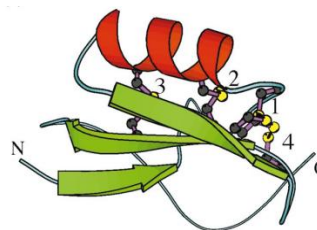
```

Figura 12: Comparação da sequência primária das toxinas do tipo α de escorpião (TsTxV - *Tityus serrulatus* - e AaHII - *Androctonus australis* toxina II), do tipo β (TsVII - *Tityus serrulatus* - e CsEv3 - *Centruroides sculpturatus* variante-3) e duas toxinas de aranha que afetam a inativação da corrente de Na^+ (VTX - *Hadronyche versuta* - e RTX - *Atrax robustus*) com a Tx2-6. As toxinas apresentam as seguintes porcentagens de identidade entre si: tipo α , 45%; tipo β , 28%; toxinas de aranha (exceto Tx2-6), 80%. Quando comparadas com a Tx2-6 as toxinas do tipo β , do tipo α e as outras toxinas de aranha não apresentam mais que 21% de identidade na sequência de aminoácidos.

As toxinas das aranhas, VTX e RTX, possuem três fitas β anti-paralelas e uma hélice 3_{10} , formando um conjunto estabilizado por 4 pontes dissulfeto (Fletcher ET AL., 1997; Pallaghy ET AL., 1997). Embora possuam estruturas secundárias semelhantes às toxinas do tipo α e β de escorpião, a estrutura tridimensional é diferente.



CsEV-3 - toxina tipo β
Centruroides sculpturatus



AaHIII – toxina tipo α
Androctonus australis

Figura 13: Estrutura tridimensional das toxinas escorpiônicas tipo β (esquerda) e α (direita). As toxinas possuem um motivo estrutural comum, constituído de três fitas β anti-paralelas e uma α -hélice, estabilizada por quatro pontes dissulfeto. (Figura reproduzida do trabalho de Oren ET AL., 1998).

A Tx2-6 é um polipeptídeo pequeno (5.291,3 Da) que possui 48 resíduos de aminoácidos sendo 10 cisteínas, que possivelmente formam cinco pontes dissulfeto, formando uma estrutura extremamente compacto. Devido à baixa homologia na sequência de aminoácidos com as toxinas do tipo α e β (figura 12) ou com qualquer proteína do banco de dados BLAST que tenha a estrutura tridimensional determinada, nenhuma inferência pode ser feita à estrutura terciária desta toxina. No entanto, sabe-se que sequências primárias não conservadas podem ainda dar origem a estruturas tridimensionais conservadas, e, portanto, é possível que a Tx2-6 tenha um motivo estrutural semelhante às toxinas escorpiônicas.

Como mostrado pelos resultados experimentais, a Tx2-6 induz um deslocamento da ativação de canais para Na^+ para potenciais mais negativos e mantém o canal mais tempo aberto, através do retardamento da sua inativação. Ambas as modificações podem explicar o efeito excitatório visto na injeção intracerebral da fração PhTx2, cujos sintomas já foram descritos em preparações de sinaptosomas (Romano-Silva ET AL., 1993). O efeito sobre a ativação do canal é similar, porém menos acentuado (7,4 mV) do que o das toxinas do tipo β de escorpião, que deslocam a dependência de potencial da ativação aproximadamente 40 mV para potenciais hiperpolarizados (Cahalan, 1975; Marcotte ET AL., 1997). Cha e colaboradores (1999) propuseram um modelo cinético onde o segmento S4 do domínio II está entre os últimos segmentos a serem ativados. Este modelo está de acordo com outro proposto anteriormente (Cestèle ET AL., 1998), no qual uma toxina do tipo β de escorpião (CsslV) se liga a resíduos de aminoácidos do segmento S4 do domínio II, que são exteriorizados quando esse segmento se move no momento da despolarização, mantendo o canal em um estado parcialmente ativo. Dessa forma, potenciais que normalmente não atuam sobre este domínio passaram a ser capazes de provocar a abertura do canal, explicando o mecanismo molecular do deslocamento do potencial de ativação para valores mais negativos. No estado parcialmente ativado, a inativação é favorecida, o que reduz o número de canais disponíveis e, conseqüentemente, o pico da corrente de Na^+ . Não se sabe, no entanto, que tipo de mudança conformacional no domínio II poderia facilitar a inativação, já que este domínio não está diretamente relacionado a este processo.

A redução da corrente parece estar envolvida com a interação, direta ou indireta, da toxina com outra parte do canal que ainda não foi identificado estar envolvido no processo, como sugere os dados de Marcotte e colegas (1997). Nesses experimentos uma quimera formada pelo domínio II de um canal para Na⁺ sensível (rSkM1) à toxina do tipo β e os demais domínios (I, III e IV) de um canal para Na⁺ insensível, deslocou a dependência de potencial da ativação para valores negativos, sem nenhuma redução do pico da corrente. Desta forma, a interação das toxinas do tipo β com o canal para Na⁺ é mais complexa, envolvendo outros domínios além do domínio II. Estas outras interações ainda não foram identificadas. Alguns trabalhos mostram que o efeito das toxinas do tipo β não requerem a presença da subunidade β1 (Marcotte ET AL., 1997; Tsushima ET AL., 1999). Em canais para Na⁺ mutantes (I1303Q, F1304Q e M1305Q) deficientes em inativação rápida, a toxina não apresenta nenhum efeito sobre a ativação, o que levou os autores sugerirem que a toxina se ligue ao estado inativado do canal (Tsushima ET AL., 1999).

A Tx2-6 possui também um efeito característico das toxinas do tipo α, cujo mecanismo geral é a inibição da inativação do canal para Na⁺. O mecanismo molecular do efeito destas toxinas ainda não foi elucidado. Pelo conhecimento atual, o mecanismo de inativação rápida envolve apenas segmentos do lado interno do canal. Como uma toxina que se liga apenas na região extracelular poderia afetar o processo de inativação rápida que ocorre no segmento intracelular do canal? A análise do sítio de ligação de diversas toxinas do sítio 3 mostra que mutações que diminuem fortemente a afinidade de algumas toxinas do tipo α, diminuem fracamente a ligação de outras (Gordon ET AL., 1996; Rogers ET AL., 1996; Benzinger ET AL., 1997), sugerindo que estas toxinas se ligam em uma região do canal que afeta a inativação mas com interações distintas, que podem se sobrepor, formando um 'macrosítio' (Gordon ET AL., 1996). Esse 'macrosítio' está localizado na laça entre os segmentos S3-S4 do domínio IV.

Em 1988, Catterall através de experimentos de fotomarcacão sugeriu que o sítio receptor 3 e 4 estariam localizados próximos um do outro e da região de contato entre as subunidades α e β1. Mais tarde, foi demonstrado que a modulação do canal para Na⁺ pela subunidade β1 necessitava da interação com os segmentos S5-S6 dos domínios I e IV (que devem estar adjacentes na estrutura tridimensional do canal) (Makita ET AL., 1996). Com a atual elucidacão molecular dos sítios receptores das neurotoxinas na superfície do canal, foi observado que o sítio 3 está localizado na alça entre os segmentos S3-S4 do domínio IV (Rogers ET AL., 1996) e provavelmente muito próximo do sítio de interação da subunidade β1, o que poderia explicar a inibição da inativação. Já a modulação da subunidade α pela β1 não explica o efeito das toxinas do tipo β, e como foi visto, não há participacão do sítio 4 na região de interação com a subunidade β1. O que poderia ser proposto para explicar os experimentos de fotomarcacão é que estas regiões estariam muito próximas, quando analisada a topologia do canal, e seria um artefato de técnica a marcacão da subunidade β.

Devida à similaridade dos efeitos da Tx2-6 com as toxinas de aranha descritas anteriormente, VTX e RTX, é possível que essas toxinas se liguem ao mesmo sítio receptor na superfície do canal de Na⁺. O trabalho de Nicholson e colaboradores (1996) evidencia a ligacão da VTX ao sítio 3. A comparacão da VTX com toxinas do tipo α mostra que embora elas não estejam estruturalmente relacionadas, alguns aminoácidos carregados estão em posicão muito semelhante (Fletcher ET

AL., 1997), sugerindo que alguns destes aminoácidos (Arg5, Lys3 e Asp13) interajam eletrostaticamente com aminoácidos já identificados na superfície do canal (Rogers ET AL., 1996) como importantes na interação com a toxina (Glu1613, Glu1616 e Lys1617). Assim é possível que, mesmo não apresentando muita semelhança na sequência primária com as toxinas que agem em canais para Na⁺, a Tx2-6 pode apresentar aminoácidos em posições críticas para a interação com o cana, provavelmente interagindo com o 'macro-sítio' 3.

Como a toxina não modifica todos os canais na concentração de 1 μM (como pode ser visto na figura 10), pode ser observada a coexistência de dois componentes: um modificado pela toxina e que possui as dependências de potencial de ativação e inativação deslocados, e outro não modificado. Assim, o aumento dos valores de Kg e Kh, que reflete uma menor sensibilidade à voltagem, como mostrado nas figuras 6 e 7, pode representar tanto uma diminuição real na sensibilidade do canal ao potencial de membrana como uma heterogeneidade dos canais modificados e não modificados.

O valor calculado do f_{max} (0,68) sugere que a toxina não é capaz de modificar todos os canais. Este valor poderia sugerir a existência de duas populações de canais na superfície da membrana sarcoplasmática de rã, sendo uma sensível e outra insensível à toxina. Por outro lado, outra hipótese poderia ser que, mesmo ligado à Tx2-6, haveria uma probabilidade do canal em transitar para o estado inativado com a mesma velocidade do canal não alterado. É importante ressaltar que, como a toxina reduz o pico da corrente de Na⁺, a proporção de canais modificados calculada a partir das correntes deve estar subestimada. Isso significa que possivelmente a proporção deve ser superior à estimada em cada concentração da toxina.

Conclusão

Nossos resultados mostram um complexo padrão de modificação causado pela toxina Tx2-6, proveniente da fração PhTx2 do veneno da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer*. Este complexo padrão também pode ser encontrado em outras toxinas polipeptídicas de aranhas que modificam os canais para Na⁺ (Nicholson et al., 1996; Pallaghy et al., 1997). As alterações causadas ao canal de Na⁺ explicam a ocorrência de sintomas excitatórios generalizado observado no envenenamento por estas aranhas. A coexistência de efeitos de toxinas do tipo α com efeitos de toxinas do tipo β e a similaridade com o efeito de outras toxinas de aranha, aliado ao baixo grau de identidade das sequências com estas toxinas, sugere que a interação da Tx2-6 com o canal de Na⁺ ocorra de forma distinta das toxinas do tipo α ou do tipo β , podendo envolver 'macrosítios', especialmente do sítio 3, ou ocorrer em outro sítio receptor ainda não identificado na superfície do canal.

As toxinas de aranha são importantes ferramentas para o estudo dos canais para Na⁺, podendo auxiliar na determinação de como lado extracelular e o intracelular se comunicam e interagem, produzindo as complexas transições cinéticas destes canais.

Referências Bibliográficas

- Aidley DJ, Stanfield PR (1996) Ion channel. P.307. Cambridge: Cambridge University Press.
- Almers W, Stanfield PR, Stühmer W. (1983) Lateral distribution of sodium and potassium channels in frog skeletal muscle: measurements with a patch-clamp technique. *J Physiol.* 336: 261-84.
- Almers W, Stanfield PR, Stühmer W. (1983) Slow changes in currents through sodium channels in frog muscle membrane. *J Physiol.* 339: 253-71.
- Antunes E, Marangoni RA, Borges NC, Hyslop S, Fontana MD, de-Nucci G. (1993) Effects of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Braz J Med Biol Res.* 26(1): 81-91.
- Araújo DAM, Cordeiro MN, Diniz CR, Beirão PSL (1993) Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 347: 205-208.
- Armstrong CM, Bezanilla F (1977) Inactivation of sodium channel II. Gating current experiments. *J Gen Physiol.* 70: 567-590.
- Armstrong CM. (1981) Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev.* 61(3): 644-683.
- Bénitah JP, Ranjan R, Yamagishi T, Janecki M, Tomaselli GF, Marban E. (1997) Molecular motions within the pore of voltage-dependent sodium channels. *Biophys J.* 73(2): 603-13.
- Bennett E, Urcan MS, Tinkle SS, Koszowski AG, Levinson SR. (1997) Contribution of sialic acid to the voltage dependence of sodium channel gating. A possible electrostatic mechanism. *J Gen Physiol.* 109(3): 327-43.
- Benzinger GR, Drum CL, Chen LQ, Kallen RG, Hanck DA, Hanck D. (1997) Differences in the binding sites of two site-3 sodium channel toxins. *Pflugers Arch.* 434(6): 742-9.
- Brasil OV, Leite GB, Fontana MD (1988) Modo de ação da peçonha da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891), nas aurículas isoladas de cobaia. *Ciência e Cultura* 40(2): 181-185.
- Cahalan MD. (1975) Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibres by *Centruroides sculpturatus* scorpion venom. *J Physiol.* 244(2): 511-534.
- Campbell DT, Hille B. (1976) Kinetic and pharmacological properties of the sodium channel of frog skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 67(3): 309-323.
- Cannon SC, Corey DP. (1993) Loss of Na⁺ channel inactivation by anemone toxin (ATX II) mimics the myotonic state in hyperkalaemic periodic paralysis. *J Physiol.* 466: 501-520.
- Catterall WA, Gainer M. (1985) Interaction of brevetoxin A with a new receptor site on the sodium channel. *Toxicon.* 23(3): 497-504.
- Catterall WA. (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 20: 15-43.
- Catterall WA. (1988) Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science.* 242(4875): 50-61.
- Catterall WA. (1992) Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev.* 72(4 Suppl): S15-48.

- Cestèle S, Ben Khalifa RB, Pelhate M, Rochat H, Gordon D. (1995) Alpha-scorpion toxins binding on rat brain and insect sodium channels reveal divergent allosteric modulations by brevetoxin and veratridine. *J Biol Chem.* 270(25): 15153-15161.
- Cestèle 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): 919-931.
- Cha A, Ruben PC, George AL Jr, Fujimoto E, Bezanilla F. (1999) Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na⁺ channel fast inactivation. *Neuron.* 22(1): 73-87.
- Chahine M, Sirois J, Marcotte P, Chen L, Kallen RG. (1998) Extrapore residues of the S5-S6 loop of domain 2 of the voltage-gated skeletal muscle sodium channel (rSkM1) contribute to the muconotoxin GIIIA binding site. *Biophys J.* 75(1): 236-246.
- Chiamvimonvat N, Pérez-García MT, Ranjan R, Marban E, Tomaselli GF. (1996) Depth asymmetries of the pore-lining segments of the Na⁺ channel revealed by cysteine mutagenesis. *Neuron.* 16(5): 1037-1047.
- Cordeiro MN, de Figueiredo SG, Valentim AC, Diniz CR, von Eickstedt VR, Gilroy J, Richardson M. (1993) Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon.* 31(1): 35-42.
- Cordeiro MN, Diniz CR, Valentim AC, von Eickstedt VR, Gilroy J, Richardson M. (1992) The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *FEBS Lett.* 310(2): 153-156.
- Cordeiro MN, Richardson M, Gilroy J, Figueiredo SG, Beirão PSL, Diniz CR (1995) Properties of the venom from South American 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891). *Toxin Reviews*, Vol. 14, No. 3 : Pages 309-326
- Cruz, J. S., Santana, L. F., Frederick, C. A., Isom, L. L., Malhotra, J. D., Mattei, L. N., Kass, R. S., Xia, J., An, R.-H., and Lederer, W. J. (1999). Whether "slip-mode conductance" occurs. *Science* 284: 711a6-711a13.
- Cummins TR, Sigworth FJ. (1996) Impaired slow inactivation in mutant sodium channels. *Biophys J.* 71(1): 227-236.
- El-Sherif N, Fozzard HA, Hanck DA. (1992) Dose-dependent modulation of the cardiac sodium channel by sea anemone toxin ATXII. *Circ Res.* 70(2): 285-301.
- Figueiredo SG, Garcia ME, Valentim AC, Cordeiro MN, Diniz CR, Richardson M. (1995) Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon.* 33(1): 83-93.
- Fletcher JI, Chapman BE, Mackay JP, Howden ME, King GF. (1997) The structure of versutoxin (delta-atracotoxin-Hv1) provides insights into the binding of site 3 neurotoxins to the voltage-gated sodium channel. *Structure.* 5(11): 1525-1535.
- Fontana MD, Vital-Brazil O. (1985) Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. *Braz J Med Biol Res.* 18(4): 557-65.
- Fontecilla-Camps JC, Habersetzer-Rochat C, Rochat H. (1988) Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85(20): 7443-7447.

- Gillespie JI, Hutter OF. (1975) The actions of 4-aminopyridine on the delayed potassium current in skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 252(2): 70P-71P.
- Goldman L, Schaaf CL. (1972) Inactivation of the sodium current in *Myxicola* giant axons. Evidence for coupling to the activation process. *J Gen Physiol.* 59(6): 659-675.
- Gordon D, Martin-Eauclaire MF, Cestèle S, Kopeyan C, Carlier E, Khalifa RB, Pelhate M, Rochat H. (1996) Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J Biol Chem.* 271(14): 8034-8045.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391(2): 85-100.
- Hayward LJ, Brown RH Jr, Cannon SC. (1997) Slow inactivation differs among mutant Na⁺ channels associated with myotonia and periodic paralysis. *Biophys J.* 72(3): 1204-1219.
- Heinemann SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S. (1992) Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature.* 356(6368): 441-443.
- Hille B (1989) Ionic channels: evolutionary origins and modern roles. *Q. J. Exp. Physiol.* 74: 785-804.
- Hille B (1992) Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed., p.607, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Hodgkin AL, Huxley AF. (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol.* 116: 449-472.
- Isom LL, Catterall WA. (1996) Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature.* 383(6598): 307-308.
- Jaimovich E, Venosa RA, Shrager P, Horowicz P. (1976) Density and distribution of tetrodotoxin receptors in normal and detubulated frog sartorius muscle. *J Gen Physiol.* 67(4): 399-416.
- Kao CY, Nishiyama A. (1965) Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems. *J Physiol.* 180(1): 50-66.
- Kao CY. (1966) Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol Rev.* 18(2): 997-1049.
- Kellenberger S, Scheuer T, Catterall WA. (1996) Movement of the Na⁺ channel inactivation gate during inactivation. *J Biol Chem.* 271(48): 30971-30979.
- Keynes RD. (1994) The kinetics of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys.* 27(4): 339-434.
- Kontis KJ, Goldin AL. (1997) Sodium channel inactivation is altered by substitution of voltage sensor positive charges. *J Gen Physiol.* 110(4): 403-13.
- Leão RM, Cruz JS, Diniz CR, Cordeiro MN, Beirão, PSL (1996) The effect of the toxins of fraction 3 of the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* on calcium channels of a rat anterior pituitary cell line. In: XXV Reunião Annual da SBBq, Caxambu, Brasil.
- 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.
- Loret EP, del Valle RM, Mansuelle P, Sampieri F, Rochat H. (1994) Positively charged amino acid residues located similarly in sea anemone and scorpion toxins. *J Biol Chem.* 269(24): 16785-16788.

- Makita N, Bennett PB Jr, George AL Jr. (1994) Voltage-gated Na⁺ channel beta 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene. *J Biol Chem.* 269(10): 7571-7578.
- Makita N, Bennett PB, George AL Jr. (1996) Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na⁺ channels. *J Neurosci.* 16(22): 7117-7127.
- Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF. (1998) Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol.* 508 (Pt 3): 647-657.
- Marcotte P, Chen LQ, Kallen RG, Chahine M. (1997) Effects of *Tityus serrulatus* scorpion toxin gamma on voltage-gated Na⁺ channels. *Circ Res.* 80(3): 363-369.
- McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D, Smith D, Scheuer T, Catterall WA. (1998) Molecular determinants of Na⁺ channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. *J Biol Chem.* 273(7): 3954-3962.
- 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): 1121-1129.
- Mitrovic N, George AL Jr, Horn R. (1998) Independent versus coupled inactivation in sodium channels. Role of the domain 2 S4 segment. *J Gen Physiol.* 111(3): 451-462.
- Murphy BJ, Rogers J, Perdichizzi AP, Colvin AA, Catterall WA. (1996) cAMP-dependent phosphorylation of two sites in the alpha subunit of the cardiac sodium channel. *J Biol Chem.* 271(46): 28837-28843.
- Nakamura Y, Nakajima S, Grundfest H (1965) The action of tetrodotoxin on electrogenic components of squid giant axons. *J. Gen Physiol.* 51: 985-996.
- Narahashi T, Deguchi T, Urakawa N, Ohkubo Y. (1960) Stabilization and rectification of muscle fiber membrane by tetrodotoxin. *Am J Physiol.* 198: 934-938.
- Narahashi T, Moore JW, Scott WR. (1964) Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J Gen Physiol.* 47: 965-974.
- Nicholson GM, Little MJ, Tyler M, Narahashi T. (1996) Selective alteration of sodium channel gating by Australian funnel-web spider toxins. *Toxicon.* 34(11-12): 1443-1153.
- Numann R, Catterall WA, Scheuer T. (1991) Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science.* 254(5028): 115-118.
- O'Leary ME, Chen LQ, Kallen RG, Horn R. (1995) A molecular link between activation and inactivation of sodium channels. *J Gen Physiol.* 106(4): 641-658.
- Oren DA, Froy O, Amit E, Kleinberger-Doron N, Gurevitz M, Shaanan B. (1998) An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional alpha helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. *Structure.* 6(9): 1095-1103.
- Pallaghy PK, Alewood D, Alewood PF, Norton RS. (1997) Solution structure of robustoxin, the lethal neurotoxin from the funnel-web spider *Atrax robustus*. *FEBS Lett.* 419(2-3):191-196.

- Pintar A, Possani LD, Delepierre M. (1999) Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a beta-scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *J Mol Biol.* 287(2): 359-367.
- Rezende Jr L, Cordeiro MN, Oliveira EB, Diniz CR. (1991) Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon.* 29(10): 1225-1233.
- 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⁺ channel alpha subunit. *J Biol Chem.* 271(27): 15950-15962.
- Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos R, Ribeiro AM, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Brammer MJ. (1993) Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem J.* 296 (Pt 2): 313-319.
- Rossie S, Catterall WA. (1989) Phosphorylation of the alpha subunit of rat brain sodium channels by cAMP-dependent protein kinase at a new site containing Ser686 and Ser687. *J Biol Chem.* 264(24): 14220-14224.
- Sato K, Ishida Y, Wakamatsu K, Kato R, Honda H, Ohizumi Y, Nakamura H, Ohya M, Lancelin JM, Kohda D. (1991) Active site of mu-conotoxin GIIIA, a peptide blocker of muscle sodium channels. *J Biol Chem.* 266(26): 16989-16991.
- Sheets MF, Hanck DA. (1995) Voltage-dependent open-state inactivation of cardiac sodium channels: gating current studies with Anthopleurin-A toxin. *J Gen Physiol.* 106(4): 617-640.
- Smith RD, Goldin AL. (1992) Protein kinase A phosphorylation enhances sodium channel currents in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol.* 263(3 Pt 1): C660-C666.
- Spafford JD, Spencer AN, Gallin WJ. (1998) A putative voltage-gated sodium channel alpha subunit (PpSCN1) from the hydrozoan jellyfish, *Polyorchis penicillatus*: structural comparisons and evolutionary considerations. *Biochem Biophys Res Commun.* 244(3):772-780.
- Starace DM, Stefani E, Bezanilla F. (1997) Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K⁺ channel. *Neuron.* 19(6): 1319-1327.
- Strong M, Chandy KG, Gutman GA. (1993) Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. *Mol Biol Evol.* 10(1): 221-242.
- Stühmer 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.
- Stühmer W, Roberts WM, Almers W (1983) The loose patch clamp. In: Single channel recording. P. 123-132, New York: Plenum Press.
- Sutkowski EM, Catterall WA. (1990) Beta 1 subunits of sodium channels. Studies with subunit-specific antibodies. *J Biol Chem.* 265(21): 12393-12399.
- Tamkun MM, Talvenheimo JA, Catterall WA. (1984) The sodium channel from rat brain. Reconstitution of neurotoxin-activated ion flux and scorpion toxin binding from purified components. *J Biol Chem.* 259(3): 1676-1688.
- 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 USA.* 85(22): 8742-8746.

- Terlau H, Heinemann SH, Stühmer 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): 93-96.
- Thomsen WJ, Catterall WA. (1989) Localization of the receptor site for alpha-scorpion toxins by antibody mapping: implications for sodium channel topology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86(24): 10161-5.
- Tsushima RG, Borges A, Backx PH. (1999) Inactivated state dependence of sodium channel modulation by beta-scorpion toxin. *Pflugers Arch.* 437(5): 661-668.
- Tsushima RG, Li RA, Backx PH. (1997) Altered ionic selectivity of the sodium channel revealed by cysteine mutations within the pore. *J Gen Physiol.* 109(4): 463-475.
- Ulbricht W. (1998) Effects of veratridine on sodium currents and fluxes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 133: 1-54.
- Vellard J (1936) Le venin des araignées. Masson et Cie, Paris, France.
- Vijverberg HP, Pauron D, Lazdunski M. (1984) The effect of *Tityus serrulatus* scorpion toxin gamma on Na⁺ channels in neuroblastoma cells. *Pflugers Arch.* 401(3): 297-303.
- West JW, Numann R, Murphy BJ, Scheuer T, Catterall WA. (1991) A phosphorylation site in the Na⁺ channel required for modulation by protein kinase C. *Science.* 254(5033): 866-868.
- West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, Catterall WA (1992) A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(22): 10910–10914.
- Yanagawa Y, Abe T, Satake M. (1987) Mu-conotoxins share a common binding site with tetrodotoxin/saxitoxin on eel electroplax Na⁺ channels. *J Neurosci.* 7(5): 1498-1502.
- Yang N, George AL Jr, Horn R. (1996) Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 16(1): 113-122.
- Yang N, Horn R. (1995) Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron.* 15(1): 213-218.
- Zhao B, Carson M, Ealick SE, Bugg CE. (1992) Structure of scorpion toxin variant-3 at 1.2 Å resolution. *J Mol Biol.* 227(1): 239-252.
- Zilberberg N, Froy O, Loret E, Cestele S, Arad D, Gordon D, Gurevitz M. (1997) Identification of structural elements of a scorpion alpha-neurotoxin important for receptor site recognition. *J Biol Chem.* 272(23): 14810-14816.