

Alessandra Cristine de Souza Matavel

*Estudo comparativo das toxinas PnTx2-5
e PnTx2-6 sobre canais de sódio*

Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil
2004

Alessandra Cristine de Souza Matavel

*Estudo comparativo das toxinas PnTx2-5
e PnTx2-6 sobre canais de sódio*

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão
Co-orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz

*Tese submetida ao Departamento de
Bioquímica e Imunologia, Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências.*

Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil
2004

- Agradecimentos -

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer àqueles que me formaram, e sem os quais este trabalho não teria acontecido. Muito obrigada, Jader e Beirão, vocês foram muito mais do que orientadores, vocês foram amigos, e me acolheram no momento da minha vida em que eu mais precisei. Eu sei que vocês sabem o quanto eu lhes sou grata por tudo, mas gostaria que todos soubessem disto. Cheguei ao fim (ou será o início?) e acho que estou pronta para cortar o cordão... momento difícil... espero que possamos continuar trabalhando juntos, como colaboradores.

Quero agradecer também a minha família, principalmente à minha mãe, que sempre me apoiou e entendeu minhas muitas ausências em casa. Ao meu pai que, embora distante, sempre se orgulhou do meu trabalho. Quero agradecer à minha avó, meus irmãos: Ricardo (que foi me buscar na UFMG inúmeras vezes, já tarde da noite), Nathália e Rafael, que muitas vezes não entendiam porque eu ia para o laboratório nos finais de semana sem ganhar hora extra, e a minha cunhada Solange. Acho que hoje eles entendem que o que nos impulsiona a continuar fazendo pesquisa no Brasil, com toda falta de verba e dificuldade, é a paixão pela ciência.

Ivan, você chegou um pouco depois deles, mas foi uma peça chave para a conclusão desta tese. Você me deu força para continuar e não deixou que eu desistisse nos momentos mais difíceis. Você abdicou de muitas coisas por mim, para me acompanhar na França. Quero que saiba que você é muito importante para mim.

Durante minha estadia de 10 anos no Laboratório de Membranas Excitáveis fiz muitos amigos, alguns já se foram, outros irão dentro de alguns anos. Quero agradecer-los e, mesmo que a distância possa nos separar, vocês sabem que podem sempre contar comigo. Obrigada: Simone, Fabiana, Adriana, Mauricio, Luemara, Flavinha, Roberta, Ana Rosa, Magda, Janaina, Ana Marin, Claudia Penaforte, Lucimar, Janete, Leida, Dona Lourdes, Ricardo, Adriano, Stefania, Raquel, Silvia, Thaís, Paula, Ligia, Chris, Vincent, Daniela, Eliane, Juliana, Bethinha, Wanderson, Ana Flavia, Yara, Fernando, Cristina, Eduardo, Valter, Gleudneia (espero não ter esquecido de ninguém).

Aos nossos colaboradores mais importantes: Mike Richardson e Marta Cordeiro, que purificaram com muita eficiência todas as toxinas utilizadas neste trabalho.

Não posso deixar de fazer um agradecimento especial à professora Maria Elena por disponibilizar o laboratório de Toxinas e Venenos Animais para eu fazer parte desta tese, e à Leida por me auxiliar nos experimentos de *binding*.

À professora Vânia Prado, por sempre me permitir utilizar sua infraestrutura, e me orientou nos experimentos de biologia molecular.

Ao Dr. Michel De Waard, que me recebeu em seu laboratório em Marseilha e com quem aprendi muito. Aos colegas de laboratório: Guillaume, Sandrine e Veronique.

Agradeço o Dr. Carlos Ramos do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Campinas), que me recebeu para os experimentos de estrutura, e à sua técnica que me auxiliou em tais experimentos.

Ao pessoal do Laboratório de Enzimologia, principalmente aos professores Marcelo Santoro, Marcelo Bemquerer e ao Jamil.

Ao professor Evanguedes que me orientou pelos caminhos da biologia molecular na iniciação científica, ainda na FUNED.

Ao professor Robson Santos e a todos do Laboratório de Hipertensão que me permitiram utilizar a sala de cultura.

À minha banca de acompanhamento, professora Gloria Franco e professor Marcelo Bemquerer, que me deram ótimas sugestões e direção quando precisei.

Ao professor e tutor de fisiologia humana Raul Bastos Neto, quem me ajudou muito durante o curso de graduação.

- Resumo -

A aranha *Phoneutria nigriventer* é uma das principais responsáveis por acidentes de araneísmo na região sudeste do Brasil. Os sintomas predominantes causados por sua peçonha resultam em hiperexcitabilidade geral. Duas toxinas presentes no veneno, a PnTx2-5 e a PnTx2-6 possuem 48 resíduos de aminoácidos cada, com peso molecular de 5112,3 e 5289,3 Da, respectivamente. A toxina PnTx2-6 foi considerada o componente mais tóxico do veneno da aranha, por apresentar efeitos similares aos do veneno total, modificando os canais de sódio. Por se diferirem em apenas cinco resíduos de aminoácidos, comparamos os efeitos das toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6 em canais de sódio de células GH3, além de comparar os efeitos da PnTx2-6 em canais de sódio de diferentes tipos celulares (neuronal e muscular esquelético).

Nossos dados mostram que ambas as toxinas aumentam a constante de tempo para a inativação dos canais de sódio em todas as preparações estudadas, com o surgimento de um componente que não inativa. Além disso, em músculo esquelético de rã, a PnTx2-6 reduz a amplitude da corrente de sódio, desloca as curvas de ativação e estado estacionário da inativação para valores hiperpolarizados e aumenta o tempo necessário para a recuperação da corrente de sódio. A afinidade da PnTx2-6 em sarcolema de rã foi 25 vezes menor que em células GH3. Nessas células, a PnTx2-6 modificou os parâmetros relacionados à inativação dos canais de sódio (a curva do estado estacionário da inativação e a recuperação da inativação da corrente de sódio) e o tempo para o pico da corrente. A PnTx2-5 modificou a curva de inativação no estado estacionário, mas não modificou o tempo para o pico e a recuperação da corrente de sódio. As toxinas da aranha não alteram a amplitude da corrente de sódio em células GH3.

Uma diferença que nos chamou a atenção entre a PnTx2-6 e a PnTx2-5 em células GH3 foi a diferença em suas afinidades: o $K_{0,5}$ da PnTx2-6 é 3 vezes menor que da PnTx2-5. Além disso, a PnTx2-5 se liga de forma reversível, sendo lavada do seu sítio ativo. Quando a célula é fortemente despolarizada esta toxina se desliga mais rápido. A PnTx2-6 não se deslocou do seu sítio ativo em nossas condições experimentais, nem mesmo com fortes despolarizações.

A análise do dicroísmo circular da PnTx2-6 sugere que ela seja formada predominantemente por folhas- β e estrutura randômica, apresentando baixa proporção de α -hélice. O espectro de fluorescência do triptofano mostrou que estes resíduos estão expostos na superfície da molécula. Visto que um triptofano e uma tirosina estão substituídos na PnTx2-5, estes aminoácidos podem estar envolvidos na ligação da toxina ao canal de sódio, sendo importantes para conferir o maior $K_{0,5}$ desta toxina quando comparada à PnTx2-6.

- Abstract -

The spider *Phoneutria nigriventer* is the major responsible for the araneism accidents in the Southeast of Brazil. The predominant symptoms of the envenomation indicate a general hyperexcitability. Two toxins of the venom, PnTx2-5 and PnTx2-6 have 48 amino acids each, and molecular weight 5112.3 e 5289.3 Da, respectively. The toxin PnTx2-6 is the most toxic component of the spider venom, and produces similar effects of the whole venom, modifying the sodium channels. As PnTx2-5 and PnTx2-6 diverge in 5 amino acids, we compared their effects on the sodium channel currents of GH3 cells, and compared the effects of PnTx2-6 on sodium currents of neuronal and skeletal muscle fibers.

The data show that both toxins increase the time constant of inactivation of sodium current in all preparation tested, and produce a non-inactivating component. Additionally, in frog skeletal muscle PnTx2-6 decreases the sodium channel current amplitude, shifts the activation and steady-state inactivation voltage dependences to hyperpolarized potentials, and increases the time for recovery from inactivation. The PnTx2-6 affinity in skeletal muscle is 25 times lesser than that of GH3 cells. In these cells, PnTx2-6 modified the parameters related to the inactivation of sodium channels (the voltage-dependence of steady-state inactivation curve and the recovery from the sodium current), and the time to peak of the current as well. PnTx2-5 modifies the steady state inactivation curve, but does not modify the time to peak nor the recovery from inactivation of the sodium current. The toxins do not modify the amplitude of the sodium channel in GH3 cells.

The main difference PnTx2-6 and PnTx2-5 on GH3 cells was their affinities: the $K_{0.5}$ of PnTx2-6 is 3 times smaller than PnTx2-5. In addition, PnTx2-5 binds reversibly and can be washed from its binding site. When the cell is strongly depolarized, this toxin unbind faster, However, PnTx2-6 is not displaced from its binding site in ours experimental condition, even after strong depolarization

The circular dichroism analysis of Pntx2-6 suggests that its secondary structure is formed predominantly by β -sheet and random coil, with a small proportion α -helix. The tryptophan fluorescence spectra show that these residues are exposed on PnTx2-6. One tryptophan and one tyrosine are replaced in PnTx2-5 when compared to PnTx2-6, and these amino acids may be involved in the binding of the toxin to the sodium channel, and their absence may account for the difference of affinities.

- Abreviações -

A	Absorbância
AaIII	Toxina tipo II do escorpião <i>Androctonus australis hector</i>
BSA	Soro albumina bovina
CD	Dicroísmo circular
CssIV	Toxina tipo IV do escorpião <i>Centruroides suffusus suffusus</i>
D	Domínio
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2 etanosulfônico
I ¹²⁵	Iodo radioativo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
STX	Saxitoxina
TEA-Cl	Cloreto de tetraetilamônio
TTX	Tetrodotoxina
Ui	Unidades internacionais

-Índice -

- Agradecimentos -	3
- Resumo-	5
- Abstract -	6
- Abreviações -	7
- Introdução -	9
- Estrutura dos canais iônicos sensíveis à voltagem -	10
- Sensor de voltagem -	12
- Poro -	13
- Inativação -	14
- Acoplamento ativação/inativação -	16
- Modulação por subunidades β -	16
- Diversidade e nomenclatura dos canais de sódio sensíveis à voltagem -	17
- Toxinas que agem em canais de sódio -	19
- Toxinas da aranha <i>Phoneutria nigriventer</i> -	24
- Objetivos -	27
- Metodologia -	28
- “Loose patch voltage clamp” -	28
- Células GH3 -	29
- “Whole cell patch clamp” -	30
- Purificação das toxinas -	31
- Estatística -	32
- Experimento de competição nos canais de sódio em cérebro de mamífero -	33
- Iodação de toxinas: método da lactoperoxidase -	33
- Cromatografia em papel -	34
- Preparação sinaptosomal bruta (P2) de cérebro total de rato -	34
- Preparação de sinaptosomas cérebro-corticais de rato -	35
- Experimento de competição com a toxina tipo α e β -	35
- Determinação da concentração da PnTx2-6 -	37
- Fluorescência do triptofano -	37
- Dicroísmo circular -	38
- Resultados -	39
- Caracterização dos canais de sódio das células GH3 -	40
- Efeito das toxinas PnTx2-6 e PnTx2-5 sobre as correntes de sódio -	41
- Relação corrente x voltagem -	43
- Dependência de potencial da condutância -	46
- Estado estacionário da inativação das correntes de sódio -	48
- Recuperação da inativação da corrente de sódio -	50
- Análise da cinética de inativação -	53
- Relação concentração x modificação.....	55
- Tempo para o pico da corrente de sódio -	57
- Deslocamento das toxinas de seus sítios ativo -	60
- Experimentos de ligação e novos experimentos controle -	62
- Coeficiente de extinção e análise da estrutura secundária -	66
- Discussão -	71
- Referências bibliográficas -	79

- Introdução -

Aprendizado, memória, movimento, sensações, e outros processos complexos são todos coordenados por sinais elétricos (potenciais de ação) conduzidos ao longo das fibras de células nervosas. O potencial de ação das células excitáveis, tipicamente consiste de uma fase rápida de despolarização, causada pelo influxo transmembrana de íons sódio, que pode ser acompanhado pelo influxo de íons cálcio, e finalmente termina pela repolarização, com o efluxo dos íons potássio, concomitante com a interrupção do influxo de sódio (Halon & Wallace, 2002). Canais de sódio, cálcio e potássio sensíveis à voltagem mediam seletivamente os movimentos destes íons. Os canais iônicos sensíveis à voltagem recebem este nome por responderem a mudanças no potencial elétrico entre os meios extra e intracelular, para isso, possuem um sensor de voltagem, que levará à ativação do canal.

Estruturalmente relacionados e altamente seletivos estes canais são membros da família dos canais sensíveis a voltagem (Strong et al. 1993). Canais de potássio sensíveis à voltagem são formados por 4 subunidades com 6 segmentos transmembrana cada, que juntas, formam o canal funcional, que pode estar associado a outras subunidades modulatórias. Os canais de sódio e de cálcio têm apenas uma subunidade funcional, que é formada por quatro domínios homólogos com seis segmentos transmembrana cada e guardando grande homologia com as subunidades dos canais de potássio. Acredita-se que os canais de sódio e de cálcio surgiram de um canal iônico ancestral, estruturalmente similar aos canais de potássio, que sofreu dois ciclos de duplicação gênica (Hille, 2001). De acordo com esta hipótese, um gene que codifica um canal iônico com seis segmentos transmembrana sofreu um primeiro ciclo de duplicação resultando em um gene que codifica um canal iônico de doze segmentos transmembrana, precursor dos domínios I e II, que foram se divergindo e desenvolvendo uma assimetria que foi transmitida aos domínios III e IV, formados após o segundo ciclo de duplicação. Evidências que suportam esta hipótese e mostram a estreita relação filogenética entre os canais iônicos sensíveis à voltagem têm sido mostradas. Ren e colaboradores (2001) expressaram e caracterizaram um canal iônico de bactéria (*Bacillus halodurans*) que codifica um canal com características estruturais similares aos canais de potássio, com um único domínio com seis segmentos transmembrana, alta similaridade na região do poro com os canais de cálcio sensíveis à voltagem, e que é bloqueado pelos mesmos bloqueadores de canais de cálcio, mas que é seletivo para sódio. Outra evidência foi a clonagem um canal iônico de rim de rato que possui 12 segmentos transmembrana (Ishibashi et al, 2000). Este canal apresenta alto grau de identidade na sequência de aminoácidos com os canais de sódio e de cálcio, sendo postulado que este canal poderia ser o ancestral de dois domínios destes canais.

- Estrutura dos canais iônicos sensíveis à voltagem -

As correntes de sódio foram primeiro registradas por Hodgkin e Huxley, que utilizando técnicas de *voltage clamp* demonstraram as três características que definem os canais de sódio: (1) ativação dependente de voltagem; (2) rápida inativação e (3) condutância iônica seletiva (Hodgkin & Huxley, 1952). Mas a proteína do canal de sódio foi isolada somente em 1980, através de marcação de fotoafinidade de uma toxina do tipo a de escorpião (Beneski & Catterall, 1980) que permitiu a identificação de duas subunidades, uma com 260 KDa e outra com 36 Kda, que foram denominadas α e β , respectivamente. Em 1984, Noda e colaboradores sequenciaram o cDNA que codificava a cadeia polipeptídica completa da subunidade α do canal de sódio de eletroplaca do peixe elétrico (*Electrophorus electricus*). A seqüência de aminoácidos então deduzida revelou uma grande proteína, com 4 domínios internos homólogos, cada um contendo 6 segmentos transmembrana em α -hélice. A subunidade α (figura 1) é composta pelo sensor de voltagem, poro seletivo e partícula de inativação. Associada a esta subunidade, podemos encontrar subunidades acessórias, que modulam a atividade e/ou expressão da subunidade α , chamada subunidade β . Em canais de sódio, até o momento, foram descritas três subunidades β : β_1 , β_2 e β_3 .

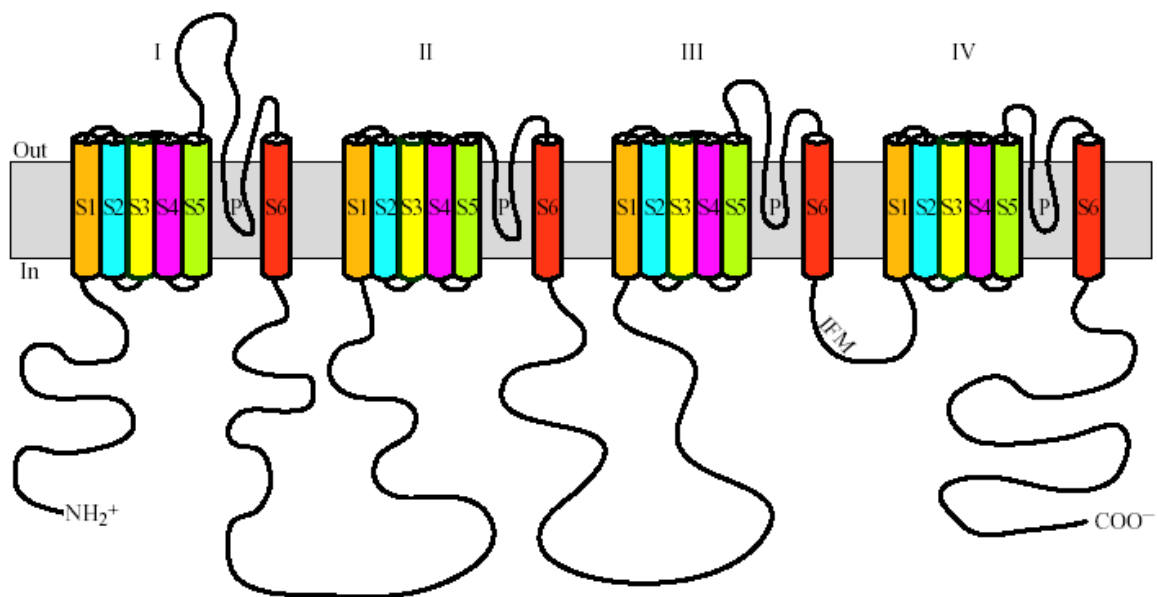


Figura 1: Provável topologia transmembrana da subunidade α do canal de sódio, mostrando a posição intracelular das regiões N e C- terminal, os quatro domínios I, II, III e IV, com 6 segmentos transmembrana (S1-S6) cada domínio. Observe também a alça P, entre os segmentos S5 e S6 de cada domínio, que se invagina na membrana formando as paredes do poro.

Em 2001, Sato e colaboradores mostraram a estrutura tridimensional do canal de sódio em uma resolução de 19 Å através de microscopia crio-eletrônica. Examinando a estrutura

tridimensional, o canal de sódio tem a forma de um sino com 47% de sua massa no lado intracelular e 24% no lado extracelular. A imagem mostra quatro massas transmembrana arranjadas simetricamente em torno de um eixo central (poro), perpendicular à membrana. Entretanto, o poro central não conecta diretamente os lados intra e extracelulares, ao invés disso, ele divide-se em 4 ramificações que o conecta à solução do banho. Mas a característica mais inesperada da estrutura é a presença de 4 poros transmembrana, localizados perifericamente, um em cada domínio. Especula-se que façam parte do poro do *gating*, que acomodaria o movimento do sensor de voltagem (Sato et al., 2001; Catterall, 2001) (Figura 2).

Em 2003 foi resolvida a estrutura tridimensional do canal de potássio (KvAP, da bactéria *Aeropyrum pernix*) por difração de raio-X com a resolução de 1,9Å (Jiang et al, 2003a). A estrutura, um tanto surpreendente, mostrou que diversas alças que se imaginava estarem expostas nos ambiente intra ou extracelular estão inseridos no ambiente lipídico da membrana, e sugere que o sensor de voltagem (segmento S4), funcione como um ‘remo’, puxando o segmento S5 no momento da despolarização. Tal mudança conformacional levaria à abertura do canal. Experimentos funcionais utilizando anticorpos monoclonais e inibidores reforçam esta

interpretação (Jiang et al., 2003b). Porém este modelo não é compatível com os modelos construídos a partir da acessibilidade de aminoácidos modificados às faces intra ou extracelular, de canais no repouso ou ativados, o que gera muitas duvidas se a estrutura do cristal representa, de fato, a estrutura da proteína nativa (Gandhi et al., 2003)

Adicionalmente, é difícil conciliar a estrutura tridimensional proposta para o canal de potássio a partir de difração de raio-X (Jiang et al., 2003a) com a estrutura para o canal de sódio obtida por microscopia (Sato et al., 2001). É possível que a estrutura dos canais iônicos tenha sido modificada no processo de evolução e que não seja tão

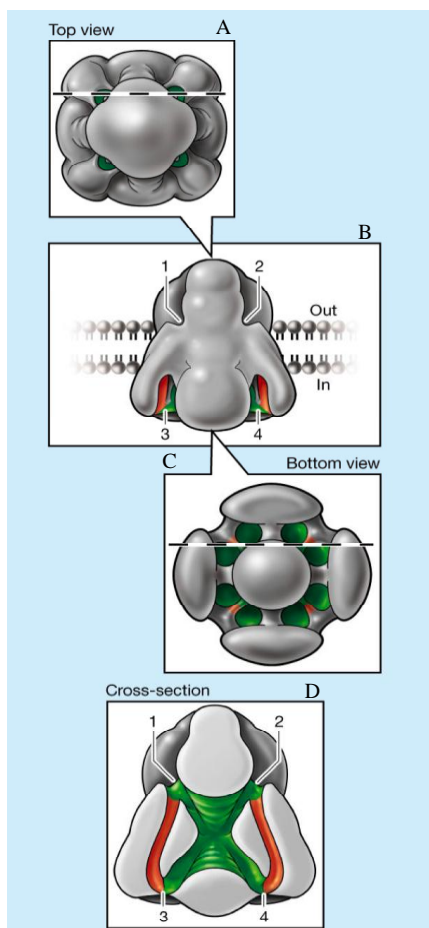


Figura 2: Representação tridimensional do canal de sódio sensível à voltagem proposto por Sato et al. (2001). Em verde está representado o poro central condutor de íons e suas ramificações que se conectam aos ambientes intra e extracelulares. Em vermelho está indicado o poro de *gating* do canal, contendo os segmentos S4, e suas conexões ao poro central. Os números 1 a 4 permitem a orientação do poro do canal de sódio em visão intracelular (C) e em seção transversal (D).

conservada quanto se imaginava

inicialmente. Por outro lado, parece ser ainda prematuro considerar qualquer um dos modelos como definitivo.

- Sensor de voltagem -

A proposta de que o segmento S4 fosse o sensor de voltagem surgiu da constatação da presença de uma carga positiva (Lys ou Arg) a cada 3 resíduos de aminoácidos nestes segmentos. Se a estrutura deste segmento for de uma α -hélice, que é a estrutura mais favorável para um segmento transmembrana, então haverá 3,6 resíduos de aminoácidos por volta, o que colocaria próximos estes resíduos positivos. Se as cargas de S4 estão inserida em um ambiente hidrofóbico, então elas devem estar pareadas a resíduos carregados negativamente em segmentos transmembrana adjacentes. Os aminoácidos básicos do segmento S4 podem estar alinhados a cargas negativas presentes nos segmentos transmembrana S1, S2 e S3 (Fozzard & Hanck, 1996). Se por um lado há a vantagem deste alinhamento no compartilhamento dos prótons e diminuição do campo elétrico local, há a desvantagem de se formar pontes salinas, aumentando incrivelmente a energia necessária para rompê-la durante o movimento do segmento S4. Esta teoria é inviável, já que pequenas mudanças no campo elétrico da membrana devem alterar o posicionamento deste segmento. Se moléculas de água tiverem acesso ao espaço entre os segmentos interagindo com as cargas, isto impediria a formação destas pontes salinas, sem neutralizar a atração entre os resíduos. Segundo o modelo proposto por Sato e colaboradores (2001), a presença de quatro poros de *gating*, medindo 15 Å cada abriga moléculas de água, corroborando com esta teoria. Estes poros permitiriam um movimento rotacional do segmento S4 em direção ao lado extracelular quando a despolarização acontecesse, e este movimento estaria acoplado à abertura do canal.

O movimento do segmento S4 no campo elétrico da membrana gera uma corrente que se relaciona ao movimento das cargas, chamada de corrente de *gating*. Juntos, experimentos de mutagênese sítio-dirigida e correntes de *gating* mostraram que a contribuição do segmento S4 de cada domínio para a abertura do canal não é a mesma, visto que há quatro cargas positivas conservadas no domínio I, cinco nos domínios II e III, e oito do domínio IV (Keynes, 1994).

De todas as mutações que afetaram a ativação do canal de sódio, os efeitos mais pronunciados foram observados na neutralização do 4º resíduo carregado dos domínios I, II e III. Isto é esperado, já que a neutralização de uma única carga do segmento S4 de um domínio que tem menos cargas deverá ter um efeito mais pronunciado que de um domínio de muitas cargas. Se há cooperatividade dependente de voltagem entre os sensores de voltagem (Keynes & Elinder, 1998), então uma mutação que afete o movimento de um segmento S4 resultará no deslocamento da dependência de ativação do canal como um todo.

Estudos de corrente de *gating* mostraram que os segmentos S4 dos domínios I e II se movem mais rápido que os domínios III e IV, contribuindo mais para a ativação do canal. Cha e seus colegas (1999) determinaram a sequência de desativação (a volta do segmento S4 para o

estado fechado) dos segmentos S4 de todos os domínios do canal de sódio de músculo esquelético humano. Eles observaram que, após a despolarização, uma repolarização repentina desativa primeiro o segmento S4 do domínio II, seguido pelo domínio I. Os segmentos S4 dos domínios III e IV desativam somente após a inativação ser removida, ficando imobilizados por ela. No entanto, o segmento S4 do domínio III desativa mais rapidamente que o domínio IV.

- Poro -

As alças que conectam os segmentos S5 e S6 são longas, complexas e completamente diferentes das outras alças. Parte desta região, também chamada de alça P, invagina-se na membrana formando parte das paredes do poro. A alça P é altamente conservada dentro da família de canais de sódio sensíveis à voltagem, como esperado para canais que têm propriedades de permeação similares (Fozzard & Hank, 1996).

Mutações pontuais neste segmento alteram a condutância unitária do canal, seletividade e ligação de toxinas que bloqueiam o canal se ligando no poro: TTX e STX (Terlau et al., 1991; Chiamvimonvat et al., 1996). Os aminoácidos que determinam a seletividade dos canais de sódio (localizados na parte ascendente da alça P) são formados por um anel constituído por 4 aminoácidos: um ácido aspártico, um ácido glutâmico, uma lisina, e uma alanina (formando um motivo conhecido como DEKA), um em cada domínio, de forma equivalente (Terlau et al., 1991; Heinemann et al., 1992). Este motivo é análogo ao descrito em canais de cálcio, onde há quatro resíduos ácidos coordenados de forma similar (Yang et al., 1993). Quando os resíduos de lisina e alanina do canal de sódio são substituídos por ácido glutâmico, há uma perda da seletividade iônica ao sódio, conferindo ao canal seletividade aos íons cálcio (Heinemann et al., 1992).

Foram descritos outros resíduos que alteram a seletividade iônica ou a ligação de toxinas na superfície do canal, que em geral estão localizados também na porção ascendente da alça P, mas estes resíduos tiveram um efeito menos drástico que os resíduos do domínio DEKA (Terlau et al., 1991; Chiamvimonvat et al., 1996; Tsushima et al., 1997).

Experimentos de substituição por cisteínas sugerem que o poro do canal de sódio é assimetricamente organizado e dinâmico (Chiamvimonvat et al., 1996; Benitah et al., 1999). A alça P do domínio II é a mais superficial, dos domínios I e III intermediárias, e do domínio IV mais interna (Chiamvimonvat et al., 1996). Resíduos de cisteínas introduzidas na alça P podem formar pontes dissulfeto internas, que não seriam possíveis se não houvesse uma grande flexibilidade dentro da região do poro (Pérez-Garcia et al., 1996; Benitah et al., 1997).

Resíduos de aminoácidos nos lados N e C-terminal do anel DEKA são acessíveis pelo lado extracelular do poro do canal, mas não pelo lado intracelular (Chiamvimonvat et al., 1996; Pérez-Garcia et al., 1996; Tsushima et al., 1997), sugerindo que a alça P não abrange todo o poro do canal (Yamagishi et al., 1997). Os resíduos do N-terminal do anel de DEKA (parte descendente da alça P) mostraram acessibilidade a cada 3 ou 4 aminoácidos, consistente com uma estrutura de α -hélice nesta região (Yamagishi et al., 2001). Já a análise estrutural da região ascendente mostra que possivelmente esta região forma uma fita β (Lipkind & Fozzard, 1994; Chiamvimonvat et al., 1996). Assim, a alça P do canal de sódio pode ser modelado por um motivo β -hélice-volta-fita- β (Lipkind & Fozzard, 2000).

- Inativação -

Inativação é o processo cinético dependente de potencial que leva a oclusão do poro durante a aplicação de um pulso despolarizante.

Tratamento do lado intracelular da célula com enzimas proteolíticas, especificamente bloqueiam a inativação, indicando que a alça responsável pela inativação do canal de sódio se encontra no compartimento intracelular (Armstrong et al., 1973; Armstrong, 1981). Estudos utilizando anticorpos sítio-específicos e mutagênese sítio-dirigida identificaram a alça intracelular entre os domínios III e IV como crucial para a inativação do canal de sódio (Vassilev et al., 1988; Stühmer et al., 1989; Hartmann et al., 1994). Mutações de três aminoácidos hidrofóbicos desta alça, isoleucina, fenilalanina e metionina (motivo conhecido como IFM), previne a inativação rápida (West et al., 1992) primariamente por desestabilizar o estado inativado do canal (Kellenberger et al., 1996). Pequenos peptídeos contendo o motivo IFM são capazes de restaurar a inativação rápida de canais de sódio em mutantes desta alça, sugerindo que o peptídeo IFM liga-se dentro do poro do canal de sódio e o bloqueia durante a inativação (Eaholtz et al., 1994; Peter et al., 1999). Este modelo é confirmado por resultados mostrando que um resíduo de cisteína substituindo a fenilalanina no motivo IFM torna-se inacessível à reação com reagente cisteína-específico durante o processo de inativação (Kellenberger et al., 1996). Isto implica na presença de resíduos de aminoácidos na boca interna do poro que estão envolvidos nas mudanças conformacionais que acoplam ativação e inativação e ligam o motivo IFM no estado inativado.

Há diversos candidatos ao sítio receptor do motivo IFM. Mutações de uma fenilalanina e um conjunto de três aminoácidos (valina, isoleucina e leucina) presentes no segmento S6 do domínio IV, aumentam enormemente a constante de tempo para a inativação, desestabilizando o estado inativado (McPhee et al., 1994; MCPhee et al., 1995). Várias mutações que produzem paramiotonia congênita humana estão localizadas na alça entre os segmentos S4 e S5 do domínio III, estas mutações também afetam a cinética de inativação e a recuperação do estado inativado

(Yang et al., 1994; Ji et al., 1995). Adicionalmente, alguns aminoácidos presentes na alça intracelular S4-S5 do domínio IV (Filatov et al., 1998; McPhee et al., 1998) são necessários para uma inativação rápida e eficiente.

Embora a alça de inativação (alça entre os domínios III e IV) seja a principal responsável pelo processo de inativação, ela é incapaz de transferir as características cinéticas da inativação de uma isoforma de canal de sódio à outra (Hartmann et al., 1994; Makita et al., 1996). Montegazza e colaboradores (2001) sugeriram que segmento C-terminal do canal de sódio exercesse esta função. Em quimeras entre canais de sódio neuronal e cardíaco, a inativação do canal cardíaco é acelerada, na presença do C-terminal do canal neuronal, e a inativação do canal neuronal fica mais lenta, semelhante à da isoforma cardíaca, na presença do C-terminal cardíaco. Desta forma o segmento C-terminal pode interagir com a alça de inativação, modulando a cinética de inativação. Alternativamente, o C-terminal poderia exercer seu efeito modulatório interagindo também com o sítio receptor da partícula de inativação (a alça entre os segmentos S4-S5 do domínio III ou do domínio IV, ou com a parte mais intracelular do segmento S6 do domínio IV), ou ainda, através de um sítio alostérico em outra região do canal ainda não identificada. A estrutura secundária do segmento C-terminal mostra evidências de que a região mais próxima ao segmento S6 forma um motivo de seis α -hélices, e a região mais distal não apresenta estrutura secundária definida (*random coil*) (Cormier et al., 2002). Além disto, o motivo em α -hélice apresenta um padrão bipolar, com uma região rica em aminoácidos positivos, e outra região com aminoácidos carregados negativamente, sugerindo um importante papel no mecanismo de inativação (Cormier et al., 2002).

Sirota e colaboradores (2002) fizeram a modelagem molecular da alça entre DIII e DIV do canal de sódio de cérebro de rato IIA (que inclui o motivo IFM). Esta região possui 53 aminoácidos, e apresenta 12 resíduos com cargas positivas e 5 com cargas negativas. O modelo prediz 2 segmentos helicoidais entre os aminoácidos F1476-K1482 e T1491-K1502. Além disso, foi encontrado um motivo de “grampo de cabelo” (*hairpin*, em inglês) entre os resíduos T1491-P1512, que pode ser responsável pela aproximação da tríade hidrofóbica IFM em direção ao seu sítio de ligação. Esta função deve explicar, pelo menos parcialmente, a presença de cargas conservadas evolutivamente nesta região e cuja função ainda não havia sido encontrada (Moorman et al., 1990; Patton et al., 1992). O trabalho também explora a possibilidade de haver um desenovelamento do *hairpin* no momento de despolarização, levando à mudanças conformacionais envolvida na inativação do canal.

- Acoplamento ativação/inativação -

Inicialmente acreditava-se que a ativação e a inativação do canal de sódio fossem eventos independentes (Hodgkin & Huxley, 1952). Hoyt (1963, 1968) foi o primeiro a propor que fossem eventos acoplados, mesmo tendo limitações experimentais que pudessem estar distorcendo suas análises. Mais tarde, os dados de Hoyt foram refinados e confirmados por Goldman & Schauf (1972). Atualmente, a ideia mais aceita é que a dependência de voltagem da inativação seja devido ao seu acoplamento à ativação, um mecanismo importante para reduzir o influxo de sódio para dentro da célula durante a geração do potencial de ação (Armstrong & Bezanilla, 1977) para que ele seja rápido.

Esforços têm sido feitos para se compreender como este acoplamento acontece. Em 1995, O'Leary e colaboradores mostraram que a substituição de duas tirosinas adjacentes, localizadas na alça entre os segmentos S4-S5 do domínio III, afeta a dependência de voltagem da cinética de ativação e inativação, sugerindo ter um importante papel no acoplamento normal entre o sensor de voltagem da ativação e a partícula de inativação. Foi também encontrada uma alanina na alça S4-S5 do domínio IV que quando substituída por glutamina mostrava efeitos similares à substituição das duas tirosinas descrita por O'Leary (Tang et al., 1998). Porém este acoplamento ainda não foi completamente elucidado.

- Modulação por subunidades β -

Como visto anteriormente, o canal de sódio pode ser modulado por subunidades acessórias chamadas de subunidades β . Embora a subunidade β modifique as propriedades da subunidade α dos canais de sódio, elas não são essenciais para a formação de um canal funcional. Há três tipos de subunidades β descritas: $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$. As subunidades $\beta 1$ e $\beta 3$ estão associadas à subunidade α não covalentemente, enquanto a subunidade $\beta 2$ está ligada através de pontes dissulfeto.

As subunidades β são glicoproteínas, que possuem apenas um segmento transmembrana, flanqueado por um grande domínio extracelular N-terminal e um pequeno domínio intracelular C-terminal. O domínio extracelular, sozinho, interage e modula a subunidade α (McCormick et al., 1999; Qu et al., 2001). As subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$ são as únicas glicoproteínas transmembrana cujo domínio extracelular contém um motivo semelhante às imunoglobulinas (Isom & Catterall, 1996). Makita e colaboradores (1996b) mostraram que aminoácidos das alças entre os segmentos S5-S6 dos domínios I e IV determinam a interação funcional entre as subunidades α e $\beta 1$.

A co-expressão das subunidades β_1 , β_2 e β_3 e da subunidade α do canal $\text{Na}_v1.2$ em ovócitos de *Xenopus* aceleram a cinética de ativação e inativação do canal, além de deslocar para valores hiperpolarizados a dependência de voltagem da inativação (Isom et al., 1992, 1995a; Morgan et al., 2000). A co-expressão da subunidade β_1 com a mesma isoforma da subunidade α em células de pulmão de hamster também causou um deslocamento para valores mais negativos na dependência de voltagem inativação, porém, deslocou para a mesma direção a dependência de voltagem da ativação e não alterou a cinética de ativação ou inativação do canal (Isom et al., 1995b).

Qu e colaboradores (2001) publicaram um trabalho onde expressaram os três tipos de subunidade β células de rim embrionário humano, HEK 293, muito utilizada em estudos de expressão heteróloga. Como subunidade α , foi utilizada a isoforma $\text{Na}_v1.2$ (neuronal), uma das mais bem caracterizadas. Por isso, a descrição do efeito das 3 subunidades β será baseada nos experimentos de Qu e colaboradores.

A co-expressão das subunidades β_1 ou β_2 não alterou a cinética de ativação, inativação ou recuperação da inativação. Quando co-expressas juntas ou separadas, estas subunidades deslocaram a dependência de voltagem da ativação e inativação da corrente de sódio para valores mais positivos.

Resultados similares foram obtidos com a co-expressão da subunidade β_3 que também deslocou fortemente a dependência de voltagem da ativação e inativação para valores positivos. A co-expressão de ambas, β_2 e β_3 , causou um deslocamento similar ao de β_3 sozinho. Além disso, a subunidade β_3 aumentou a corrente de sódio persistente significativamente, efeito que não foi visto quando foi expressas as subunidades β_1 e/ou β_2 . Foi a primeira evidência de uma subunidade β aumentar a corrente persistente, que pode ser relacionado ao aumento da excitabilidade do neurônio; e deve ser importante para a integração do sinal sináptico nos dendritos e pela geração de descargas epileptiformes (Crill, 1996). A corrente de sódio persistente tem um importante impacto fisiológico e patofisiológico.

Estes resultados sugerem que o efeito da subunidade β sobre a subunidade α depende da carga genética e da via de transdução de sinal da célula recipiente (Qu et al., 2001).

- Diversidade e nomenclatura dos canais de sódio sensíveis à voltagem

Uma grande variedade de canais de sódio tem sido identificadas por análise eletrofisiológicas e clonagem molecular. Em 2000 foi proposta uma nomenclatura para normalizar todos estes canais, eliminando a confusão decorrente da multiplicidade de nomes. O nome consiste

do símbolo químico do principal íon permeante (Na) com o principal regulador fisiológico (voltagem) indicado como um subscrito (Na_v). O número seguinte à subscrição indica a subfamília gênica (Na_v1) e o número seguido do ponto decimal identifica a isoforma específica do canal (por exemplo, Na_v1.1). Processamentos alternativos de cada membro da família são identificados por uma letra minúscula que segue os números (por exemplo, Na_v1.1a) (Goldin et al., 2000). Até o momento foram identificados e funcionalmente expressos 9 isoformas de canais de sódio em mamíferos, todas possuem mais de 50% de identidade na sequência de aminoácidos, sendo considerados membros de uma mesma subfamília (tabela 1) (Goldin et al., 2000; Goldin, 2002). Há uma décima isoforma, chamada de Na_x, que tem aproximadamente 50% de identidade de sequência aos outros canais de sódio de mamíferos, como esta isoforma não foi funcionalmente expressa, é possível que este gene não codifique um canal de sódio sensível à voltagem (Goldin, 2002).

Tabela 1: Subunidades a de canais de sódio de mamíferos.

Tipo	Numero de acesso no 'Genbank'	Símbolo do gene	Processamento alternativo	Tecido primário de expressão
Na _v 1.1	X03638 (r) X65362 (h) AF003372 (cb)	SCN1A	Na _v 1.1a	SNC SNP
Na _v 1.2	X03639 (r) X61149 (r) X65361 (h) M94055 (h)	SCN2A	Na _v 1.2a	SNC
Na _v 1.3	Y00766 (r)	SCN3A	Na _v 1.3a Na _v 1.3b	SNC
Na _v 1.4	M26643 (r) M81758 (h)	SCN4A		Músculo esquelético
Na _v 1.5	M27902 (r) M77235 (h)	SCN5A		Músculo esquelético desnervado, coração
Na _v 1.6	L39018 (r) AF049239 (r) AF049240 (r) U26707 (cm) AF04617 (cm) AF050736 (h) AF225988 (h) AF003373 (cb)	SCN8A	Na _v 1.6a	SNC SNP
Na _v 1.7	U35238 (c) X82835 (h) U79568 (r) AF000368 (r)	SCN9A		SNP Células de Schwann
Na _v 1.8	X92184 (r) U53833 (r) Y09108 (cm)	SCN10		Gânglio da raiz dorsal

	U60590 (cc)			
	AF059030 (r)			
	AJ237852 (r)			
	AF118044 (cm)			
	AB031389 (cm)			
Na _v 1.9	AF126739 (h)	SCN11	Na _v 1.9a	SNP
	AF188679 (h)			
	AF109737 (h)			
	AF150882 (h)			
	M91556(h)			
Na _x	M96578 (r)	SNC7A		Coração, útero, músculo
	Y09164 (r)	SNC6A ^a		esquelético, astrócitos, gânglio
	L36179 (cm)			da raiz dorsal

Abreviações: c, coelho; cb, cobaia; cc, cachorro; cm, camundongo; r, rato; h, humano. SNC, sistema nervoso central; SNP, sistema nervoso periférico.

^a Este gene foi originalmente denominado de SNC6A e SNC7A, mapeados em humanos e camundongos, respectivamente. Entretanto, é provável que representem o mesmo gene, e o símbolo SNC6A provavelmente será descartado. (Adaptado de Goldin et al., 2000).

Os genes que codificam Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v1.7 e Na_x estão agrupados juntos no cromossomo 2 em humanos e camundongos. Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3 e Na_v1.7 compartilham de características comuns, como expressão no sistema nervoso e inibição por concentrações nanomolares do bloqueador típico de canais de sódio sensíveis a voltagem: tetrodotoxina (TTX). Na_v1.5, Na_v1.8 e Na_v1.9, estão agrupados no cromossomo 9 em humanos e cromossomo 3 em camundongos. Estas isoformas também compartilham características em comum, incluindo o fato de todas serem resistentes a TTX. O gene para Na_v1.4 está localizado no cromossomo 11 em humanos e 17 em camundongos, e o gene para Na_v1.6 está localizado no cromossomo 15 em humanos e 12 em camundongos. As propriedades destes dois canais são, geralmente, similares aquelas dos canais expressos em sistema nervoso, incluindo bloqueio por concentrações nanomolares de TTX (Goldin, 2002).

- Toxinas que agem em canais de sódio -

Por serem críticos na excitabilidade, os canais de sódio servem como alvos específicos de muitas neurotoxinas. Estas toxinas ocupam diferentes sítios receptores presentes na superfície do canal de sódio e têm sido usadas como ferramentas para o mapeamento funcional e caracterização molecular do canal.

Devido à sua alta especificidade, toxinas naturais foram primeiro utilizadas para distinguir as espécies moleculares responsáveis pelas correntes de sódio, de potássio e de cálcio. Posteriormente vêm sendo utilizada para identificar os subtipos de canais dentro de cada família de canais íon-específicos (Chahine et al, 1998).

Toxinas que atuam em canais de potássio e de cálcio agem geralmente inibindo as correntes que passam por estes canais. Porém, dentre as toxinas que agem em canais de sódio, várias agem modificando os canais de forma que suas propriedades cinéticas sejam alteradas. A partir da década de 60, quando um potente bloqueador específico para os canais de sódio foi descrito (TTX), houve um grande avanço nos estudos dos canais de sódio. Atualmente diferentes toxinas extraídas e purificadas de algumas espécies de animais, plantas e microorganismos são usadas como ferramentas importantes para identificação, isolamento e estudo de propriedades cinéticas do canal de sódio. A maneira como o canal é modificado dependerá do sítio receptor ao qual ela se liga. Um resumo das características de cada sítio conhecido, bem como dos aminoácidos envolvidos na sua formação, está mostrado na tabela 2, e sua localização está sendo mostrado na figura 3.

Ao sítio 1 se ligam toxinas guanídicas heterocíclicas solúveis em água, como a TTX (Nahashi et al, 1960), inicialmente isolada de uma espécie de baiacu japonês (*Fugu rubripes*); a saxitoxina - STX (Kao, 1966), isolada do dinoflagelado marinho do gênero *Gonyaulax catenella*; e toxinas polipeptídicas como as m-conotoxinas (m-CTX), isoladas do molusco marinho *Conus geographus* (Yanagawa et al, 1987; Sato et al, 1991). Estas toxinas se ligam no lado extracelular do canal de sódio bloqueando o fluxo de íons sódio e, conseqüentemente, o potencial de ação em nervo e músculo (Narahashi et al, 1964, 1967; Nakamura et al, 1965; Kao e Nishiyama, 1965; Catterall, 1992)

A localização do sítio receptor da TTX e STX envolve resíduos de aminoácidos de todos os domínios, aparentemente formando anéis dentro do poro: um mais externo formado por aminoácidos ácidos (E387, E945, D1426 e D1717) e outro mais interno, formado pelo filtro de seletividade (D384, E942, K1422 e A1714) (Noda et al, 1989; Terlau et al, 1991). Foram identificadas também outras mutações que reduzem a ligação da TTX, como D400A, Y401 e E403D no domínio I, T759A e E758 no domínio II e D1532 no domínio IV (Penzotti et al, 1998; Choudhary et al, 2003). A baixa afinidade do canal de sódio cardíaco a TTX levou a hipótese de que este canal não tivesse algum(ns) dos 8 aminoácidos envolvidos na ligação da TTX. Curiosamente, a clonagem da isoforma cardíaca mostrou que a maior diferença era a substituição de um resíduo aromático (Fen ou Tyr) na posição 385 por uma cisteína. Desta forma, este resíduo também foi identificado como sendo importante para a ligação da toxina guanídica (Noda et al, 1989; Heinemann et al, 1992; Satin et al, 1992). Porém, mutações que afetam significativamente a ligação da TTX e STX apenas reduzem fracamente a afinidade da μ -CTX (Chahine et al, 1998), indicando que embora a ligação destas duas classes de toxinas sejam competitivas sobre o canal de sódio, devam haver interações distintas (Stefan et al, 1994; Dudley et al, 1995), como pode ser visto na tabela 2.

Compostos policíclicos apolares, como a veratridina, aconitina, batracotoxina e grayanotoxina, se ligam ao sítio 2 do canal de sódio. Estas toxinas se ligam preferencialmente no estado ativado causando uma ativação persistente mesmo no potencial de repouso da membrana (Catterall, 1977), que pode ser explicada pelo deslocamento do potencial de ativação para valores negativos, pelo bloqueio da inativação e pela redução da seletividade, efeitos eletrofisiológicos desta classe de toxinas (Ulbricht, 1969; Albuquerque et al, 1971; Catteral, 1980). A região transmembrana do segmento S6 do domínio I e IV foi identificada como sendo importante componente do sítio receptor nos canais de sódio (Trainer et al, 1996; Linford et al, 1998; Wang & Wang, 1999). A ligação de toxinas ao segmento IV-S6 provavelmente é a responsável pelo bloqueio da inativação, já que este segmento está intimamente relacionado à inativação dos canais de sódio. Foi mostrado que o aminoácido Y1586 participa da ligação da grayanotoxina mas não da batracotoxina (Kimura et al, 2000), mostrando que também no sítio 2, a ligação destas toxinas se sobrepõe, mas que há determinantes moleculares que são distintos.

Ao sítio 3 se ligam toxinas de escorpião do tipo α e toxinas de anêmonas. De acordo com suas diferentes propriedades farmacológicas, as α -toxinas podem ser divididas em 3 subgrupos: α -clássica, α -like e inseto α -toxina (Gordon et al., 1996; Gordon et al., 1998). As toxinas α -clássicas são altamente tóxicas para mamíferos e as inseto α -toxinas são altamente tóxicas para insetos. As α -like são tóxicas para ambos, mamíferos e insetos.

As α -toxinas são famílias distintas de polipeptídeos que possuem baixa homologia de sequência (Rogers et al., 1996), mas que inibem a inativação do canal de sódio, estabilizando o canal no estado aberto. Além disto, esta classe de toxinas pode deslocar para valores hiperpolarizados o potencial de membrana que dá 50% da condutância máxima (Gonoi & Hille, 1987; Sheets & Hanks, 1999), sugerindo que a inativação do canal exerça um importante papel na determinação da relação voltagem x condutância. Estudos de correntes unitárias (El-Sherif et al., 1992; Cannon & Corey, 1993) e de *gating* (Sheets & Hanck, 1995) sugerem que a atividade primária destas toxinas é inibir a inativação do canal se ligando ao estado aberto, sem significativa alteração na ativação ou na inativação a partir do estado fechado. A associação e dissociação das toxinas do tipo α de escorpião é extremamente dependente de potencial (Thamkun et al., 1984; Campos, 2002).

Por serem toxinas básicas, é provável que resíduos carregados negativamente na superfície do canal contribuam para a ligação destas toxinas. De fato, foi identificado um resíduo ácido entre os segmentos transmembrana S3 e S4 do domínio IV como importante na ligação das α -toxinas (Rogers et al., 1996; Cestèle & Catterall, 2000). A comparação da estrutura das toxinas de anêmonas e de escorpião (Loret et al., 1994) mostrou que cinco resíduos de aminoácidos estão localizados em posições similares nas duas toxinas. Dentre eles, quatro são básicos, constituindo

dois distintos pólos carregados positivamente sobre a superfície destas toxinas. Em síntese, as α -toxinas ligam-se à alça entre os segmentos S3-S4 do domínio IV através de interações eletrostáticas com um resíduo ácido, outras regiões do canal de sódio que tinham sido anteriormente implicadas na ligação das toxinas do tipo α , como as regiões S5-S6 dos domínios I e IV (Tejedor & Catterall, 1988), não foram encontrados resíduos ácidos cruciais para ligação destas toxinas. Análise estrutural identificou uma superfície hidrofóbica conservada entre as α -toxinas (Li et al., 1996) que parece ser parte do sítio funcional destas toxinas com o canal de sódio (Fontecilla-Campos et al., 1988; Li et al. 1999; Sun et al., 2003). Modificações químicas (Kharrat et al., 1989) e análise de mutagênese em resíduos aromáticos da superfície hidrofóbica conservada (Sun et al., 2003) indicam que estes resíduos aromáticos conservados estão especificamente envolvidos tanto no efeito farmacológico quanto na estabilidade estrutural da toxina. Embora os sítios das toxinas do tipo α de escorpião e das toxinas de anêmonas se sobreponham, estas toxinas apresentam interação distintas com o canal de sódio.

Outra classe de toxinas escorpiônicas, denominadas β -toxinas, se ligam ao sítio 4 do canal de sódio, deslocando fortemente a dependência de voltagem da ativação para valores mais negativos (Vijverberg et al., 1984). Através de quimeras de canais de sódio de músculo esquelético de rato e cardíaco (que apresentam sensibilidades diferentes 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 onde uma potente toxina do tipo β do escorpião *Centruroides suffusus suffusus* (Css IV) 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 um pré-pulso despolarizante para a sua ligação. Mostraram também que a mutação G845N, 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 de natureza estérica ou de polaridade.

Poliésteres cíclicos como as brevetoxinas e as ciguatoxinas se ligam ao sítio 5 (Catterall e 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 II (Trainer et al., 1993) e IV (Cestèle et al., 1995).

Mais recentemente foi identificado, em canal de sódio de inseto, um novo alvo de neurotoxinas, o sítio receptor 6, que liga a δ -conotoxina e inibe a inativação da corrente de sódio (Gordon et al., 1996). Este sítio receptor ainda não foi bem caracterizado.

Tabela 2: Sítios receptores identificados nos canais de sódio.

Sítio	Toxina	Domínio	Animoácidos	Referências
Sítio 1	Tetrodotoxina Saxitoxina	ISS2-S6 IISS2-S6 IIISS2-S6 IVSS2-S6	D384, E387, Y385, D400, Y401, E403 E758, E942, E945 K1422, D1426 A1714, D1717, D1532	Noda et al., 1989; Terlau et al., 1991; Heinemann et al., 1992, Penzotti et al., 1998; Choudhary et al., 2003.
	μ -conotoxina	ISS2-S6 IIS5-S6 IIISS2-S6 IV SS2-S6	D400, Y401, W402, E403 A728, A730, E758 W1239, D1241 W1531, D1532	Stefan et al., 1994; Dudley et al., 1995; Chahine et al., 1995 e 1998.
Sítio 2	Veratridina Batracotoxina Grayanotoxina	IS6 IVS6	I433, N434, L437 F1579, N1584, I1760, F1764 Y1586	Trainer et al., 1996; Wang et al., 1998
	α -escorpiotoxina toxina de anêmona toxina de aranha	IS5-S6 IVS5-S6 IVS3-S4	E1613 E1616, V1620, L1624	Tejedor & Catterall, 1988, Rogers et al., 1996.
Sítio 4	β -escorpiotoxina	IS5-SS1 IIS1-S2 IIS3-S4 IIISS2-S6	G845	Cestèle et al., 1998.
Sítio 5	Brevetoxinas Ciguatoxina	IS6 IVS5		Trainer et al., 1991; Tainer et al., 1994.
Sítio 6	δ -conotoxina			Gordon et al., 1996.

(Adaptado de Cestèle & Catterall, 2000)

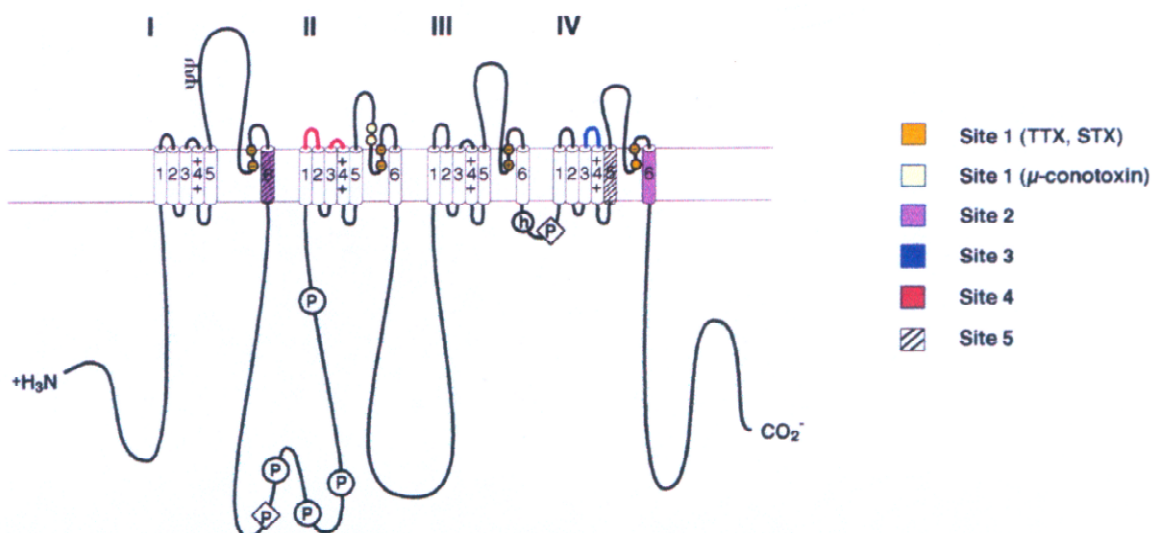


Figura 3: Localização dos principais sítios receptores das neurotoxinas sobre os canais de sódio de mamíferos. Para os sítios de ligação das toxinas do tipo α (sítio 3) e β (sítio 4) estão destacados somente aqueles que, quando ausentes, diminuem a afinidade de ligação pelo menos 5 vezes. Figura retirada do artigo de Cèstèle & Catterall, 2000.

- Toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* -

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

Na região sudeste, os acidentes são causados predominantemente pela picada da aranha *Phoneutria nigriventer*. Popularmente conhecida como armadeira, esta aranha possui hábitos noturnos, é solitária e agressiva. A *P. nigriventer*, descrita originalmente por Keyserling em 1891, pertence à classe Arachnidae, subordem Labidognatha, família Ctenidae. Os sintomas do acidente com esta aranha são: dor excruciante que se irradia do local da picada, câimbras dolorosas, tremores, convulsões tônicas, paralisia espástica, sialorréia, sudorese, priapismo, taquicardia, arritmias e perturbações visuais (Fontana, 1990).

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 era bloqueado por TTX ou por redução da concentração de sódio extracelular, sugerindo um efeito sobre os canais de sódio. Brazil e colaboradores (1988) observaram o efeito da mesma peçonha em aurículas isoladas 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). O veneno da aranha é também capaz de alterar a permeabilidade da barreira hemato-encefálica, particularmente no hipocampo de ratos, causando edema vasogênico mais significativo um dia após a injeção (Lê Sueur et al., 2003).

O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* é composto por uma mistura de polipeptídios e moléculas ativas biologicamente, sendo a maior parte neurotóxicas (Brasil & Vellard, 1925). Resende Jr. e colaboradores (1991) isolaram, através de cromatografia líquida de fase reversa e gel filtração, os peptídeos neurotóxicos do veneno, encontrando cinco frações ativas: PhTx1, PhTx2, PhTx3, PhTx4 e M.

Quando injetado intracerebroventricular (i.c.v.) de camundongo, o efeito da fração PhTx2 era acentuadamente excitatório, incluindo salivação, lacrimejamento, priapismo, convulsões e paralisia espástica das extremidades anteriores e posteriores (Resende Jr. et al, 1991), reproduzindo os efeitos predominantes da injeção do veneno. Esta fração também estimulou a liberação de glutamato de sinaptosomas de córtex de rato seguindo um aumento do influxo de cálcio (Romano-Silva et al., 1993). Experimentos eletrofisiológicos (Araújo et al., 1993) mostraram que esta fração tem efeitos complexos sobre os canais de sódio, inibindo a cinética da inativação e deslocando a dependência de potencial tanto da ativação como da inativação para valores mais negativos.

Da fração PhTx2 foi possível identificar 9 isoformas (Cordeiro et al., 1992). Essas toxinas apresentam alta proporção de cisteínas (Resende Jr. et al., 1991), uma característica comum a muitas outras neurotoxinas de veneno de aranhas (Cordeiro et al., 1995; Escoubas et al., 2000).

Dentre as 9 isoformas da fração PhTx2 (PnTx2-1 a PnTx2-9) 4 já foram totalmente sequenciadas: PnTx2-1, PnTx2-5, PnTx2-6 e PnTx2-9, sendo identificados 53, 48, 48 e 32 resíduos de aminoácidos, respectivamente. As isoformas PnTx2-1, PnTx2-5 e PnTx2-6 apresentam alto grau de identidade entre si (figura 4), exceto quando comparado à PnTx2-9.

```

PnTx2-1      ATCAGQDKPCKET--CDCCGERGECVCALSYEGKYRCICRQGNFLIAWHKLASCK
PnTx2-5      ATCAGQDQTCKVT--CDCCGERGECVCGGP-----CICRQGNFLIAAYKLASCKK
PnTx2-6      ATCAGQDQPCKET--CDCCGERGECVCGGP-----CICRQGYFWIAWYKLANCKK
PnTx2-9      SFCIP-FKPCKSDEN--CCKKFK-CKTTG-IVK----LCRW

```

Figura 4: 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). PnTx2-1, PnTx2-5 e PnTx2-6 apresentam alto grau de homologia: 81% entre a PnTx2-1 e as outras duas e 87% entre a PnTx2-5 e PnTx2-6. PnTx2-9, menos tóxica e menos conservada, apresenta 31% de homologia com a PnTx2-1, 21% com a PnTx2-5 e 25% com a PnTx2-6. Em negrito, estão sendo destacados os aminoácidos diferentes entre as sequências PnTx2-5 e PnTx2-6.

Os sintomas da injeção da toxina PnTx2-6 em camundongos incluem: priapismo (Richardson, comunicação pessoal) lacrimejamento, hypersalivação, sudorese e agitação seguidos de paralisia espástica das extremidades anteriores e posteriores e morte (Le Sueur et al., 2003).

Penaforte (2000) clonou diversas toxinas da *P. nigriventer* e expressou a isoformas PnTx2-6, porém a expressão não foi funcional. Foi identificado que estas toxinas são expressas com um peptídeo sinal do lado N-terminal de 17 a 20 aminoácidos, seguido por um propeptídeo rico em glutamato e pela sequência da toxina madura. Talvez estes peptídeos possam estar dirigindo o enovelamento da toxina, e este seja o motivo da expressão de uma toxina não-funcional. Além disto, estas toxinas foram expressas junto com uma proteína de fusão, para permitir sua purificação, e esta proteína pode estar alterando a conformação da toxina nativa. Há outros relatos na literatura de toxinas recombinantes e/ou mutantes não funcionais, dificultando os estudos estrutura/função destas toxinas (Zilberberg et al., 1997; Sun et al., 2002).

As isoformas PnTx2-5 e PnTx2-6 apresentam 89% de homologia, o que significa somente cinco aminoácidos diferentes. Elas podem ser consideradas, portanto, mutantes naturais, o que torna interessante estudar comparativamente os efeitos de ambas. A PnTx2-6 já havia sido estudada por Matavel e colaboradores (2002), porém sobre a isoforma PnTx2-5 havia somente estudos preliminares (Araújo et al., 1993), mostrando efeito sobre a inativação de canais de sódio.

Dentre os aminoácidos não idênticos, como pode ser visto na figura 4, houve a substituição de uma treonina por uma prolina, uma valina por um glutamato, uma asparagina por uma tirosina,

uma leucina por um triptofano e uma serina por uma asparagina, em posições similares na PnTx2-5 e PnTx2-6, respectivamente.

A isoforma PnTx2-6 reproduz o efeito da fração PhTx2, e conseqüentemente do veneno total, sendo considerada a principal isoforma presente na peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* (Araújo et al., 1993; Mattiello-Sversuta & Cruz-Hofling, 2000). Os sintomas causados pela PnTx2-6 sugerem atividade no sistema nervoso central e no sistema nervoso autônomo (Cordeiro et al., 1992). Matavel e colaboradores (2002, artigo anexo) mostraram que a isoforma PnTx2-6 altera a cinética de inativação da corrente de sódio, deixando-a mais lenta, um efeito de toxinas do tipo α . Porém, ela também desloca para valores hiperpolarizados a dependência de voltagem da ativação e do estado-estacionário da inativação, um efeito mais comumente encontrado em toxinas do tipo β , mas que pode ser encontrada também em toxinas do tipo α (Graham et al., 1996; Sheets & Hanck, 1999; Gordon & Gurevitz, 2003). A coexistência de efeitos típicos de toxinas do tipo α e β sugere que a interação da PnTx2-6 com o canal de sódio ocorra de maneira distinta das toxinas do tipo α e β , podendo envolver “macrosítios”, especialmente do sítio 3 ou ocorrer em um sítio receptor ainda não identificado na superfície do canal de sódio. Os dados apresentados por Matavel et al. (2002) foram obtidos em músculo esquelético de rã usando a técnica do *loose patch-clamp*. Para uma análise cinética mais detalhada, foram feitos experimentos usando técnicas mais precisas.

No presente trabalho, nós estudamos o efeito das toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6 em células neuro-endócrinas (GH3) utilizando a técnica de *whole-cell patch-clamp*, buscando estabelecer uma relação entre as suas estruturas e as respectivas atividades.

- Objetivos -

- Objetivos gerais —

- Comparar os efeitos das toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6, da aranha *Phoneutria nigriventer*, sobre os canais de sódio dependentes de voltagem de células GH3.
- Comparar os efeitos da toxina PnTx2-6 sobre os canais de sódio dependentes de voltagem de células GH3 e de músculo esquelético de rã.

- Objetivos específicos -

- Comparar o efeito das toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6 sobre a relação corrente x voltagem da corrente de sódio.
- Comparar o efeito das toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6 sobre a dependência de voltagem da ativação da condutância da corrente de sódio.
- Comparar o efeito das toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6 sobre a dependência de voltagem do estado estacionário da inativação da corrente de sódio.
- Comparar o efeito das toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6 sobre a recuperação da inativação da corrente de sódio.
- Medir as constantes de tempo da inativação da corrente de sódio na presença e ausência de ambas toxinas.
- Estimar a proporção de canais modificados pelas toxinas.
- Medir a afinidade da PnTx2-5 e da PnTx2-6 sobre os canais de sódio de células GH3.
- Medir a afinidade da PnTx2-6 sobre os canais de sódio da fibra muscular esquelética.
- Observar o comportamento espontâneo da corrente de sódio de células GH3 ao longo do tempo.
- Determinar o coeficiente de extinção da PnTx2-6 em água.
- Estimar a participação proporcional de diferentes estruturas secundárias na toxina PnTx2-6.
- Verificar a exposição dos triptofanos na superfície da toxina PnTx2-6.
- Relacionar as diferenças funcionais da PnTx2-5 e da PnTx2-6 com as diferenças na seqüência de aminoácidos.

- Metodologia -

- "Loose patch voltage clamp" -

Rãs (*Rana catesbeiana*) pesando entre 60-80 gramas foram sacrificadas por descerebração e desmedulação, e imediatamente o músculo semitendinoso era removido e conservado em solução de Ringer Normal (em mM: NaCl 115; KCl 2,5; CaCl₂ 1,8; HEPES 5; pH 7,2 com NaOH). Um fino fragmento deste músculo era removido e fixado, através dos tendões, em uma câmara com sistema de refrigeração (10 – 12°C) e levado a um microscópio estetoscópio (Carl Zeiss) onde os registros eletrofisiológicos foram medidos. O terra foi conectado ao banho através de uma ponte de agar conectado a um eletrodo de Ag/AgCl.

Foi utilizado o método do *loose patch clamp* similar ao descrito por Stuhmer e colaboradores (1983), mas com as modificações introduzidas por Araújo et al. (1993). Este método é essencialmente idêntico à modalidade *cell attached patch clamp* (Hamill et al., 1981), exceto que a área da membrana é muito maior e não é necessária a formação de um contato de alta resistência entre a membrana e a ponta da pipeta, característico do *patch clamp* convencional.

As pipetas foram feitas com capilares de microhematocrito de vidro com resistência entre 0,2 e 0,6 MΩ e preenchida com Ringer Normal acrescido de 4-aminopiridina (10 mM), para bloquear as correntes de K⁺ (Guillespie & Hunter, 1975), e 0,1% de albumina, para evitar adsorção inespecífica da toxina. Exceto no controle, a PnTx2-6 em diferentes concentrações foi acrescida à solução da pipeta. Para evitar as correntes dos canais presentes na borda da pipeta e, portanto, fora do controle do potencial aplicado, os canais de sódio foram inativados através da despolarização das fibras para $-43,4 \pm 1,6$ mV (Araújo et al, 1993) usando solução de alto K⁺ (em mM: acetato de sódio 88; acetato de potássio 16; KCL 11; propionato de cálcio 1,8; HEPES 5; pH 7,2 com KOH). O potencial de pipeta foi mantido em +50 mV, por pelo menos 10 minutos, de forma que somente os canais circunscritos pela pipeta, e que portanto tinham sua voltagem controlada, tinham a inativação removida.

Quando a pipeta estabelecia um íntimo contato com a membrana da fibra muscular, um selo era formado, o que originava uma resistência (R_s) de aproximadamente 3 vezes o valor da resistência da pipeta (R_p). O fato de R_s atingir valores pequenos, segundo Stuhmer e colaboradores introduz uma dificuldade: as correntes de fuga através desta resistência pode ser grande o suficiente para causar uma queda significativa de voltagem através de R_p. Assim, a voltagem na superfície da membrana será diferente da voltagem aplicada pelo amplificador no interior da pipeta, porque R_p e

RS funciona como divisor de voltagem, e o potencial aplicado na pipeta (V_p) aparecerá na superfície da membrana (V_m) de forma atenuada ($V_m = V_p * A$). Nos nossos experimentos o fator de atenuação A ($A = R_S / (R_p + R_S)$) situava-se entre 0,6 e 0,8. O amplificador de loose patch clamp (Dagan 8900 com um probe de loose patch clamp modelo 8970 e um resistor de feedback de 10 M Ω) podia corrigir esta atenuação analogicamente por meio de um circuito em ponte que compensava o divisor de voltagem formado por R_p e R_s . Esse divisor era balanceado com os resistores variáveis R1 e R2, de forma que o potencial V_m sempre acompanhava a voltagem de comando.

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-Eletronica, São Paulo). A aquisição e análise dos dados foram realizadas através de microcomputador de arquitetura IBM-PC-486, usando um programa em linguagem Pascal feito pelo professor Paulo Sergio Lacerda Beirão. As correntes lineares, de fuga e capacitiva, foram excluídas dos registros pelo uso do protocolo P/4 (Armstrong & Bezanilla, 1977), que subtraía da corrente total gerada pelo pulso teste ao somatório de 4 correntes produzidas por pulsos de $\frac{1}{4}$ da amplitude do pulso teste. Esta amplitude é insuficiente para desencadear a abertura dos canais de sódio e que, portanto, continham apenas os componentes resistivos e capacitivos lineares.

- Células GH3 -

A linhagem GH3 (adquirida da *American Type Culture Collection*, EUA), proveniente de células tumorais de pituitária anterior de rato, são células esféricas e crescem de forma esparsa. As células GH3 expressam canais de potássio, cálcio (subtipo L e T; Armstrong & Metteson, 1985; Kushmerick et al., 1999; Kalapothakis et al., 1998) e sódio (Kushmerick et al., 1998, Monrajas et al., 2000), possuem um crescimento rápido e são de fácil manutenção e manipulação. Elas foram mantidas em cultivo celular em garrafas de poliestireno de 25 ou 75 cm² em meio DMEM (Dubelco's Modified Eagles Medium, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), 10 U_i de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina em estufa de atmosfera úmida com 5% de CO₂. O meio de cultura era trocado 2 ou 3 vezes por semana. Uma vez por semana as células foram soltas da garrafa de cultivo utilizando 1 mM de EDTA em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) ou com 1 mM de EDTA acrescido de 0,1% (p/v) de tripsina em meio DMEM, sem soro ou antibiótico, e plaqueadas em lamínulas de vidro (Corning[®]) em baixa densidade, sendo utilizada após 2 a 5 dias. Aproximadamente 10% das células foram recolocadas em um frasco novo e utilizadas até, no máximo, a passagem 20. KCl e CaCl₂ eram adicionados ao meio das placas de forma a elevar neste meio suas concentrações para 10 mM e 9,3 mM, respectivamente. Esta

estratégia, descrita por Monjaraz e colaboradores (2000), aumenta a expressão de canais de sódio expressos na membrana das células GH3.

- "Whole cell patch clamp" -

Correntes macroscópicas foram registradas a temperatura ambiente (21-25°) com a técnica de *patch-clamp* na configuração *whole-cell* (Hamill et al., 1981) usando um amplificador EPC-9 (Heka Instruments, Germany) conectado por meio de um conversor analógico-digital a um computador *Power-Mac*.

Os registros foram filtrados em filtro Bessel passa-baixa com frequência de corte de 2,8 KHz e amostrados a uma frequência de 20 ou 25 KHz. Os experimentos eram acompanhados em um microscópio invertido (Olympus) no aumento de 400 vezes. A capacitância das células foi medida no início de cada experimento e estavam entre 11 e 27 pF. A resistência em série foi monitorada durante todo o experimento e aqueles com resistência em série maior que 2 vezes o valor da resistência da pipeta foram descartados. Imediatamente antes de cada pulso era feita uma compensação automática da capacitância da célula e da capacitância gerada pela micropipeta. Além disso, as correntes lineares de fuga e capacitivas foram excluídas dos registros pelo uso do protocolo P/4, exatamente como descrito anteriormente para os experimentos do *loose patch clamp*.

Pipetas foram feitas de vidro comum usando um estirador de pipetas vertical (Narishige, Japão), com dois estágios de estiramento e tinham a resistência entre 1,5 - 3,5 MΩ. As pipetas foram preenchidas com a **solução interna 1** nos experimentos utilizando a PnTx2-5 contendo (em mM): NaCl 10; TEA-Cl 20; EGTA 10; CsF 90; CsOH 20; HEPES 10; pH 7,2 ajustado com CsOH. Nos experimentos usando a PnTx2-6, a **solução interna 2** da pipeta continha (em mM): NaCl 10; TEA-Cl 35; EGTA 5; CsF 100; HEPES 10; pH 7,2 ajustado com CsOH. Césio e TEA-Cl foram usados para bloquear os canais de potássio sensíveis à voltagem, EGTA é um quelante de cálcio e mantinha a concentração de cálcio intracelular em níveis muito baixos, dificultando o resselamento da membrana, e o fluoreto estabiliza a membrana da célula (Kostyuk et al., 1975) possibilitando experimentos mais longos.

No início dos experimentos a lamínula contendo as células era colocada em uma placa de petri de 35 mm e preso por meio de um dispositivo em acrílico que a mantinha imóvel e reduzia o volume da placa de petri. O meio de cultura era trocado pela solução externa contendo (em mM): NaCl 140; CsCl 5; MgCl₂ 2; CdCl₂ 0,1; CaCl₂ 1; glicose 5; HEPES 10; pH 7,4 ajustado com NaOH. Durante todo o experimento foi mantida uma perfusão controle que consistia da solução externa acrescida de 0,1% de albumina, utilizada para evitar a adsorção da toxina. A perfusão foi mantido através de uma micropipeta com diâmetro de aproximadamente 500 μm ligada a um

solenóide que permitia a troca de até 2 soluções (controle e toxina), cujo fluxo foi regulado para 150 a 250 $\mu\text{L}/\text{minuto}$. Preso através de um ímã na placa foi montado um sistema de sucção que mantinha o volume da placa de petri em níveis adequados para o experimento.

Soluções estoque de toxinas eram preparadas em concentrações pelo menos 20 vezes maiores do que a concentração de ensaio, e continha 0,1% de albumina. Estas soluções eram mantidas congeladas até o uso.

- Purificação das toxinas -

As toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6 foram purificadas e gentilmente cedidas pelo Dr. Michel Richardson ou pela Dra. Marta N. Cordeiro da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Brevemente, a fração PnTx2 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 *Phoneutria nigriventer*. As isoformas PnTx2-5 e PnTx2-6 eram separadas da fração PnTx2, por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC (Cordeiro et al., 1992).

A pureza das toxinas nos experimentos com GH3 foi verificada em espectrometria de massa (espectrômetro Q-TOF, Micromass – Manchester, UK) e as amostras apresentaram um pico predominante, com massas de 5112,3 Da e 5289,7 Da para a PnTx2-5 e PnTx2-6, respectivamente (figura 5).

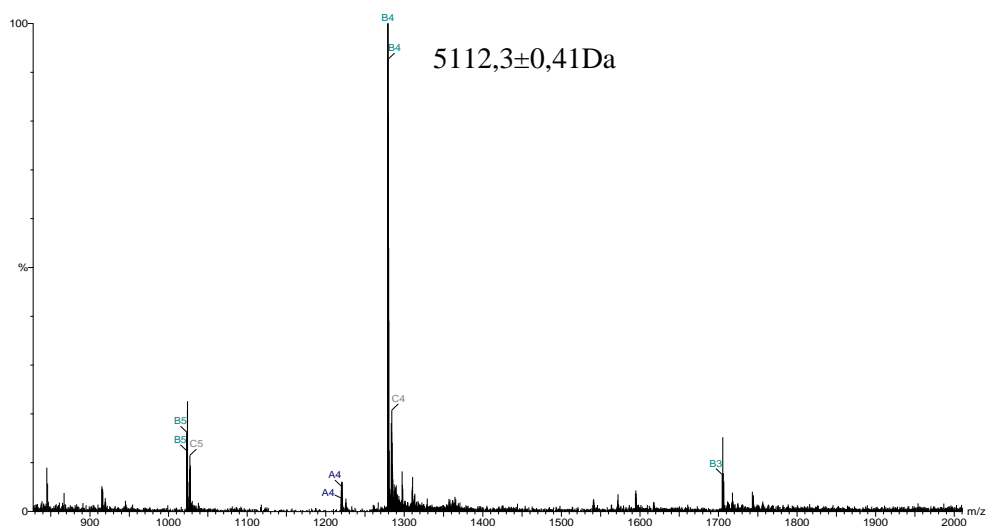
Todos os experimentos foram utilizados o mesmo lote para cada uma das toxinas. Nos experimentos eletrofisiológicos foram utilizadas as seguintes concentrações das toxinas:

PnTx2-5 10 nM, 70 nM, 100 nM, 200 nM, 1 mM e 3 mM.

PnTx2-6 10 nM, 50 nM, 100 nM e 300 nM.

Nos experimentos de competição, foram utilizadas concentrações de PnTx2-6 entre 10^{-10} e 10^{-6} M.

A. PnTx2-5



B. PnTx2-6

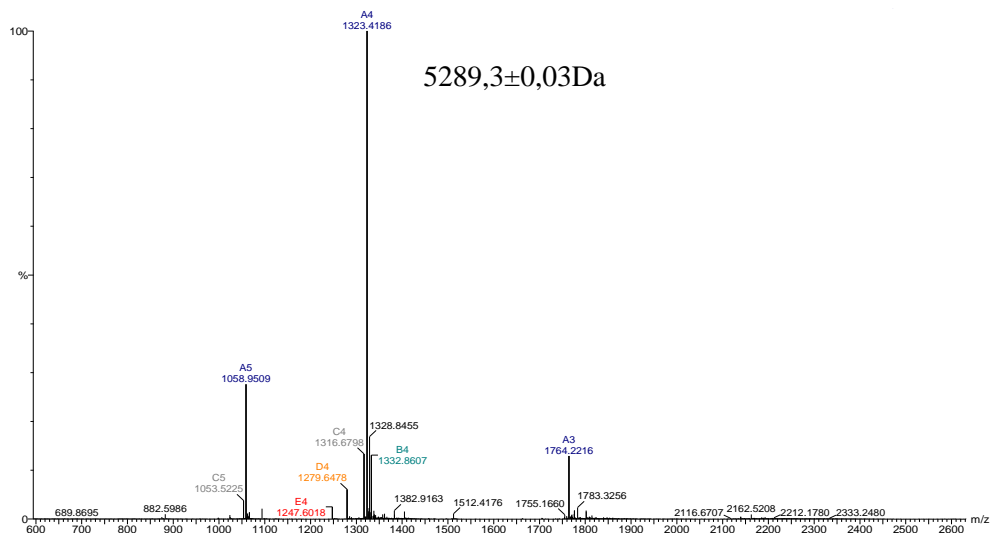


Figura 5: As massas das toxinas PnTx2-5 (A) e PnTx2-6 (B), observadas no espectômetro de massa, foram $5112,3 \pm 0,4$ Da e $5289,3 \pm 0,03$ Da, respectivamente. Estes valores são próximos de suas massas teóricas de 5113,6 Da e 5289,7 Da, respectivamente.

- Estatística -

A análise estatística foi feita usando o teste *t* de *Student* (usando o programa SigmaPlot 5,0; Jandel Scientific, USA) onde foram verificadas as alterações observadas nos registros obtidos na presença da PnTx2-5 e PnTx2-6 em relação ao controle. Significância estatística adotada era determinada por teste *t* não pareado, tomando como índice de significância $p < 0,05$. Símbolos com barras de erro e valores dos parâmetros significam média \pm erro padrão da média. Os ajustes dos

parâmetros das equações aos dados foram feitos por cálculo numérico utilizando o programa SigmaPlot. As equações utilizadas estão descritas ao longo do texto.

- Experimento de competição nos canais de sódio em cérebro de mamífero —

Para determinarmos o sítio de ligação da toxina PnTx2-6 na superfície dos canais de sódio sensíveis à voltagem, foram feitos experimentos de competição com típicas toxinas que se ligam aos sítios 3 e 4: a toxina do tipo α do escorpião *Androctonus australis hector* (AaHII) e a toxina do tipo β do escorpião *Centruroides suffusus suffusus* (CssIV), respectivamente. Estas toxinas foram marcadas com ^{125}I através do método da lactoperoxidase, como descrito abaixo. Os experimentos foram feitos em preparação sinaptosomal bruta (P2) de cérebro total de rato ou em sinaptosomas cérebro-corticais de rato. As toxinas AaHII e CssIV foram gentilmente cedidas pela Dra. Marie-France Martin Eauclaire (Université de la Méditerranée – Marselha, França).

- Iodação de toxinas: método da lactoperoxidase -

A reação de marcação das toxinas AaHII e CssIV foi realizada segundo método enzimático proposto por Thorell & Johansson (1971), e modificado por Rochat e colaboradores (1977). Em um tubo contendo 5 nanomoles de toxina, foi adicionado tampão fosfato 50 mM (pH 7,4), 0,5 mCi de Na^{125}I (Amersham Pharmacia Biotech, UK), 1,25 μg de lactoperoxidase (Sigma), e 3 adições seqüenciais de 5 μL de solução de peróxido de hidrogênio, diluída 1/50.000, com intervalos de 1 minuto entre cada adição. A reação foi paralisada pela diluição da mistura de marcação com tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) contendo albumina (20 mg/mL).

Para retirada do iodeto radioativo livre, toda a mistura de reação foi transferida para um tubo contendo a resina de troca catiônica Dowex (1-X8, Serva-Heidelberg, USA), previamente saturada com tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) contendo albumina (20 mg/mL). Após agitação e sedimentação da resina, o sobrenadante contendo a toxina marcada foi removido. Foram feitas três lavagens da resina com 250 μL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) contendo albumina 20 mg/mL para otimizar a recuperação da toxina marcada. Os sobrenadantes das quatro lavagens, contendo a toxina radioiodada, foram reunidos e a solução resultante foi armazenada em tubo dentro de um recipiente de chumbo, a 4° C, até o momento de utilização.

- Cromatografia em papel -

Para verificar a eficiência de marcação das toxinas pelo método da lactoperoxidase foram feitas cromatografias em papel Whatman nº 1, utilizando-se como fase móvel o solvente metanol saturado com iodeto de potássio.

Com a finalidade de se estimar a radioatividade incorporada na toxina, à quantidade de toxina recuperada da resina Dowex e à radioatividade específica da toxina radioiodada, foi comparada a distribuição da radioatividade nos perfis cromatográficos, antes e após a exposição das toxinas à resina Dowex. Foram aplicados em um ponto central, a dois centímetros da base da fita de cromatografia (1,8 cm de largura x 18 cm de altura), 5 µL de toxina radioiodada antes da exposição ao Dowex ou 10 µL da toxina radioiodada exposta ao Dowex.

Após a corrida cromatográfica, as fitas de papel foram secadas e cortadas em tiras de 1 cm e a radioatividade foi medida em um contador gama (1275 Mini Gamma Counter – LKB – Wallac).

A atividade específica (AE) de cada toxina foi estimada através da equação:

$$AE = \frac{\text{Radioatividade da toxina após exposição ao Dowex}}{\text{Quantidade de toxina utilizada para a marcação}} \quad (\text{equação 1})$$

O resultado foi expresso em CPM/fmol.

- Preparação sinaptosomal bruta (P2) de cérebro total de rato -

A preparação foi feita segundo Gray & Whittaker (1962). Ratas *wistar*, pesando entre 200 e 250 g, foram decapitadas e o encéfalo retirado. O cerebelo foi desprezado e utilizado o cérebro a 10% (p/v), que foi homogeneizado em tampão fosfato (10 mM, pH 7,4) contendo sacarose (0,32 M) em *potter* de vidro. Durante a preparação, o tecido foi mantido em um banho de gelo. O processo de homogeneização foi repetido por 3 vezes, com intervalos de 2 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 1000 g durante 10 minutos, a 4° C, em uma centrífuga Sorval. O sobrenadante foi recolhido e submetido a uma centrifugação adicional a 15000 g durante 20 minutos, a 4° C. Foi obtido, nessa fase, um precipitado que corresponde à fração sinaptosomal bruta.

O precipitado foi ressuspendido em tampão de incubação Tyrode (em mM: NaCl 136; KCl 5; KH₂PO₄ 2,5; MgSO₄ 1; CaCl₂ 2; glicose 5; Tris-HCl 25; pH 7,4), utilizando-se a relação 10 mL/g (considerava-se o peso inicial do tecido). A suspensão foi homogeneizada manualmente, no próprio tubo da centrífuga (com um pistilo), e centrifugada novamente a 15000 g durante 20

minutos, a 4° C. Em seguida, o precipitado foi ressuspensionado em 2 mL de tampão de incubação e o conteúdo protéico desta preparação foi dosado pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

- Preparação de sinaptosomas cérebro-corticais de rato -

A preparação foi obtida de acordo com Dunkley e colaboradores (1988). Ratas Wistar, pesando entre 200 e 250 g, foram decapitadas e o encéfalo retirado. O córtex foi dissecado, colocado em solução de gradiente (0,32 M sacarose, 1 mM EDTA, 0,25 mM ditiotreitol, pH 7.4), a 10% (p/v) e homogeneizado em *potter* de vidro, repetindo-se essa operação por 3 vezes com intervalos de 2 minutos. A preparação foi mantida por todo o tempo em um banho de gelo para evitar a degradação do tecido. Em seguida, foi centrifugada em uma centrífuga Sorval a 1000 g por 10 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi coletado e ressuspensionado em solução de gradiente. Dois mL desta suspensão foram cuidadosamente depositados sobre um gradiente de percoll (23%, 15%, 10%, 3%) e centrifugado por 5 minutos (32500 g a 4° C). As frações correspondentes aos sinaptosomas foram coletadas, transferidas para outro tubo e adicionada solução de incubação Tyrode (como descrito no item anterior), na diluição de 1:4, e centrifugado por 15 minutos (15000 g, a 4° C). O sobrenadante foi desprezado e foi repetida a operação de lavagem para retirada do percoll. O precipitado foi ressuspensionado em 2mL de tampão de incubação e o conteúdo protéico foi estimado pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

- Experimento de competição com a toxina tipo α -

Nos experimentos de competição da PnTx2-6 com a toxina tipo α de escorpião AaHII iodomarcada (AaHII*) foi utilizado 50 μ g de preparação sinaptosomal bruta (P2) de cérebro total de rato (à fresco), 10^{-10} M da toxina AaHII* e 10^{-7} M da toxina AaHII fria (não marcada). Foram utilizadas diferentes concentrações da toxina PnTx2-6 fria (10^{-10} M a 10^{-6} M). O experimento foi dividido em 4 grupos, completando um volume final de 200 mL:

- a. ligação total (onde foi adicionado apenas a 10^{-10} M da AaHII* e o tecido);
- b. ligação específica (onde foi adicionada 10^{-10} M da AaHII*, 10^{-7} M da AaHII fria e o tecido);
- c. deslocamento pela PnTx2-6 (foi adicionado 10^{-10} M AaHII*, o tecido e diferentes concentrações da PnTx2-6); e
- d. ligação não específica do tubo (foi adicionado apenas a 10^{-10} M da AaHII*, sem tecido).

Os tubos foram incubados de 30 a 40 minutos a 37°C, tempo suficiente para se alcançar um estado de equilíbrio de ligação da toxina ao seu sítio receptor. A solução de incubação utilizada foi (em mM): Hepes 25; glicose 10; colina 140; KCl 5,4; MgSO₄ 0,8; CaCl₂ 1,8; pH 7,4. Após o

período de incubação, a toxina radioiodada ligada ao tecido foi separada da toxina livre por centrifugação da suspensão em microcentrífuga a 11.000 g por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram lavados uma vez com 1 mL de solução de lavagem (a mesma de incubação, exceto que a concentração do tampão Hepes foi 5 mM e da albumina, 7 mg/mL). A radioatividade contida nos tubos foi quantificada em um contador gama (1275 Mini Gamma Counter, LKB, Wallac) e foi considerada como a ligação total da toxina.

Na situação **a** foi medida a ligação total da AaHII*: a ligação específica no seu sítio receptor e a ligação inespecífica. Quando foi adicionado uma concentração 1000 vezes maior da AaHII fria (situação **b**), esta deslocou a AaHII* do seu sítio de ligação específico, que foi lavada no passo subsequente, restando apenas aquela ligada nos sítios inespecíficos. Desta forma, a especificidade da toxina foi calculada como:

$$\text{Ligação específica} = \text{ligação total} - \text{ligação não específica}$$

Na situação **d**, foi visto qual a proporção da AaHII* se ligava inespecificamente no tubo (já que não havia tecido), este valor foi subtraído de todos os demais para se fazer uma estimativa mais realista da ligação da toxina nos seus sítios específicos. Os experimentos foram realizados pelo menos em triplicatas.

Tendo em mãos estes dados pudemos, então, comparar o deslocamento (quando existiu) da AaHII* pelas diferentes concentrações da PnTx2-6 (situação **c**).

- Experimento de competição da toxina tipo β -

Nos experimentos de competição da PnTx2-6 com a toxina tipo b de escorpião C_{ss}IV iodomarcada (C_{ss}IV*) foi utilizado 5 μ g de preparação de sinaptosoma cérebro-cortical de rato, 10^{-10} M da toxina C_{ss}IV*, 10^{-7} M da toxina C_{ss}IV não marcada e 10^{-6} M da PnTx2-6 não marcada para observarmos o grau de deslocamento da C_{ss}IV* do seu sítio. O experimento foi realizado nas mesmas condições do experimento de competição da toxina do tipo α , exceto que foi utilizada a técnica da filtração rápida, em contraste com a centrifugação. Foram utilizados filtros GF/B (25 mm), previamente saturados em solução Scatchard (em mM: HEPES 25; glicose 10; colina 140; KCl 5,4; MgSO₄ 0,8; pH 7,4 com Tris 1 M) acrescido de 20% (p/v) de albumina e 0,3% de polietilenimina, que eram conectados a um sistema à vácuo. A suspensão experimental foi filtrada, ficando retida no filtro apenas os sinaptosomas. Os filtros foram lavados com 5 mL de solução Scatchard lavagem (em mM: HEPES 5; glicose 10; colina 140; KCl 5,4; MgSO₄ 0,8; CaCl₂ 1,8; albumina 0,5% p/v; pH 7,4 com Tris 1 M) e secados pelo sistema de vácuo.

- Determinação da concentração da PnTx2-6 -

Vários métodos de determinação de concentração usam propriedade de absorvância de resíduos aromáticos (280 nm) e são muito precisos. Porém, para se utilizar tal estratégia é importante ter informações sobre o coeficiente de extinção (ϵ) da proteína ou peptídeo. Sabe-se também, que a absorção dos resíduos aromáticos mudam dependendo do ambiente que ele está inserido. O ϵ de nenhuma toxina da aranha *Phoneutria nigriventer* foi determinado até o presente trabalho, além disso, nada se sabia sobre suas estruturas secundárias e terciárias, já que tais toxinas não possuem similaridade com nenhum peptídeo com estrutura depositada no banco de dados. Afim de determinarmos o ϵ da toxina PnTx2-6, foi feita uma diluição da toxina em 20 mM de tampão fosfato pH 6,5 e 6 M de cloreto de guanidina (Edelhoch, 1967). O ϵ da PnTx2-6 foi calculado segundo a seguinte equação:

$$\epsilon_{280}(\text{proteína}) = (\text{número de W}) \times 5690 + (\text{número de Y}) \times 1280 + (\text{número de C}) \times 125$$

(equação 2)

De acordo com a equação, em condições desnaturantes, o ϵ da proteína é diretamente proporcional ao número de triptofanos, tirosinas e cisteínas da proteína. É importante manter a toxina nas condições acima para o cálculo do ϵ pois garante que a toxina está desovelada e que não haverá nenhuma mudança no espectro devido a interação dos resíduos (Ramos, 2003). Uma vez feita a medida da absorvância a 280 nm da toxina em condições desnaturantes, o cálculo da concentração é feito de acordo com a lei de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \times I \times C$$

(equação 3)

Onde A é a absorvância da proteína a 280 nm, ϵ é o coeficiente de extinção ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), I é o caminho ótico da cubeta de quartzo (cm) e C é a concentração da proteína (M^{-1}).

- Fluorescência do triptofano -

A fluorescência espectroscópica é o fenômeno de emissão de luz por uma molécula excitada quando ela transita para um nível de energia mais baixo (Lakowicz, 1999). O principal fluoróforo em proteínas é o resíduo de triptofano, devido a sua alta fluorescência e à sensibilidade às propriedades estruturais e dinâmicas das proteínas. A fluorescência produzida é a razão entre o número de fótons emitidos e absorvidos, e pode ser reduzido por supressão (*quenching* em inglês) (Ramos, 2003). Os registros foram feitos no fluorímetro ABL2 Spectronic em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. A amostra foi excitada a 280 nm e o espectro de emissão foi coletado entre 300 e 450 nm à temperatura de 20° C.

- Dicroísmo circular —

Moléculas assimétricas em solução são opticamente ativas, isto significa que quando elas interagem com uma luz polarizada circularmente, elas absorvem a luz polarizada para direita e para esquerda com eficiência diferente. Esta diferença na absorção produz um feixe de luz polarizada elipticamente que pode ser medido por um espectropolarímetro de dicroísmo circular que o converte em elipicidade (Θ) como mostrado na equação abaixo:

$$\Theta = 2.303 \frac{(A_E - A_D)}{4l} \quad (\text{equação 4})$$

Onde A_E e A_D são a absorbância para a esquerda ou para a direita da luz polarizada circularmente. Podemos notar na equação que o sinal do espectro CD pode ser negativo ou positivo dependendo da absorção preferencial da luz polarizada à direita ou à esquerda (Ramos, 2003).

Esta técnica é sensível para determinar a estrutura secundária de proteínas e é usada para quantificar α -hélices, folhas- β e estruturas randômicas (*random coil*) nas proteínas (Fasman, 1996). α -Hélices e folhas- β são estruturas muito compactas que estão presentes na proteína enovelada e estruturas randômicas é a forma desenovelada da proteína. Os dados medidos por CD são expressos como elipicidade (Θ) em miligráus, que pode ser convertido, para proteínas, em média da elipicidade molar dos resíduos pelo equação:

$$[\Theta] = \frac{\Theta}{10/Cn} \quad (\text{equação 5})$$

Onde C é a concentração da proteína em mol/L e n é o número de resíduos na proteína. A unidade usada neste caso é $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ e é geralmente a escolhida para apresentar dados relacionados a proteínas pois permite uma rápida informação sobre a quantidade de estrutura quando comparada diferentes proteínas ou mutantes de uma mesma proteína.

Para se determinar a estrutura secundária da toxina PnTx2-6 foi feito o espectro de dicroísmo circular, no comprimento de onda da luz UV entre 190 e 260 nm na temperatura de 23°C, exceto quando mencionado no texto. Foi utilizado o espectropolarímetro (Jasco J-810) em cubetas de quartzo com 0,2 ou 1 cm de caminho ótico. A toxina foi inicialmente diluída em água. Os dados foram obtidos em intervalos de 0,5 nm com uma taxa de 50 nm/min. Todos os espectros de CD são resultantes da média de 20 varreduras. O espectro final foi corrigido subtraindo o espectro da linha de base correspondente obtida sobre condições idênticas.

- Resultados -

Dentro do nosso objetivo de caracterizar toxinas da *Phoneutria nigriventer* ativas sobre canais de sódio, iniciamos nosso trabalho estudando a toxina PnTx2-6 com o método do *loose patch clamp*, dando continuidade ao trabalho anteriormente realizado com a fração tóxica PhTx2 (Araújo et al., 1993). Os resultados obtidos, que deram origem à minha dissertação de mestrado (Matavel, 1999) e à uma publicação (Matavel et al., 2002), mostraram ações complexas da PnTx2-6 sobre correntes de sódio de músculo esquelético de rã. Embora muitos aspectos da ação desta toxina tenham sido revelados, algumas perguntas não foram adequadamente respondidas e novas perguntas vieram à tona. Além disso, a baixa afinidade observada ($K_{0,5} = 0,81$ mM). sugeria que a toxina poderia ser menos ativa nas isoformas de músculo esquelético dos canais de sódio. Isto nos levou a utilizar células GH3 e a metodologia do *whole cell patch clamp*. Também fizemos experimentos de competição com típicas toxinas de escorpião de tipo α e do tipo β para determinarmos o sítio de ligação da PnTx2-6 nos canais de sódio.

Muitas toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* já foram clonadas, porém, a expressão funcional destas toxinas ainda não foi conseguida (Penaforte, 2000). Isto tem sido um obstáculo para a realização de mutações sítio-dirigidas nestas toxinas, com vistas a estudos relacionando estrutura e função. Por isso, nós comparamos o efeito eletrofisiológico da PnTx2-6 com a PnTx2-5, uma toxina da mesma aranha que apresenta a seqüência de aminoácidos idêntica à PnTx2-6 exceto pela substituição de 5 aminoácidos. Como foi dito anteriormente, podemos considerar a PnTx2-5 como uma espécie de “mutante natural” da PnTx2-6. Desta forma analisamos alguns aspectos estruturais da toxina PnTx2-6 e discutimos como estes aminoácidos diferentes podem estar influenciando a ligação de cada uma destas toxinas ao seu respectivo sítio receptor na superfície do canal de sódio da linhagem celular GH3.

Portanto, este trabalho apresenta o estudo comparativo da PnTx2-6 em dois tipos distintos de canais de sódio sensíveis à voltagem: o de células musculares esqueléticas, $Na_v1.4$ (Goldin, 2002), e o de células neuroendócrinas GH3; além de estudo comparativo da PnTx2-5 e da PnTx2-6 em canais de sódio de células GH3. Recentemente foi mostrado que as células GH3 expressam canais de sódio $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ e $Na_v1.6$, além das subunidades $\beta 2$ e $\beta 3$ (Vega et al., 2003). No entanto, a adição do tratamento com potássio e cálcio para aumentar a expressão dos canais (veja em “metodologia ou Monrajaz et al., 2000) somente aumenta significativamente a expressão das isoformas $Na_v1.2$ e $Na_v1.3$ (Vega et al., 2003).

Para a apresentação dos dados foram usadas concentrações acima dos seus respectivos $K_{0,5}$, ou seja, 1 μM de PnTx2-6 para os canais de sódio de músculo esquelético de rã, 100 nM para a PnTx2-6 em células GH3 e 200 nM para a PnTx2-5 em células GH3.

- Caracterização dos canais de sódio das células GH3 -

Como esperado para estes tipos de canais neuronais, os canais expressos pelas células GH3 são sensíveis ao bloqueio pela TTX (figura 6). Neste experimento a membrana da célula foi despolarizada para 0 mV, a partir de um potencial de -100 mV gerado por um pré-pulso hiperpolarizante, com intervalos de 3 segundos. A célula foi mantida sob perfusão controle nos instantes iniciais do experimento e a TTX foi adicionada imediatamente antes do 10º pulso despolarizante. Observe que o bloqueio é completo, aparece imediatamente após a adição de 300 nM de TTX e é completamente removido pela lavagem. Além de mostrar a sensibilidade à TTX, este tipo de experimento demonstra a eficácia do sistema de perfusão empregado.

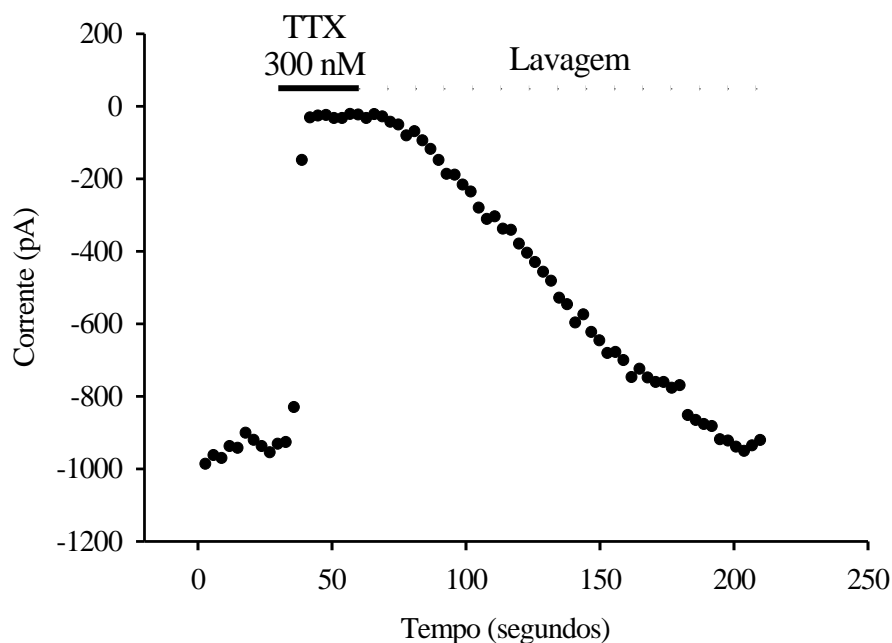


Figura 6: Bloqueio dos canais de sódio das células GH3 por TTX 300 nM. A célula foi despolarizada para 0 mV com intervalo de 3 segundos entre os pulsos. Figura representativa de 5 experimento nas mesmas condições.

- Efeito das toxinas PnTx2-6 e PnTx2-5 sobre as correntes de sódio -

A figura 7 (A-C) mostra registros normalizados representativos, pareados e sobrepostos, do efeito típico da toxina PnTx2-6 em músculo esquelético de rã no potencial de -14 mV (A), e das toxinas PnTx2-6 (B) e PnTx2-5 (C) sobre canais de sódio de células GH3 no potencial de membrana de 0 mV. Nota-se em todos os casos um retardo da inativação e um aumento da corrente persistente, vista no final do pulso. Estes efeitos são característicos de toxinas de escorpião do tipo α , que retardam a inativação impedindo que ela se complete, e podem explicar a hiperexcitabilidade, que caracteriza a sintomatologia do envenenamento por estas toxinas. O decaimento da corrente de sódio durante a inativação pode ser ajustada a uma equação exponencial com uma única constante de tempo (rápida) nos registros controle de ambas as preparações. Na parte (B) o registro obtido na presença de 100 nM de PnTx2-6 mostra que o decaimento da corrente é nitidamente mais lento do que o controle desde o pico máximo da corrente. Diversamente, a análise do registro na presença PnTx2-5 sugere que o decaimento pode ser ajustado a uma equação exponencial com mais de uma constante de tempo, devido a um componente rápido, igual ao do controle, e a um componente mais lento, que inativa lentamente. Os registros obtidos em células GH3 controle, PnTx2-5 e PnTx2-6 foram normalizados para o pico, sobrepostos (para facilitar a comparação do efeito das 2 toxinas) e mostrados na parte (D) da figura 7. É possível perceber que os efeitos das duas toxinas sobre os canais de sódio foram diferentes. Outra diferença notável é a reversibilidade do efeito das toxinas. Na figura 7B não está sendo mostrado o registro após a lavagem, pois, dentro do tempo de lavagem que foi feita (de até 10 minutos, como será mostrado mais adiante), o efeito da PnTx2-6 se mostrou irreversível. Na parte (C) da figura, os registros controle e depois da lavagem estão sobrepostos, o que mostra a reversão do efeito da toxina PnTx2-5 (200 nM) após a lavagem. Os valores médios obtidos são comparados na Tabela 4.

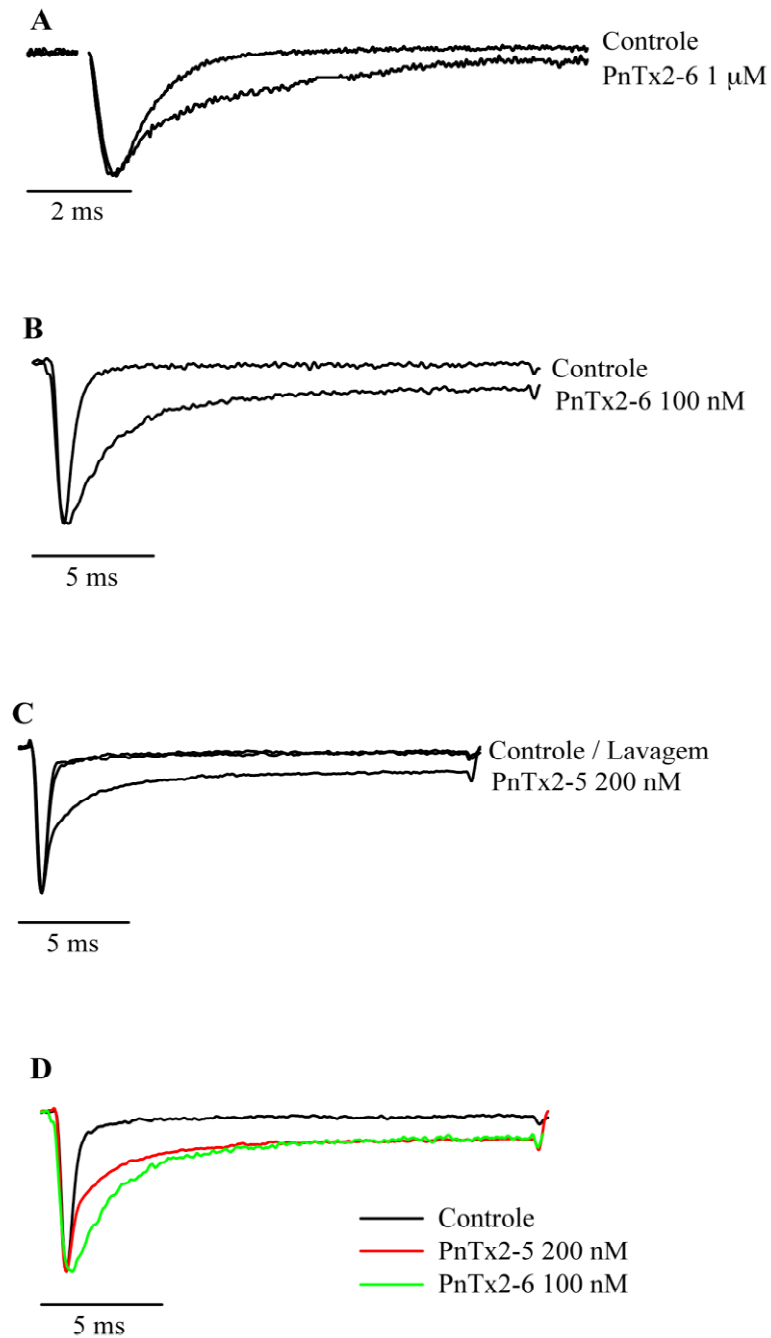


Figura 7: Registros normalizados sobrepostos. **A.** controle e na presença de 1 μ M de PnTx2-6 em músculo esquelético de rã no potencial de -14 mV; **B.** controle e PnTx2-6 100 nM; **C.** o controle, PnTx2-5 200 nM e lavagem. Os registros B e C foram feitos em células GH3 no potencial de membrana de 0 mV, e estão pareados. Na parte **D** da figura, está sendo mostrado o registro controle e na presença das duas toxinas em células GH3 para melhor comparação.

- Relação corrente x voltagem -

Inicialmente analisaremos a dependência de voltagem do canal de sódio na presença e ausência das toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6. Com este objetivo, construímos os gráficos da figura 8, que representa a relação corrente x voltagem (I x V). Para os experimentos em sarcolema de rã (figura 8A), o potencial da área da membrana sob estudo era subitamente levada do repouso (-92 mV) a valores entre -76 mV a + 68 mV (incremento de 8 mV). Na presença da toxina a corrente máxima foi reduzida em 55% e o potencial de ativação da corrente de sódio foi deslocado para valores mais negativos. Os pontos experimentais foram ajustados com a equação 6, da dependência de voltagem para a corrente de sódio.

$$I_{Na} = (g_{Na(Max)} * (Vm - V_{Rev})) / (1 + \exp((Vg - Vm) / kg)) \quad (\text{equação 6})$$

Onde I_{Na} é a corrente de sódio, $g_{Na(Max)}$ é a condutância máxima ao sódio, Vm é o potencial da membrana submetido à célula, V_{Rev} é o potencial de reversão da corrente de sódio, Vg é o potencial que ativa 50% da condutância máxima e kg é o fator de inclinação da condutância. Os valores da média dos ajustes e o erro padrão são mostrados na legenda da figura 8. A análise estatística dos parâmetros indica que a toxina modificou todos os parâmetros encontrados nos ajustes destas curvas.

Os experimentos utilizando o *loose patch clamp*, não permitiu a realização de experimentos pareados controle e na presença de toxina. Portanto, não foi possível observar a redução da amplitude da corrente sequencialmente no mesmo fragmento de membrana. A metodologia do *whol-cell patch clamp*, por outro lado, permite que esta estratégia seja utilizada. Para verificarmos se as toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6 modificam a amplitude das correntes de sódio em células GH3, fizemos o experimento mostrado no gráfico da figura 9, que mostra, na parte A, a média do valor da amplitude máxima da corrente de sódio de 3 experimentos antes e durante a aplicação da PnTx2-6 (100 nM). Os valores obtidos em cada experimento foram normalizados para o valor médio dos 5 primeiros pontos, que foram considerados 100%. Observe que não houve mudança na amplitude da corrente de sódio induzida pela PnTx2-6 (no potencial de 0 mV). Na presença da PnTx2-5 200 nM (parte B da figura 9) que mostra a media de 4 experimentos normalizados pela condição controle, podemos observar que esta toxina também não influenciou a amplitude da corrente (no potencial de 0 mV). Podemos concluir que as toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6 não alteram a amplitude da corrente de sódio em células GH3.

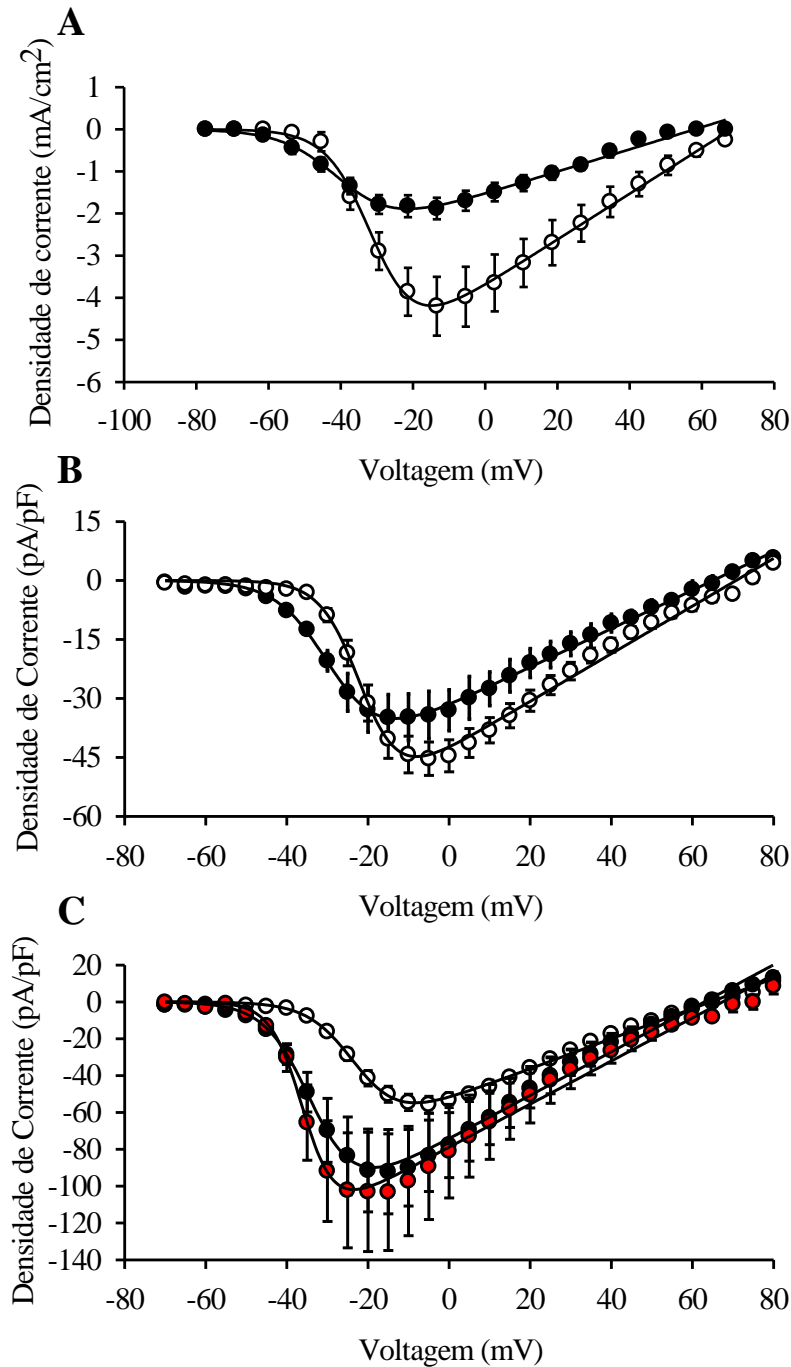


Figura 8: Relação corrente x voltagem da corrente de sódio. Os pontos foram ajustados utilizando a equação 6. **A.** Experimentos em músculo esquelético de rã utilizando a técnica *loose patch clamp*. Os valores de ajuste no controle (n=12) e na presença de 1 μM de PnTx2-6 (n=7) foram, respectivamente: $g_{Na(Max)} = 54,5 \pm 9,4$ e $26,5 \pm 2,9$ mS/cm²; $V_{Rev} = 67,3 \pm 1,7$ e $57,8 \pm 1,3$ mV; $V_g = -31,5 \pm 1,6$ e $-39,2 \pm 2,6$ mV e $kg = 5,5 \pm 0,1$ e $7,28 \pm 0,3$ mV. **B.** Relação corrente x voltagem no controle (círculos brancos, n=12) e na presença da PnTx2-6 100 nM (círculos pretos, n=5), com os respectivos parâmetros de ajuste: $g_{Na(Max)} = 0,63 \pm 0,05$ e $0,49 \pm 0,07$ pS/pF; $V_{Rev} = 68,9 \pm 2,0$ e $65,1 \pm 2,4$ mV; $V_g = -20,5 \pm 0,9$ e $-28,7 \pm 0,5$ mV e $kg = 4,9 \pm 0,2$ e $6,6 \pm 0,4$ mV. **C.** Relação corrente x voltagem no controle (círculos brancos, n=21), na presença de 200 nM de PnTx2-5 (círculos pretos, n=4) e lavagem (círculos vermelhos, n=3), com os respectivos valores de ajuste: $g_{Na(Max)} = 0,82 \pm 0,07$, $1,18 \pm 0,28$ e $1,17 \pm 0,39$ pS; $V_{Rev} = 66,0 \pm 1,5$, $63,0 \pm 0,6$ e $68,4 \pm 1,8$ mV; $V_g = -22,3 \pm 1,1$ mV, $-33,7 \pm 0,7$ e $-35,7 \pm 0,5$ mV; $kg = 5,3 \pm 0,3$, $6,1 \pm 0,7$ e $4,1 \pm 0,7$ mV.

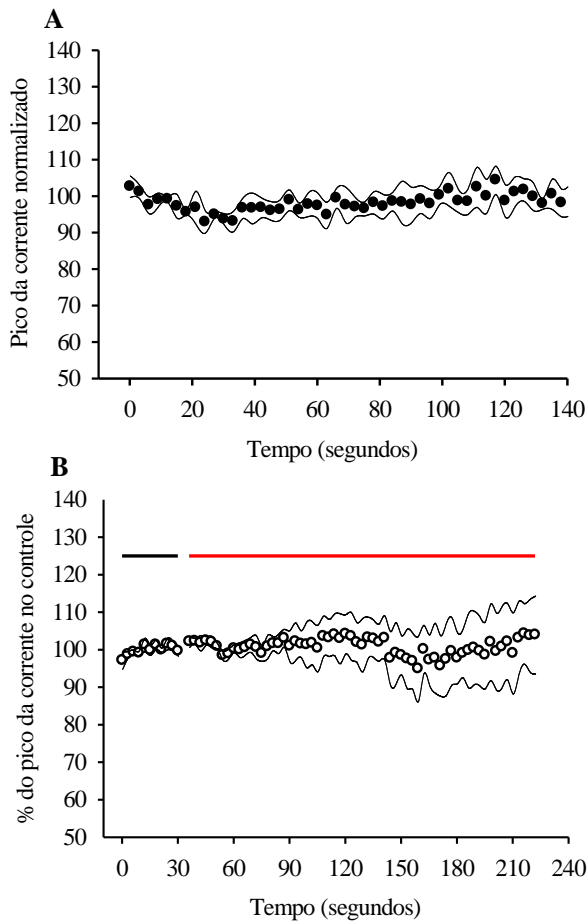


Figura 9: Efeito das toxinas PnTx2-6 e PnTx2-5 sobre o pico das correntes de sódio em células GH3. **A.** Efeito da PnTx2-6 (100 nM, n=3) sobre o pico da corrente em células GH3. As correntes foram normalizadas pela média dos 5 primeiros pontos de aplicação da toxina. **B.** Efeito da PnTx2-5 sobre o pico da corrente de sódio de células GH3. A amplitude máxima da corrente de sódio foi normalizada em relação à média das amplitudes no controle (n=4). A barra preta representa perfusão com solução controle, e a barra vermelha, aplicação da toxina (200 nM). As linhas contínuas contornando os pontos mostram a variação dos experimentos e representam o erro padrão da média.

A análise do parâmetro da condutância ($G_{Na(Max)}$) da relação corrente x voltagem, confirma que não houve mudança significativa deste parâmetro na presença ou ausência das toxinas da aranha em células GH3 (veja a legenda da figura 8 ou a tabela 4). Para a construção dos gráficos das figuras 8B e 8C foram aplicados pulsos de voltagem despolarizantes (pulso teste) entre -70 a $+80$ mV com incremento de 5 mV, a partir de um pré-pulso de -100 mV durante 100 ms para favorecer o estado fechado dos canais de sódio e ter uma proporção maior de canais disponíveis para serem abertos durante o pulso teste. Este procedimento foi utilizado em todos os protocolos, exceto quando explicitado em contrário. O valor máximo da corrente (I) em cada potencial foi dividido pela capacitância (C_p) da célula para normalizar a corrente em relação à área da célula em cada experimento (densidade de corrente, $DC = I / C_p$). Foi construído, então, um gráfico $I \times V$ onde foi feito o ajuste com a equação 6 e os parâmetros anotados para análise estatística. Nenhum parâmetro foi estatisticamente diferente quando comparados aos controles (dos experimentos com a PnTx2-5 e com a PnTx2-6). Na construção da figura 8, a densidade máxima de corrente foi normalizada para o valor 1, já que este parâmetro não foi alterado, para facilitar a visualização da dependência de potencial. No gráfico é possível observar um deslocamento significativo, para potenciais mais negativos (hiperpolarizados), da fase de ativação da corrente de sódio na presença das toxinas. Isto significa que os canais estão se abrindo em potenciais onde normalmente estariam predominantemente fechados. O efeito sobre o deslocamento será mais bem investigado na figura

10. Diferentemente dos canais de sódio de músculo esquelético, os parâmetros V_{Rev} e kg não mostraram diferença estatística.

- Dependência de potencial da condutância -

Para melhor quantificar o efeito das toxinas sobre a fase de ativação da corrente de sódio, foi calculada a condutância do canal em cada potencial [$g_{Na} = I / (V_m - V_r)$] e normalizada em relação a condutância máxima. O ajuste foi feito usando a equação de Boltzmann para a ativação:

$$g_{Na} / g_{Na \max} = \{1 + \exp[(V_g - V_m) / kg]\}^{-1} \quad (\text{equação 7})$$

(todos os termos foram definidos anteriormente).

A figura 10 mostra os pontos experimentais calculados e a curva resultante deste ajuste. Analisando o gráfico, podemos perceber que o potencial que ativa 50% dos canais de sódio está deslocado para valores hiperpolarizados na presença de ambas as toxinas, nos dois tipos celulares. No experimento em músculo esquelético (figura 10A), a PnTx2-6 induziu um deslocamento significativo de $-7,4$ mV, além de modificar também a inclinação da curva (kg), indicando que a dependência de voltagem da ativação do canal foi diminuída, o que significa que a condutância dos canais modificados pela toxina varia de forma um pouco menos acentuada com o potencial da membrana do que na situação controle. Nos experimentos com a célula GH3, na presença da PnTx2-6 o deslocamento foi de $-7,8$ mV (figura 10B) e na presença da PnTx2-5 o deslocamento foi de $-11,2$ mV (figura 10C), ambos foram estatisticamente diferentes de seus respectivos controles ($p < 0.05$). O valor do parâmetro kg foi diferente somente na presença da toxina PnTx2-6 em relação ao seu controle. A PnTx2-5 não mostrou diferença estatística em relação a este parâmetro.

Na parte C da figura 10 são mostrados os experimentos controle, na presença da PnTx2-5 e após lavagem. Curiosamente, o deslocamento da curva não foi revertido pela lavagem, mas o efeito sobre a inativação foi, o que sugere que a toxina foi removida pela lavagem. Este deslocamento é mais típico dentre as toxinas tipo β (Drumond, 2000; Cestèle et al., 1998). Embora possa ser encontrado também em algumas toxinas tipo α (Chen et al., 2000; Chen & Heinemann, 2001), ou em toxinas de outras aranhas (Nicholson et al., 1996; Little et al., 1998), este efeito não é visto nas toxinas tipo α típicas (Campos, 2002). Esta discussão será retomada nos próximos parágrafos.

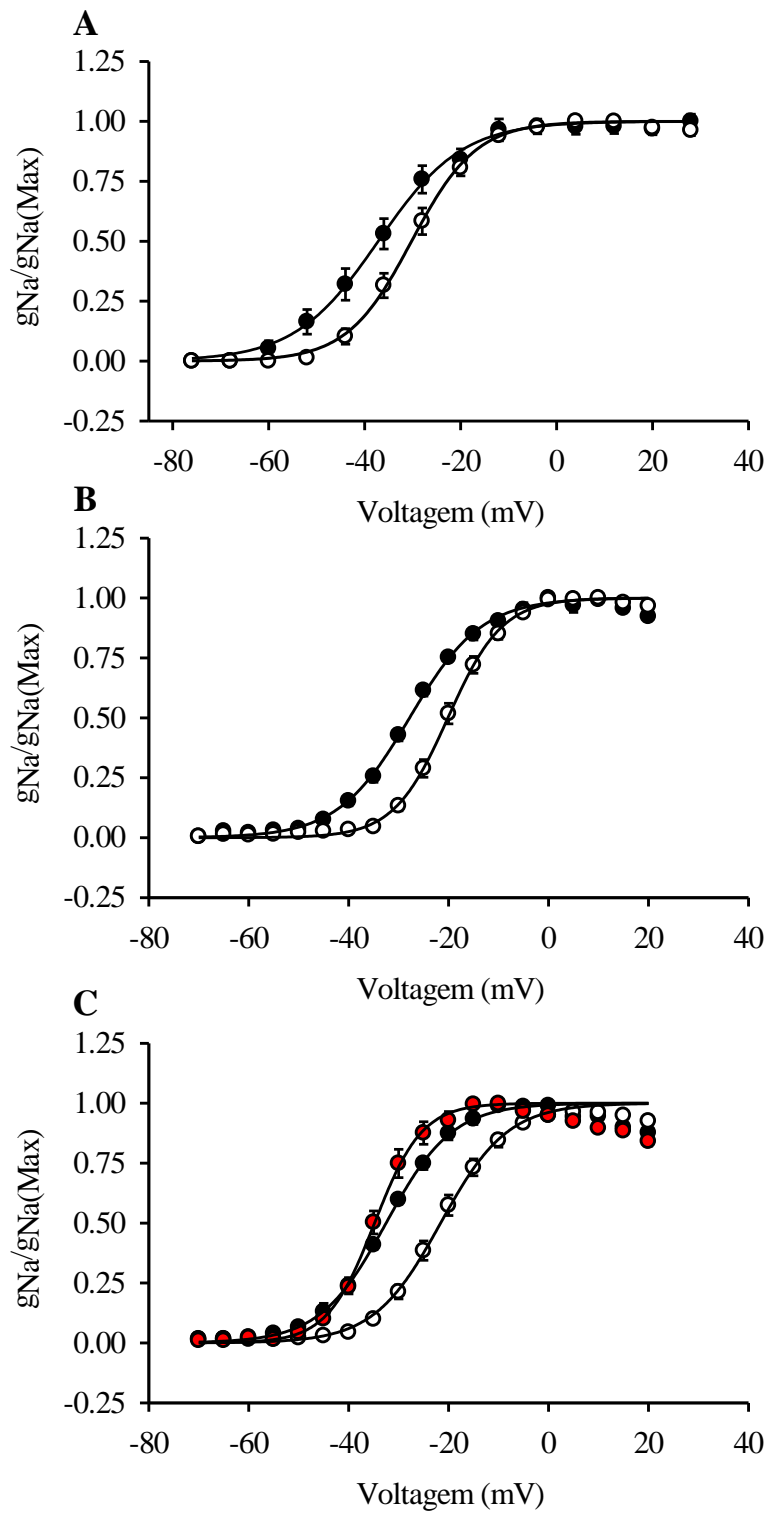


Figura 10: Curva de ativação da corrente de sódio. Para o ajuste dos pontos foi utilizada a equação 7. **A.** Experimento em músculo esquelético de rã. Os valores dos parâmetros de ajuste foram, para controle (círculos brancos, $n=12$) e PnTx2-6 $1 \mu\text{M}$ (círculos pretos, $n=7$), respectivamente: $V_g = -30,8 \pm 1,6$ e $-38,7 \pm 2,9$ mV; $k_g = 5,8 \pm 0,2$ e $7,7 \pm 0,4$ mV. **B.** Experimento em células GH3 mostrando o controle (círculos brancos, $n=12$) e PnTx2-6 100 nM (círculos pretos, $n=5$), com os seguintes valores de ajuste, respectivamente: $V_g = -19,8 \pm 0,9$ e $-27,6 \pm 0,6$ mV; $k_g = 5,3 \pm 0,2$ e $7,4 \pm 0,4$ mV. **C.** Experimento em células GH3 mostrando o controle (círculos brancos, $n=21$) e PnTx2-5 200 nM (círculos pretos, $n=4$) e lavagem (círculos vermelhos, $n=3$), com os seguintes valores de ajuste, respectivamente: $V_g = -21,3 \pm 1,1$, $-32,5 \pm 0,5$ e $-34,7 \pm 0,8$ mV; $k_g = 5,9 \pm 0,3$, $6,8 \pm 0,9$ e $4,8 \pm 0,9$ mV.

- Estado estacionário da inativação das correntes de sódio -

Como o efeito predominante das toxinas em questão é sobre a inativação dos canais de sódio, foi feita uma avaliação mais completa possível deste processo. Para isso, foi estudada a dependência de voltagem da inativação, uma vez que o processo de ativação e inativação dos canais para sódio são eventos acoplados. Como a dependência de voltagem da ativação foi deslocada para valores hiperpolarizados (figura 10), esperava-se que a dependência de voltagem da inativação também estivesse alterada. Desta forma, foi registrada a dependência voltagem da inativação em relação ao pré-pulso aplicado e está representado na figura 11, no gráfico chamado de dependência de potencial do estado estacionário da inativação ou h_{∞} . Para os menos familiarizados com a terminologia em eletrofisiologia, ‘h’ representa o processo de inativação no modelo de Hodgkin & Huxley (1952).

A distribuição dos canais de sódio nos seus diferentes estados conformacionais (aberto, fechado e inativado) depende do potencial de membrana. Potenciais despolarizantes favorecem o estado inativado, enquanto potenciais hiperpolarizantes favorecem os estados fechados, o estado aberto ocorre apenas transitoriamente. Foram aplicados pulsos despolarizantes (que ativavam a corrente máxima no controle) a partir de pré-pulsos suficientemente longos (100 ms) para permitir a redistribuição completa dos canais entre os diferentes estados conformacionais. Isto significa que após pré-pulsos hiperpolarizantes haverá uma grande corrente, refletindo a grande quantidade de canais no estado fechado e, portanto, disponíveis para serem abertos. Na medida em que o pré-potencial caminha em direção aos potenciais mais despolarizados, mais canais de sódio irão se inativar durante o pré-pulso e menos corrente será vista no pulso teste. Desta forma, a corrente gerada no pulso teste revela a quantidade de canais não inativados pelo pré-pulso, e foi normalizada pela corrente máxima para a construção dos gráficos da figura 11.

No experimento em sarcolema (figura 11A) foi aplicado o pulso despolarizante de -12 mV, e pré-pulsos que variavam de -132 a -44 mV (com incremento de 8 mV). Os pontos do gráfico foram ajustados segundo a equação de Boltzmann para a inativação (equação 8). Os parâmetros (vistos na legenda da figura 11) mostram que a PnTx2-6 desloca a curva do estado estacionário da inativação de -10 mV, na mesma direção que aquela vista nas curvas de ativação (para valores hiperpolarizados), e modificou o fator de inclinação da curva.

$$h_{\infty} = \left\{ \frac{1}{1 + \exp[(V - V_h)/k_h]} \right\} \quad (\text{equação 8})$$

Onde V é o potencial do pré-pulso, V_h é o potencial onde 50% dos canais estão inativados, k_h é o fator de inclinação da inativação.

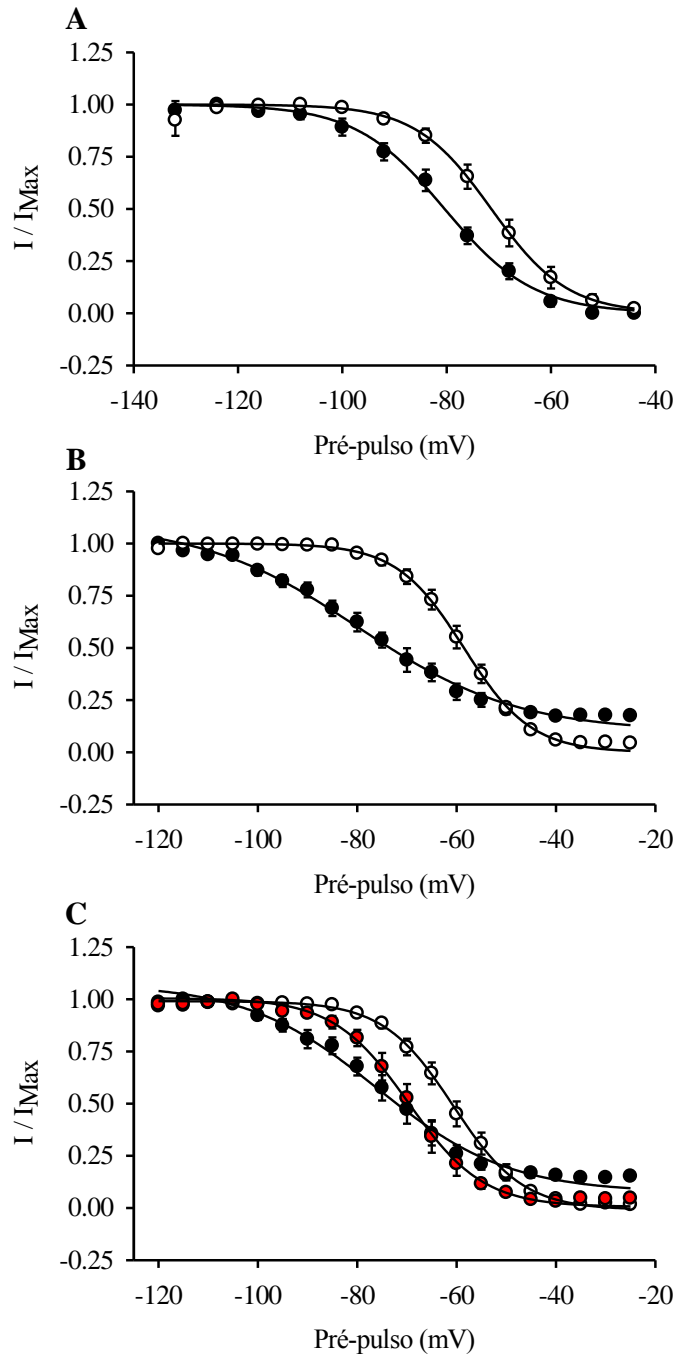


Figura 11: Estado estacionário da inativação da corrente de sódio. Os pontos foram ajustados segundo a equação 8, para os controles e na presença da PnTx2-6 em sarcolema de rã, e segundo a equação 9 para os experimentos com as toxinas em células GH3. **A.** Experimentos realizados em músculo esquelético de rã. Os valores dos parâmetros de ajuste foram, para controle (círculos brancos, n=12) e na presença de 1 μ M de PnTx2-6 (círculos pretos, n=7), respectivamente: $V_h = -72,8 \pm 2,1$ e $-82,8 \pm 2,0$ mV; $k_h = 6,7 \pm 0,2$ e $9,0 \pm 0,9$ mV. **B.** O gráfico mostra o deslocamento da dependência de voltagem da inativação da corrente de sódio no controle (círculos brancos, n=12) e na presença de 100 nM de PnTx2-6 (círculos pretos, n=5) em células GH3. Com os respectivos valores de ajuste: $V_h = -59,2 \pm 1,4$ e $-79,5 \pm 3,8$ mV; $k_h = 6,5 \pm 0,2$ e $15,8 \pm 0,7$ mV; o componente c, presente somente na presença da toxina foi de $0,092 \pm 0,017$. **C.** Dependência de voltagem da inativação da corrente de sódio no controle (círculos brancos, n=15), na presença de 200 nM de PnTx2-5 (círculos pretos, n=4) e lavagem (círculos vermelhos, n=3) em células GH3. Com os respectivos valores de ajuste: $V_h = -61,5 \pm 1,7$, $-75,5 \pm 3,0$ e $-70,3 \pm 2,2$ mV; $k_h = 5,8 \pm 0,1$, $9,5 \pm 0,1$ e $6,9 \pm 0,1$ o componente c, foi de $0,124 \pm 0,017$ na presença da PnTx2-5 e $0,029 \pm 0,004$ na lavagem.

A inativação dos canais de sódio das células GH3 não é dependente de voltagem (Cota & Armstrong, 1989), a dependência de potencial vista é proveniente do acoplamento da inativação com a ativação do canal. Nestes experimentos foram aplicados pré-pulsos, não para -100 mV como foram feitos para todos os demais protocolos descritos para as células GH3 nesta tese, mas pré-pulsos de voltagem que variaram de -120 a -25 mV (com incremento de 5 mV), seguidos de pulso despolarizante para 0 mV (por 20 ms). As figuras 11B e 11C mostram, então, a relação entre a voltagem do pré-pulso e a corrente de sódio normalizada do pulso teste na presença das toxinas PnTx2-6 e PnTx2-5. Os pontos, na presença das toxinas, foram mais bem ajustados segundo uma equação de Boltzmann modificada para a inativação:

$$h_{\infty} = \left\{ \frac{1-c}{1+\exp[(V-V_h)/kh]} \right\} + c \quad (\text{equação 9})$$

Onde c é a proporção de canais que não inativam. Como esperado, verificamos que o estado estacionário da inativação depende da voltagem do pré-pulso aplicado. Observe que as toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* deslocaram fortemente a curva para valores hiperpolarizados, como havia sido observado com a curva da condutância. Além disso, pode-se observar uma proporção significativa de canais que não se inativam, mesmo em potenciais muito despolarizados. A PnTx2-6 deslocou a curva -20,3 mV com 9,2% de canais de sódio que não inativaram. A figura 11C mostra que a PnTx2-5 deslocou a curva -14 mV e manteve uma proporção de 12,4% de canais de sódio que não inativaram (componente c). A lavagem da PnTx2-5 não remove o deslocamento da curva, porém o componente que não inativa c , bem como o fator de inclinação da curva (kh), retornam aos níveis do controle após a lavagem. Observando os parâmetros de ajuste na legenda da figura, podemos observar que o fator de inclinação da curva (kh) foi alterado em todas as condições, o que significa que os canais de sódio na presença das toxinas PnTx2-5 ou PnTx2-6 sentem menos as pequenas variações na voltagem da membrana.

- Recuperação da inativação da corrente de sódio -

Partimos, então, para a análise da recuperação da inativação dos canais de sódio. Uma recuperação da inativação apropriada permite que o impulso nervoso dispare em uma alta frequência. Como a peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* causa hiperexcitabilidade, imaginamos que este parâmetro pudesse ter sido comprometido. A recuperação da inativação mede o tempo de hiperpolarização necessário para os canais de sódio transitar do estado inativado para o estado fechado. Foram aplicados 2 pulsos despolarizantes com intervalo hiperpolarizante de tempo variável entre eles, o 2º pulso foi normalizado em relação à corrente máxima e está sendo mostrado na figura 12. Nos experimentos em músculo esquelético (figura 12A) o 1º pulso despolarizante foi

de -44 mV por 100 ms (tempo suficiente longo para inativar os canais de sódio), seguido de um pulso hiperpolarizante de -124 mV com intervalo de tempo que variou de 0,5 a 7 ms (com incrementos de 0,5 ms) e finalmente, outro pulso despolarizante de -12 mV por 7 ms onde foram obtidos os registros. A equação 10 foi usada para ajustar os pontos:

$$f(x) = 1 - \exp(-T/\tau_r) \quad (\text{equação 10})$$

Onde T é o tempo de hiperpolarização e τ_r é a constante de tempo da recuperação da inativação. O parâmetro τ_r informa sobre a constante de tempo de saída do estado inativado, e não foi estatisticamente diferentes no controle ou na presença da PnTx2-6 em músculo esquelético de rã.

Nos experimentos com GH3 (figura 12B e 12C) foram gerados 2 pulsos despolarizantes para 0 mV com duração de 20 ms e intervalo de tempo variável entre eles (de 0,5 a 20 ms a cada 0,5 ms). Os pontos foram mais bem ajustados segundo uma equação com duas exponenciais (equação 11):

$$f(x) = a \cdot \exp(-T/\tau_1) + b \cdot \exp(-T/\tau_2) \quad (\text{equação 11})$$

Onde os parâmetros (τ_1 e τ_2) sendo mostrado na legenda da figura e representa as constantes de tempo de saída dos canais de sódio do estado inativado e as respectivas proporções de canais que transitam com cada uma destas taxas (a e b), T é o tempo de hiperpolarização.

A parte B da figura 12 mostra a recuperação dos canais de sódio na presença de 500 nM da toxina PnTx2-6. Observe que a recuperação em intervalos inferiores a 5 ms é mais rápida na presença da PnTx2-6 do que no controle. Isto significa que a toxina facilita a transição do canal de sódio do estado inativado para o estado fechado. A análise estatística mostrou que a proporção de cada componente, a e b, da exponencial não foi diferente, mas as constantes de tempo de cada um dos componentes (τ_1 e τ_2) foram. Observe também que no controle há aproximadamente 10% de canais disponíveis após 0,5 ms de pulso hiperpolarizante, enquanto que na presença da PnTx2-6 há quase 35% de canais disponíveis, o que reflete, em parte, a proporção de canais que não inativaram. Na presença de 200 nM de PnTx2-5 (figura 12C) não houve mudança significativa nos valores das 2 constantes de tempo, nem da contribuição de cada uma delas. Observe que a constante de tempo lenta foi aproximadamente 6 vezes o valor da constante de tempo rápida, mas a contribuição da mesma foi de 2 a 3 vezes menor que a contribuição da constante rápida.

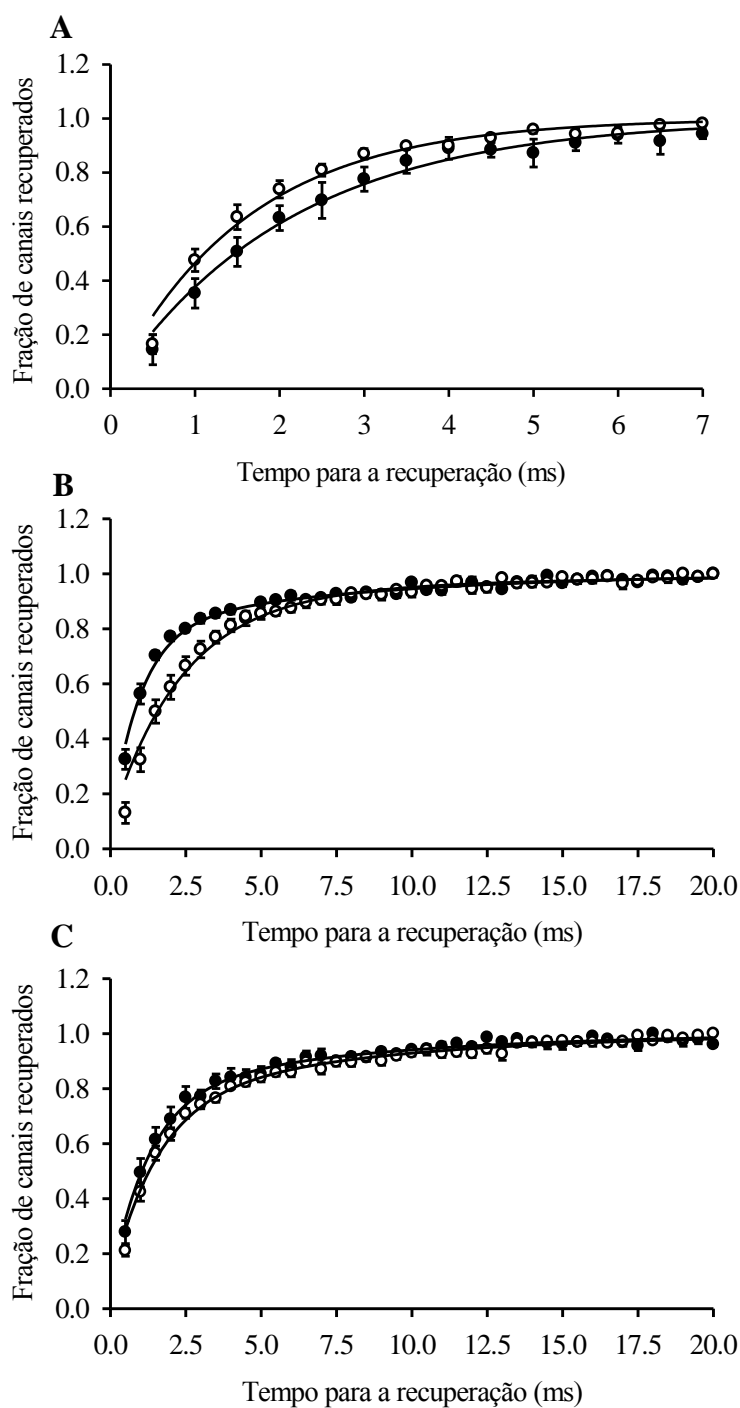


Figura 12: Recuperação da corrente de sódio. **A.** Experimentos em músculo esquelético de rã no controle (círculos brancos, $n=11$) e na presença de $1 \mu\text{M}$ de PnTx2-6 (círculos pretos, $n=7$). A equação 10 foi usada para o ajuste dos pontos, com as seguintes constantes de tempo: controle = $1,60 \pm 0,14$ ms e PnTx2-6 = $2,14 \pm 0,23$ ms. Os gráficos B e C mostram a recuperação da corrente de sódio em células GH3. Os pontos foram ajustados com a equação 12. **B.** Símbolos brancos representam controle ($n=6$), e pretos, na presença de 500 nM de PnTx2-6 ($n=5$). Os valores de ajuste foram, respectivamente: $a = 0,84 \pm 0,04$ e $0,79 \pm 0,02$; $b = 0,16 \pm 0,04$ e $0,21 \pm 0,02$; $\tau_1 = 1,99 \pm 0,24$ e $0,91 \pm 0,07$ ms; $\tau_2 = 4,37 \pm 1,09$ e $10,65 \pm 0,77$ ms. **C.** Círculos brancos representam o controle ($n=8$) e pretos, PnTx2-5 200 nM ($n=7$), com os respectivos valores de ajuste: $a = 0,69 \pm 0,05$ e $0,72 \pm 0,02$; $b = 0,34 \pm 0,06$ e $0,28 \pm 0,02$; $\tau_1 = 1,51 \pm 0,35$ e $1,27 \pm 0,15$ ms; $\tau_2 = 8,17 \pm 1,55$ e $6,46 \pm 0,99$ ms.

- Análise da cinética de inativação -

Vimos que todos os parâmetros referentes à de inativação analisados até o momento foram modificados pela PnTx2-6 nas células GH3, mas nem todos foram modificados pela PnTx2-5 em células GH3 ou pela PnTx2-6 em células musculares esqueléticas. Resolvemos analisar, então, a cinética de inativação dos canais de sódio. A diferença cinética de inativação na presença de ambas as toxinas em relação ao controle é indiscutível pela análise dos registros (figura 7), mas para quantificar tal efeito ajustamos o decaimento da corrente de sódio com uma equação exponencial simples (equação 12), ou com o somatório de duas equações exponenciais (equação 13), em diferentes potenciais nos experimentos no músculo de rã, e no potencial de membrana de 0 mV para os experimentos com GH3:

$$f(x) = a \cdot \exp(-T/\tau_1) + c \quad (\text{equação 12})$$

$$f(x) = a \cdot \exp(-T/\tau_1) + [b \cdot \exp(-T/\tau_2) + c] \quad (\text{equação 13})$$

Onde a e b são fatores de amplitude das constantes de tempo rápida (τ_1) e lenta (τ_2) do decaimento da corrente de sódio; T é o tempo a partir do pico da corrente de sódio; e c , o componente persistente da corrente de sódio.

Durante a inativação, a corrente de sódio controle decai com apenas 1 componente exponencial rápido em todas as situações analisadas. Na figura 13A podemos observar que (em músculo esquelético de rã) no controle ou na presença da PnTx2-6 há um componente exponencial rápido que varia com o potencial da membrana, tornando-se mais rápido com a despolarização (veja o inserto da figura). Este componente rápido não foi diferente no controle ou na presença da toxina. Porém, é claro o aparecimento de um componente lento na presença da PnTx2-6. No potencial de pico (-13 mV) as correntes do controle decaíram com a constante de tempo de $0,79 \pm 0,10$ ms, enquanto que na presença de 1 mM de PnTx2-6 o decaimento foi de $0,69 \pm 0,08$ ms para o componente rápido e $9,8 \pm 4,2$ ms para o componente lento.

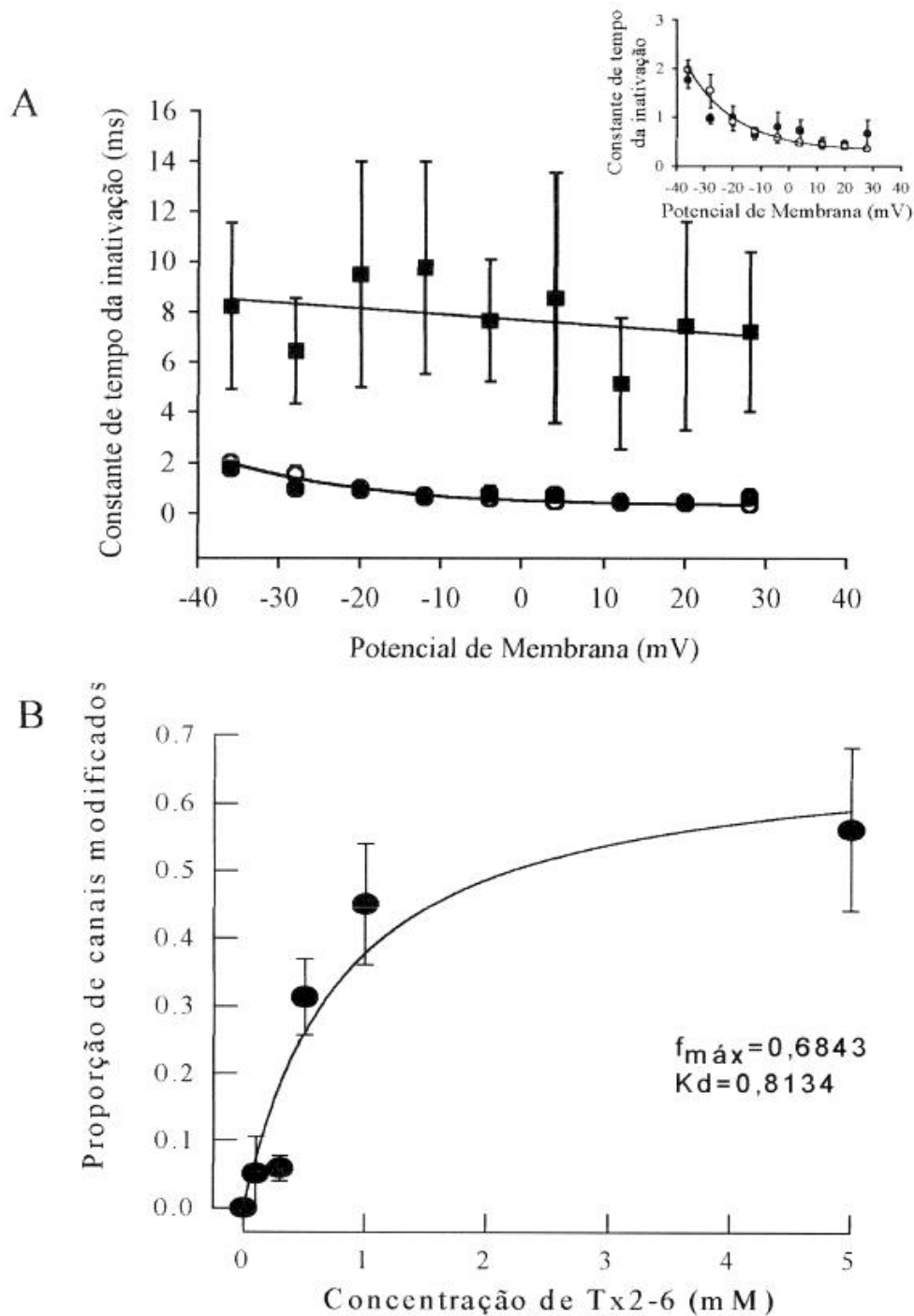


Figura 13: A. Variação da constante de tempo com o potencial da membrana na ausência (círculos brancos) e presença (símbolos pretos) de 1 μ M de PnTx2-6 em músculo esquelético de rã. Os círculos representam a constante de tempo rápida, e os quadrados, a constante de tempo lenta. O inserto da figura mostra, em maior escala, a constante de tempo rápida da corrente de sódio. B. Curva dose-resposta da corrente da Na^+ . Usando diferentes concentrações de toxina na pipeta: 100 nM, 300 nM, 500 nM, 1 μ M e 5 μ M, a corrente registrada no potencial de -14 mV (pico da corrente) era ajustada a uma (controle) ou duas exponenciais (toxina), utilizando as equações 12 e 13. A proporção de canais modificados em relação ao número total de canais varia com a concentração com um $K_{0,5}$ (concentração que modifica metade dos canais) de 0,81 μ M e uma proporção máxima de 0,68.

- Relação concentração x modificação

É razoável pensar que as constantes de tempo rápidas e lentas refletem proporções de canais modificados e não modificados pela toxina, respectivamente. Assim, a proporção dos fatores de amplitude a e b das constantes de tempo rápida (τ_1) e lenta (τ_2) do decaimento da corrente de sódio devem variar com a concentração da toxina. Podemos estimar a proporção de canais modificados calculando a contribuição do componente exponencial lento em relação ao somatório das contribuições dos fatores de amplitude a e b , como mostrado na equação 14:

$$\text{Contribuição de } b = b / (a + b) \quad (\text{equação 14})$$

Podemos, então, construir uma curva dose-resposta, como está sendo mostrada na figura 13B para a modificação do músculo esquelético de rã pela PnTx2-6. Os pontos foram ajustados com a equação da hipérbole quadrada:

$$f(x) = p_{\text{máx}} * [\text{toxina}] / (K_{0,5} + [\text{toxina}]) \quad (\text{equação 15})$$

Onde $p_{\text{máx}}$ é a proporção máxima de canais modificados na saturação e $K_{0,5}$ é a concentração da toxina que produz metade do efeito máximo. O ajuste do experimento com a PnTx2-6 em músculo esquelético de rã produziu um $p_{\text{máx}}$, de 0,68 e um $K_{0,5}$ de 0,81 μM (figura 13B).

As correntes de sódio sensíveis à voltagem das células GH3, nas condições experimentais deste trabalho, decaem mais rápido, com a constante de tempo média de $390 \pm 23 \mu\text{s}$, calculado a partir do ajuste da equação 12. A análise do decaimento exponencial das correntes de sódio na presença da toxina PnTx2-6 nestas células mostrou que estes se ajustavam melhor com 2 componentes exponenciais. Porém, não houve apenas o adicionamento de um componente lento, como aconteceu em músculo esquelético, uma vez que a constante de tempo rápida ficou significativamente mais lenta na presença da PnTx2-6, como pode ser visto na tabela abaixo:

Tabela 3: Constantes de tempo da inativação da corrente de sódio no controle e na presença da PnTx2-6 em células GH3.

Condição	τ_f (rápido)	τ_s (lento)
Controle (n=10)	$0,39 \pm 0,23 \text{ ms}$	Não tem
PnTx2-6 10 nM (n=4)	$0,61 \pm 0,04 \text{ ms}$	$4,50 \pm 1,19 \text{ ms}$
PnTx2-6 50 nM (n=5)	$0,79 \pm 0,09 \text{ ms}$	$3,52 \pm 0,38 \text{ ms}$
PnTx2-6 100 nM (n=5)	$1,21 \pm 0,15 \text{ ms}$	$6,31 \pm 0,83 \text{ ms}$
PnTx2-6 300 nM (n=3)	$1,09 \pm 0,14 \text{ ms}$	$5,63 \pm 0,75 \text{ ms}$

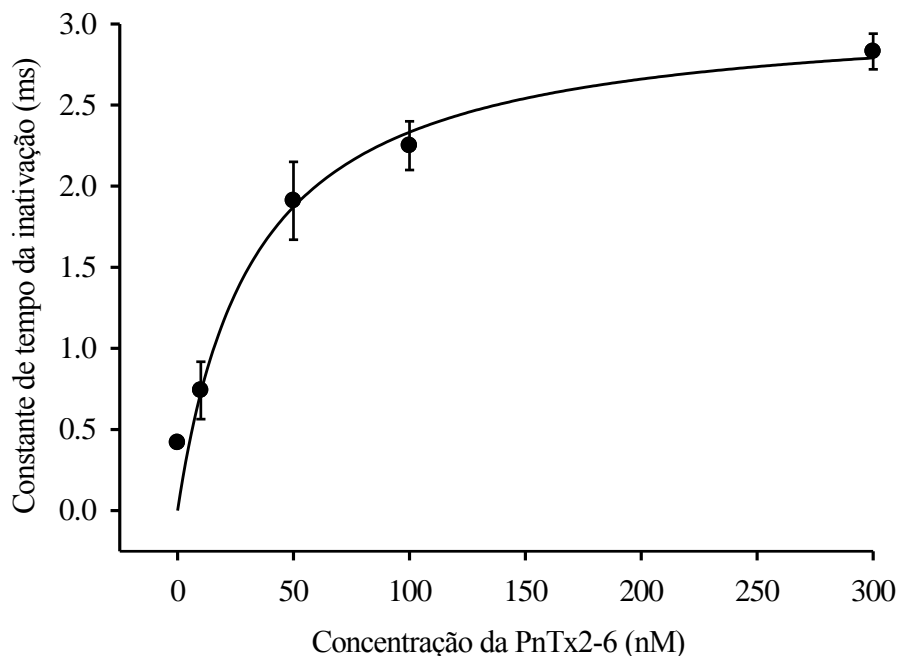


Figura 14: Curva dose-resposta da PnTx2-6 em células GH3. Os registros em 0 mV foram ajustados com uma função monoexponencial (equação 12) e a constante de tempo da inativação está sendo representada em relação à concentração. O ajuste dos pontos mostra que a constante de tempo máxima (τ máximo) para a PnTx2-6 em células GH3 é de 3,1 ms e a concentração que modifica 50% dos canais de sódio é 32,6 nM.

Por não haver um componente constante nestes dados, não poderíamos relacionar as contribuições dos fatores de amplitude a e b para fazer o gráfico dose-resposta para a PnTx2-6, como fizemos em músculo esquelético, além disso, τ_f , mas a estimativa deste parâmetro é muito susceptível a variações, porque é realizada juntamente com a estimativa de outros 3 parâmetros interdependentes. Então nós propusemos o seguinte: se ajustarmos o decaimento da corrente de sódio com um único componente exponencial, então o ajuste tenderá a ficar o mais próximo do componente de maior contribuição, mas não desprezará o componente de menor contribuição. Embora não tenha um significado físico, este parâmetro é mais robusto. Refizemos os ajustes e conseguimos uma relação consistente entre a concentração e a constante de tempo de inativação. O gráfico está sendo mostrado na figura 14. O ajuste dos pontos foi feito segundo a equação 15, porém o termo $p_{\text{máximo}}$ foi substituído por $\tau_{\text{máximo}}$, e foram encontrados os seguintes valores: $K_{0,5} = 32,6$ nM e $\tau_{\text{máximo}} = 3,1$ ms. Podemos observar que os canais de sódio das células GH3 são, aproximadamente, 25 vezes mais sensíveis à modificação pela PnTx2-6 que os canais de sódio de músculo esquelético de rã.

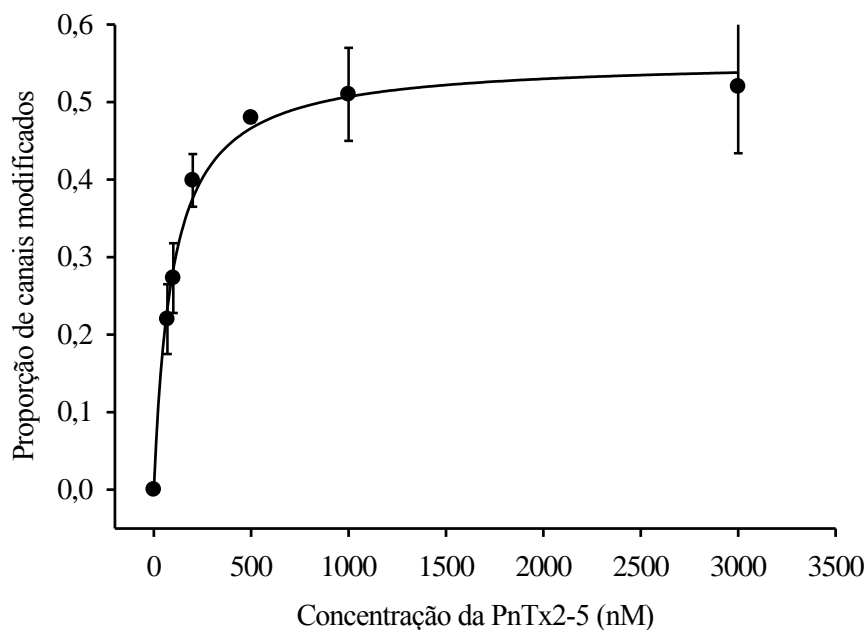


Figura 15: Curva dose-resposta da PnTx2-5 em células GH3. Utilizando diferentes concentrações de toxina na perfusão, a corrente foi registrada no potencial de 0 mV e ajustada com uma (controle) ou duas equações exponenciais, utilizando as equações 12 ou 13, respectivamente. A proporção de canais de sódio modificados pela PnTx2-5 varia com a concentração, com uma proporção máxima de canais modificados ($p_{\text{máximo}}$) de 0,6 e um $K_{0,5}$ de 95,2 nM.

Na presença da PnTx2-5, o componente rápido não modificou estatisticamente do controle ($346 \pm 15 \mu\text{s}$ na concentração de 200 nM), porém houve o aparecimento de um componente cinético mais lento de $2,99 \pm 0,14 \text{ ms}$ (na referida concentração). O componente rápido não foi modificado em nenhuma das concentrações utilizadas, isto sugere que, como foi visto com a PnTx2-6 em sarcolema, uma parcela dos canais não é modificada pela PnTx2-5, passando a parcela modificada a apresentar uma transição para o estado inativado com velocidade significativamente menor. Pudemos usar a mesma estratégia utilizada no experimento com a PnTx2-6 em músculo esquelético, para estimarmos a proporção de canais modificados pela PnTx2-5. A figura 15 mostra a curva dose-resposta deste experimento, com $p_{\text{máximo}}$ de 0,56 e $K_{0,5}$ de 95,3 nM. Desta forma, os gráficos apresentados neste trabalho, onde a concentração da toxina foi de 200 nM, representa aproximadamente 2 vezes o valor do $K_{0,5}$ para a PnTx2-5.

- Tempo para o pico da corrente de sódio -

A abertura dos canais de sódio é muito dependente de potencial. Pulsos de voltagem mais positivos aumentam a probabilidade dos canais de sódio transitarem pelo estado aberto e se

inativarem. Quanto mais positivo o pulso de voltagem, maior a probabilidade do canal de abrir logo no início do pulso, e é isto que faz com que a corrente de sódio seja rápida e seja finalizada pelo processo de inativação, mesmo que a despolarização persista. Questionamos-nos se este decaimento mais lento da corrente poderia acarretar uma abertura descoordenada dos canais de sódio ao longo do pulso teste. Analisamos, então, o tempo necessário para se atingir o pico da corrente de sódio na relação corrente x voltagem, o que é mostrado na figura 16. Os experimentos com a PnTx2-6 em músculo esquelético são mostrados na parte A da figura e não apresentaram diferença no controle ou na presença da toxina. A parte B da figura 16 mostra a relação entre o potencial de membrana e o tempo para o pico na presença e na ausência da PnTx2-6 100 nM em células GH3. Na presença da PnTx2-6 o tempo para o pico da corrente de sódio é mais rápido em potenciais mais negativos e vai ficando mais lento que no controle em valores positivos do potencial de membrana. Se consideramos o deslocamento da ativação da corrente de sódio que, para a PnTx2-6, foi de $-7,8$ mV, então haverá uma tendência da toxina apresentar um tempo maior para o pico da corrente de sódio em todos os potenciais observados, como pode ser visto no inserto da figura 16B, no qual foi somado $7,8$ mV ao potencial na presença da toxina para evidenciar a diferença da condição controle. Se observarmos cuidadosamente a parte B da figura 7, poderemos notar que a comparação dos registros sugere esta afirmação.

Na figura 16C são mostrados resultados obtidos no controle, na presença da PnTx2-5 e após a lavagem, em células GH3. Os círculos brancos representam o controle, onde podemos perceber que a velocidade com que a corrente de sódio atinge o seu valor máximo acelera com a despolarização, atingindo um valor máximo. Podemos notar que, em potenciais mais negativos que 0 mV, o tempo para o pico é maior na condição controle, e não foi revertido pela lavagem. Novamente, este efeito pode ser reflexo do deslocamento de $11,2$ mV da corrente de sódio para potenciais mais negativos, por esta razão, deslocamos o tempo para o pico na presença da toxina e lavagem $+11,2$ mV e refizemos o gráfico, que está sendo mostrado no inserto da figura 16C. Os pontos agora sobrepostos mostram que a diferença vista realmente refletia o deslocamento para valores negativos da corrente de sódio.

Desta forma, a PnTx2-6, diferentemente da PnTx2-5, aumenta o tempo para a corrente de sódio atingir seu pico no momento da ativação da corrente em células GH3.

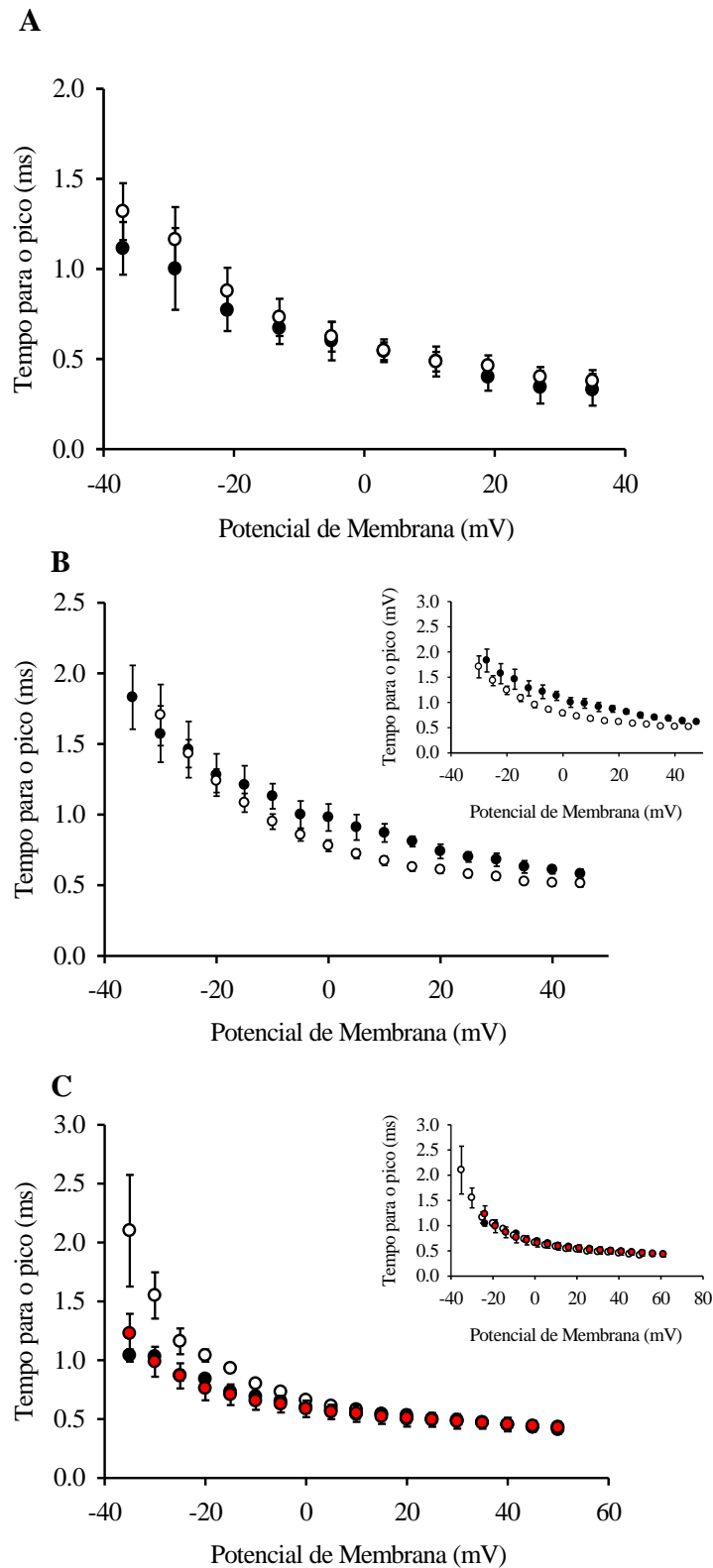


Figura 16: Relação entre a voltagem da membrana e o tempo para o pico da corrente de sódio. **A.** Na presença da PnTx2-6 1 μ M (círculos pretos, n=7) e controle (círculos brancos, n=12). **B.** Na presença da PnTx2-6 100 nM (círculos pretos, n=5) em células GH3 e controle (círculos brancos, n=11). **C.** Na presença da PnTx2-5 200 nM (círculos pretos, n=4), no controle (círculos brancos, n=4) e após a lavagem da toxina (círculos vermelhos, n=3). Os insertos dos gráficos mostram o tempo para o pico corrigindo o deslocamento da curva de ativação de -7,8 mV para a PnTx2-6 e de -11,2 para a PnTx2-5 e sua lavagem.

- Deslocamento das toxinas de seus sítios ativo -

Como vimos na figura 7C, a lavagem da PnTx2-5 remove o efeito tipo α desta toxina, porém, não foi vista a lavagem com PnTx2-6 em células GH3. Imaginamos que o tempo de lavagem do experimento não tivesse sido suficiente para remover a toxina do seu sítio ativo. Para descartarmos esta hipótese fizemos o experimento que está sendo mostrado na figura 17A, que representa a variação da constante de tempo (τ) da inativação ao longo do tempo de adição da PnTx2-6 1 μ M e após a lavagem. Foram feitas despolarizações para 0 mV com duração de 20 ms a intervalos de 2 segundos. Antes da adição da toxina foi aplicada a perfusão controle, que era a mesma solução da perfusão lavagem. Pode-se observar que a toxina não foi removida do seu sítio ativo mesmo após 10 minutos de lavagem.

Campos (2002) mostrou que a dissociação da toxina do escorpião *Tityus serrulatus*, a tityustoxina, é dependente de potencial. Decidimos então usar a mesma estratégia descrita por Campos para tentar dissociar a PnTx2-6 de seu sítio de ligação. Foram dados sequencias de pulsos como o mostrado no protocolo da parte B da figura 17: a partir de um pré-pulso hiperpolarizante de -100 mV por 100 ms foi dado o pulso teste para 0 mV por 20 ms e seguido de um forte pulso despolarizante de +180 mV por 20 ms, que segundo Campos (2002), são tempo e voltagem suficientes para deslocar a tityustoxina em apenas 2 pulsos. Medimos, então, a constante de tempo da inativação ao longo de uma sequencia de pulsos despolarizantes. A perfusão controle (sem toxina) ligada aproximadamente 20 segundos antes do início da sequencia de pulsos. O gráfico da figura 17C mostra que a toxina PnTx2-6 300 nM não é deslocada do sítio ativo mesmo após 40 pulsos despolarizantes.

Um protocolo semelhante, porém com despolarizações para +160 mV por 25 ms foi aplicado à PnTx2-5 e foi capaz de deslocar esta toxina de seu sítio ativo em 7 pulsos despolarizantes (como pode ser visto na figura 18), que foi consideravelmente mais rápido que a lavagem sozinha. Assim, podemos notar que, mesmo com pouca diferença na sequencia de aminoácidos, as toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* PnTx2-5 e PnTx2-6 possuem consideráveis diferenças nas suas propriedades de ligação sobre os canais de sódio de células GH3.

Os efeitos observados para a PnTx2-5 e PnTx2-6 têm semelhança com efeitos de toxinas escorpiônicas tipo α (inibição da velocidade de inativação e deslocamento por despolarizações fortes, no caso da PnTx2-5) e tipo β (deslocamento da dependência de potencial da ativação e da inativação para valores mais negativos e diminuição da amplitude máxima da corrente, no caso de canais de sódio de músculo esquelético).

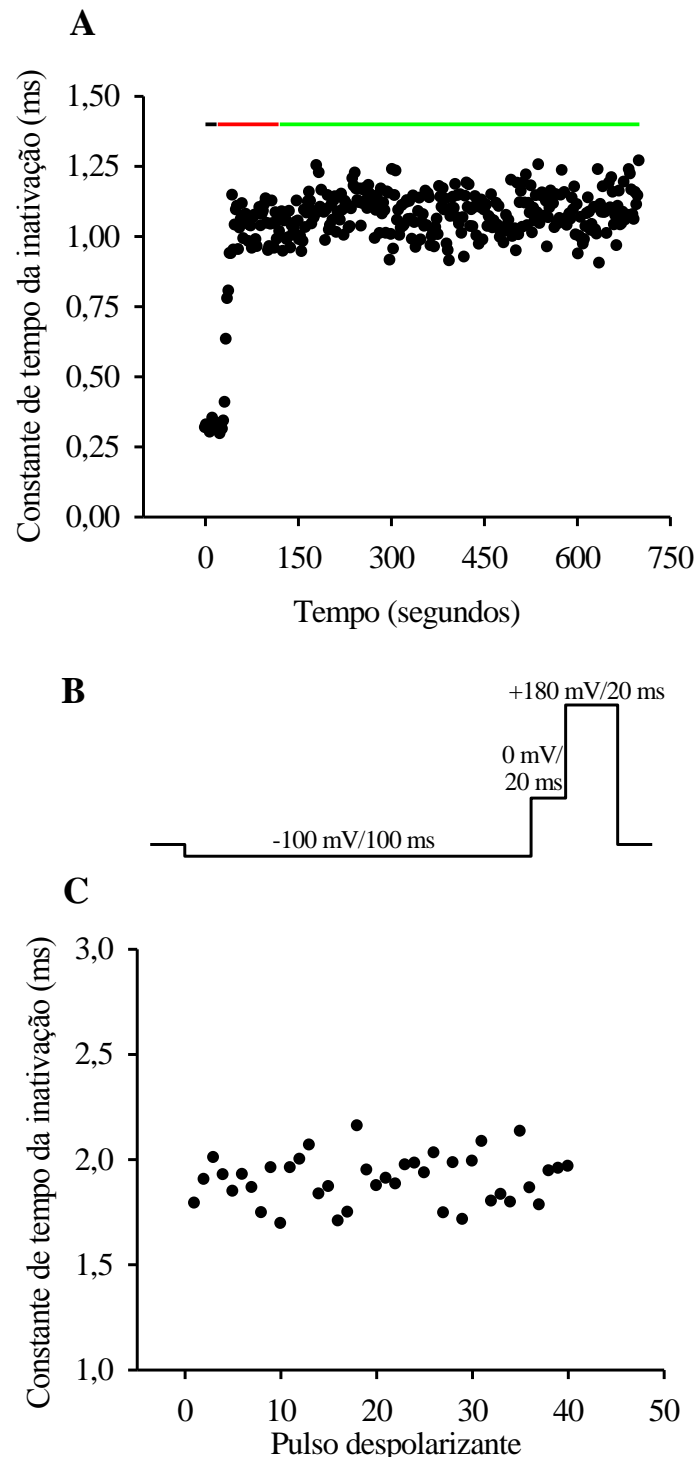


Figura 17: Dissociação da PnTx2-6 por voltagem. A. Curso temporal da constante de tempo da ligação da PnTx2-6 1 μ M em células GH3. O traço preto representa perfusão controle, o vermelho corresponde à adição da toxina e o verde corresponde à lavagem. B: Protocolo dos experimentos de dissociação da PnTx2-6 200 nM por forte despolarização mostrado na parte C. Foram aplicados 40 vezes o protocolo da parte B da figura (com a perfusão controle ligada durante todo o tempo) em células GH3 que foram modificadas pela PnTx2-6. O protocolo não foi capaz de deslocar a toxina do seu sítio ativo.

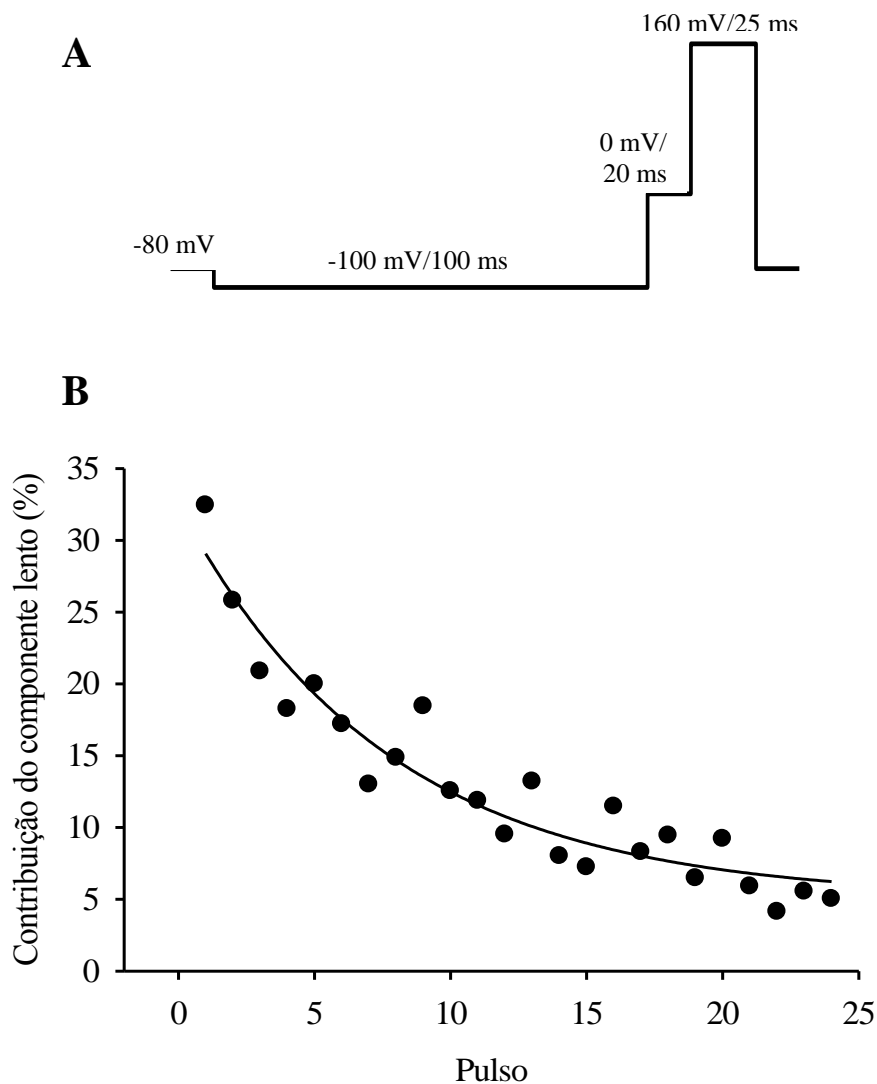


Figura 18: Dissociação da PnTx2-5 por despolarizações voltagem. **A.** Protocolo de pulsos despolarizantes, saindo de um potencial de *holding* de -80 mV, seguida de uma hiperpolarização para -100 mV por 100 ms, e dois pulsos despolarizantes: um para 0 mV por 20 ms, no qual as correntes foram medidas, e outro para +160 mV por 25 ms, para deslocar a toxina do seu sítio ativo. **B.** Curso temporal da contribuição do componente lento para a repolarização da corrente de sódio.

- Experimentos de ligação e novos experimentos controle -

O deslocamento para valores negativos vistos nas curvas de ativação e inativação após a adição da PnTx2-5 e da PnTx2-6 foi visto em todas as preparações feitas como descrito nas figuras 10 e 11. Este é um efeito típico das toxinas do tipo β de escorpião. O curioso, porém, é a não reversão destes efeitos após a lavagem, já que o efeito tipo α típico (cinética de inativação mais lenta) é reversível. Isto sugere duas hipóteses:

1. há dois sítios receptores para as toxinas da *Phoneutria* de diferentes afinidades e provocando diferentes efeitos, nos canais de sódio;
2. o deslocamento visto é devido a outros fatores, não à presença da toxina.

Para testarmos a hipótese 1, foram feitos estudos de competição, com toxinas do tipo α e β típicas, marcadas com I^{125} e a PnTx2-6. Esta toxina foi escolhida para os experimentos por ser a que possuíamos maior quantidade de material e a toxina com maior afinidade pelo canal de sódio. Os experimentos de competição, com toxinas CssIV, do escorpião *Centruroides suffusus suffusus*, uma toxina tipo β típica (Cestèle et al., 2001) foram feitos em sinaptosomas cérebro-corticais de rato, e mostraram que não houve competição entre estas duas toxinas (figuras 19A). A atividade específica da CssIV foi de $64 \pm 9,5\%$ ($n=2$). Competimos, então, a PnTx2-6 (em concentrações que variam de 100 pM a 1 μ M) com a AaHII 100 pM radioiodada (uma toxina tipo α do escorpião *Androctonus australis hector*) em fração P2 de cérebro de rato (à fresco), e construímos o gráfico da figura 19B, representativo de 2 experimentos. Podemos notar que a PnTx2-6 desloca, no máximo, 31% da AaHII e a concentração para deslocar a metade deste valor é de 2 nM. Concluimos assim que a PnTx2-6 não se liga no sítio 4 na superfície dos canais e é provável que sua ligação no sítio 3 não envolve, pelo menos não integralmente, os mesmos aminoácidos que participam da ligação da AaHII.

A hipótese 2 era sugerida pela observação de que as correntes passavam a ser ativadas em potenciais mais negativos após algum tempo de *whole-cell* em células GH3. Há também um relato na literatura mostrando este fenômeno (Fernandez et al., 1984). Para confirmarmos tais dados de forma sistematizada, partimos para novos experimentos controle, onde foi disparado um cronômetro imediatamente após o rompimento da membrana citoplasmática e formação do *whole-cell* e foram feitos registros de protocolos IxV e h_{∞} a cada 5 minutos, a partir do tempo 0. O tempo 0 é virtual, já que após o rompimento da membrana eram necessários alguns segundos para fazer as compensações da capacitância (entre 10 e 24 pF) e da resistência de acesso (no máximo 5 M Ω), que foram monitorados durante todo o experimento. Desta forma, os registros foram iniciados aproximadamente entre 20 e 45 segundos após o estabelecimento da condição *whole-cell*. Na condição controle, sem perfusão, foi feito registros nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 para verificar somente o efeito do *whole-cell* sobre a corrente de sódio. Foram feitos experimentos de perfusão controle (nestes experimentos consideramos perfusão controle aquela feita com a mesma solução que banhava as células, ou solução externa) e, quando 0,1% de albumina foi adicionada a esta solução, está sendo referida como “perfusão de albumina”. Note-se que esta solução corresponde à solução controle nos experimentos com as toxinas. Foram feitos registros em 5, 10, 15 e 20 minutos de *whole-cell*. A perfusão era ligada após 3 minutos de estabelecimento do *whole-cell*, sendo que o tempo de perfusão propriamente dito, foi: 2, 7, 12 e 17 minutos.

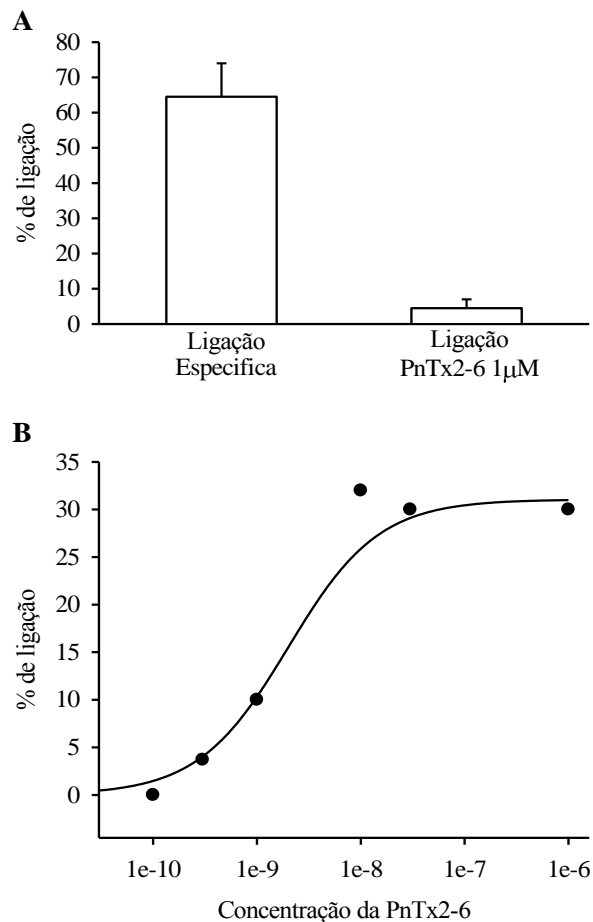


Figura 19: Experimentos de competição da PnTx2-6 com típicas toxinas α e β . **A.** Competição da PnTx2-6 1 μ M com a C α ssIV 100 pM marcada radioativamente (direita) e da toxina C α ssIV 100 nM não marcada e C α ssIV 100 pM marcada radioativamente (esquerda). Os dados representam a média de 2 experimentos. **B.** Competição da AaHII 100 pM radioiodada e diferentes concentrações da PnTx2-6. Dado representativo de 2 experimentos.

A figura 20A mostra a média dos valores de potencial que ativa a metade dos canais de sódio (V_g) nos diferentes tempos e condições experimentais. Observe que há um deslocamento espontâneo com o decorrer do tempo de experimento, e que este deslocamento é mais acentuado na perfusão albumina (visto pela inclinação mais acentuada da curva). O mesmo acontece com o potencial que inativa a metade dos canais de sódio (V_h , figura 20B), porém, a situação sem perfusão parece não ter tido um deslocamento linear como na ativação. Nas situações onde a perfusão foi ligada, o deslocamento do V_h , foi mais linear, semelhante aquele visto no V_g . As inclinações das curvas de V_g e V_h foram semelhantes na presença da perfusão controle, mas foi menor no gráfico do V_h que no gráfico V_g na presença da perfusão albumina. Podemos notar, então, que há um deslocamento espontâneo das curvas de ativação e de inativação da corrente de sódio, que confirma os dados de Fernandez e colaboradores (1984). Os valores dos parâmetros de ajuste estão sendo mostrados na tabela 4. Desta forma, os deslocamentos vistos na presença das

toxinas da aranha em células GH3 podem não ser um efeito da própria toxina, mas um efeito do tempo de experimento.

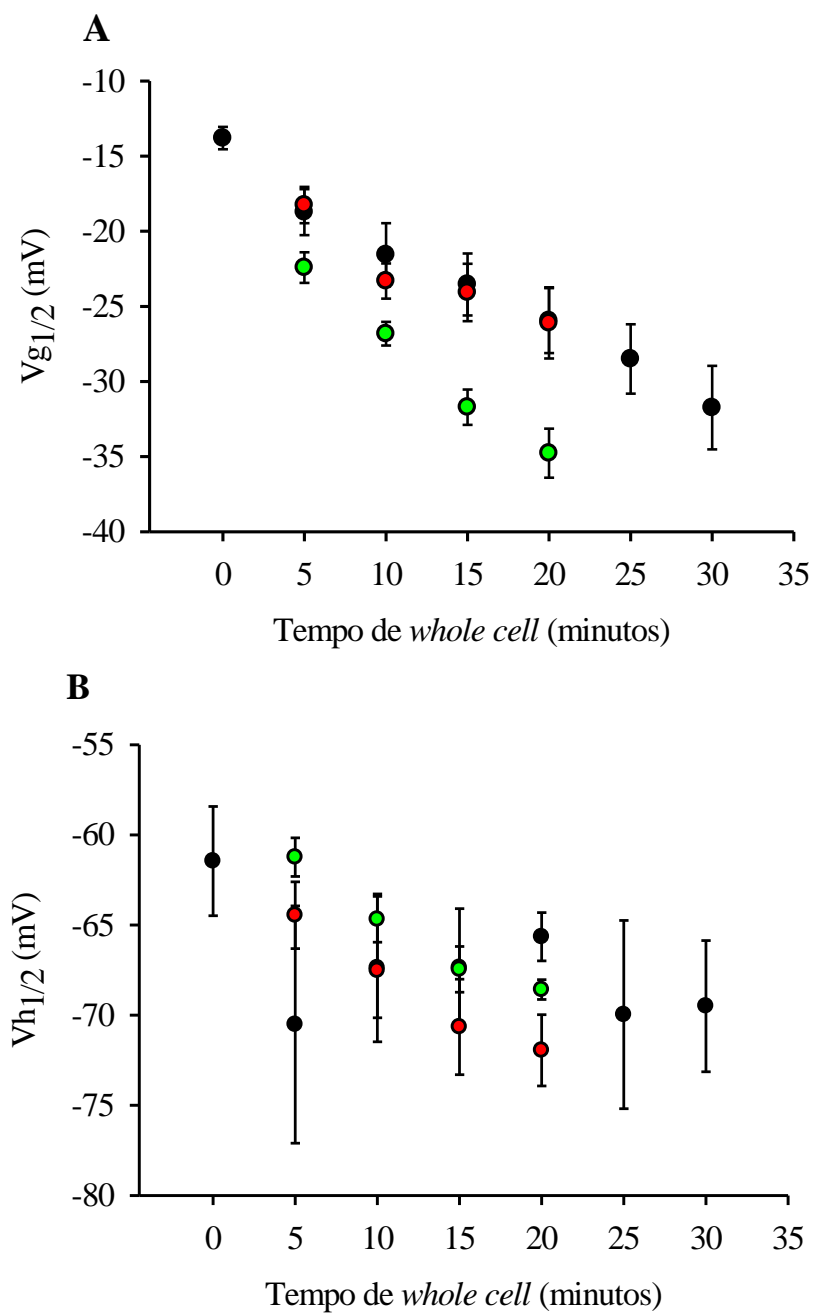


Figura 20: V_g e V_h dos experimentos controle. Efeito do tempo de experimento sobre o deslocamento da voltagem que produz 50% da ativação (V_g , **A**) ou inativação (V_h , **B**) do canal de sódio de células GH3. Círculos pretos representam o controle; vermelhos, perfusão controle e verde, perfusão albumina. Os parâmetros de ajuste estão sendo mostrados na tabela 4 para melhor visualização.

- Coeficiente de extinção e análise da estrutura secundária -

As toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* PnTx2-5 e PnTx2-6 são peptídeos pequenos, com 48 resíduos de aminoácidos cada, sendo 10 cisteínas que formam 5 pontes dissulfeto, formando uma estrutura compacta. Devido a baixa similaridade na seqüência de aminoácidos com outras toxinas do banco de dados (BLAST) que tenha sua estrutura tridimensional conhecida, nenhuma inferência pode ser feita à estrutura secundária ou terciária destas toxinas. Começamos então um trabalho estrutural com a PnTx2-6, cujo o primeiro passo foi a determinação do coeficiente de extinção (ϵ), que não era conhecido até o presente trabalho. Diluímos uma alíquota uma alíquota da PnTx2-6 (0,03 $\mu\text{g/ml}$) em condições desnaturantes, para uma solução final de 20 mM de tampão fosfato pH 6,5 e 6 M de cloreto de guanidina. O cálculo do coeficiente de extinção a 280 nm baseou-se na quantidade de triptofanos, tirosinas e cisteínas, com diferentes contribuições, como pode ser visto na equação 2. A medida da absorbância a 280 nm de PnTx2-6 gerou o seguinte valor de ϵ nestas condições:

$$\epsilon_{280} (\text{PnTx2-6}) = 2 \times 5690 + 2 \times 1280 + 10 \times 125 = \mathbf{15190}$$

O cálculo da concentração da PnTx2-6 em condições desnaturantes pode, então, ser feito através da equação 3 que foi de:

$$C = \frac{0,1615}{15190 \times 1} = \mathbf{1,06 \times 10^{-5} \text{ M}}$$

Diluímos uma outra alíquota (mas a mesma quantidade) da PnTx2-6 em água para a mesma concentração final da toxina que aquela em condições desnaturantes. Fizemos a leitura a 280 nm e, então, determinamos o ϵ em água usando a equação 3:

$$\epsilon_{280} = \frac{0,1375}{1,06 \times 10^{-5} \text{ M} \times 1} = \mathbf{12971,7}$$

O próximo passo para melhor conhecer o peptídeo PnTx2-6, foi o estudo da fluorescência do triptofano (para se determinar se este resíduo se encontrava exposto ao solvente ou enterrado no interior da molécula) e do dicróismo circular. Em ambas as situações, os espectros foram feitos com uma concentração de 5,25 μM da PnTx2-6, e foram adicionadas diferentes concentrações de 2,2,2-trifluoretano (TFE, 2%, 4% e 8% v/v), um reagente que estabiliza a estrutura secundária de proteínas.

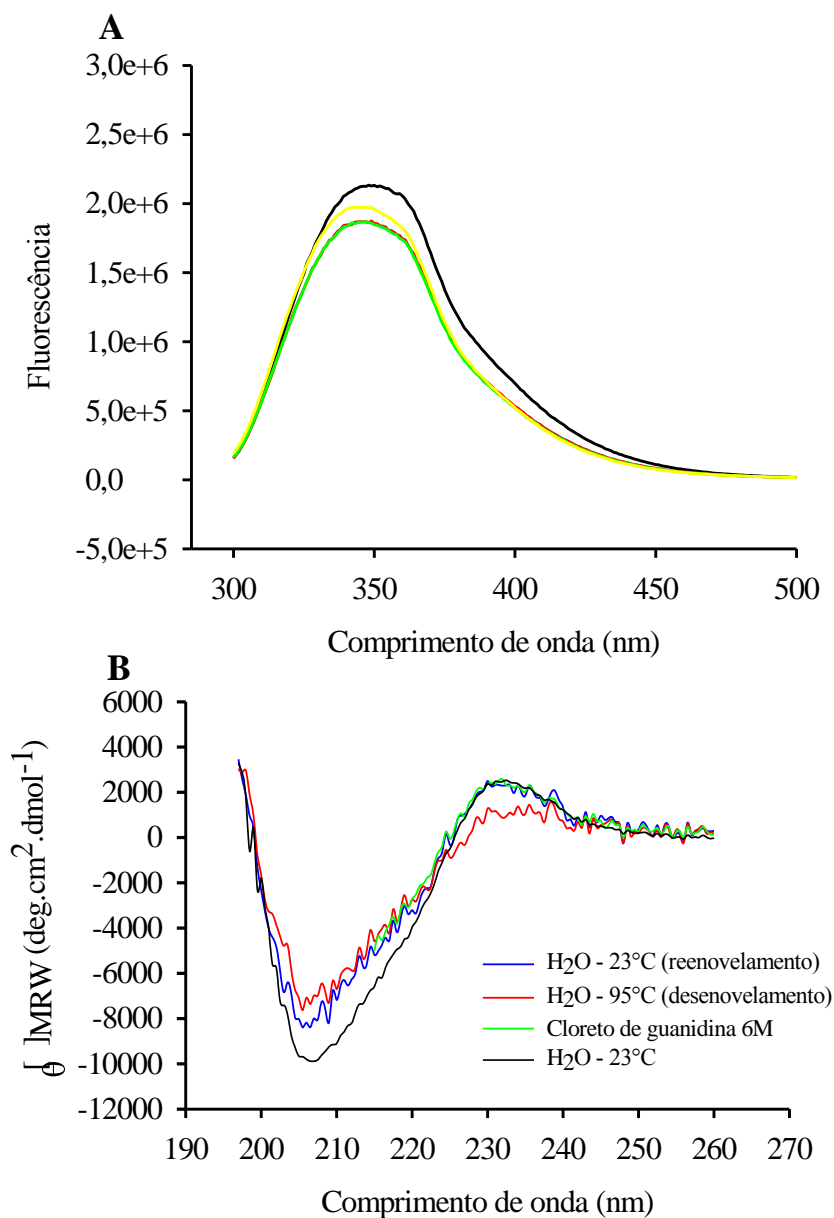


Figura 21: Análise da estrutura da PnTx2-6. **A.** Espectro de fluorescência do triptofano em água (traço preto), em 2%, 4%, e 8% de TFE (traço vermelho, verde e amarelo, respectivamente). **B.** Espectro de dicroísmo circular da PnTx2-6 em água a 23°C (traço preto), desenovelada pela temperatura (95°C, traço vermelho), reenovelada pelo abaixamento da temperatura (23°C, traço azul) e na presença de 6 M de cloreto de guanidina (traço verde).

O resultado da fluorescência (figura 21A) mostra que os triptofanos estão expostos ao solvente, pois o λ_{Max} foi 346 nm e centro de massa foi 360 nm, e não enterrados no interior da proteína. O triptofano emite uma fluorescência deslocada para o azul quando está em ambiente hidrofóbico, como no interior de uma proteína e deslocada para o vermelho quando exposta ao solvente (Lakowicz, 1999). O espectro do triptofano sozinho possui λ_{Max} de 354 nm (Ramos, 2003), que está próximo ao valor encontrado para a PnTx2-6. Os dados utilizados TFE 2%, 4% e 8% mostram que a proteína não ganha estrutura secundária ou terciária que altere os espectros de fluorescência.

O espectro de dicroísmo circular (figura 21B) mostra que a proteína tem uma conformação secundária estruturada, sendo negativo entre 198 e 225 nm, onde apresentou um valor mínimo em 207 nm, e mostrou um valor máximo em 232 nm. O espectro foi feito a 23°C em água (traço preto). A estrutura não é perdida quando a toxina é aquecida a 95°C (traço vermelho), e se mantém igual quando a temperatura foi retornada e mantida *overnight* a 23°C para reenovelamento (traço azul). Quando foi adicionado cloreto de guanidina 6M à toxina nativa, o espectro obtido (traço verde) acompanha o espectro na condição de reenovelamento, sugerindo que ele não seja alterado. Não foi possível obter o espectro completo em comprimentos de onda inferiores a 215 nm porque o cloreto de guanidina absorve nestes comprimentos de onda, distorcendo os dados.

Foram feitas estimativas da estrutura secundária, a partir do espectro obtido, utilizando 3 diferentes programas (Yang, K2d e CDNN). A análise por meio destes programas não possui concordância elevada, contudo todas as estimativas concordam com uma baixa quantidade de α -hélice e alta quantidade de folhas- β e estrutura randômica. A dificuldade de analisar tais peptídeos se deve ao espectro pouco usual da molécula e a poucas informações sobre estruturas de peptídeos na literatura. Os dados encontrados nos 3 programas foram utilizados em um 4º programa (PEPFIT) que é melhor para prever a estrutura de peptídeos, e é um programa onde o usuário pode escolher as proporções de cada tipo de estrutura secundária e comparar o espectro teórico resultante com o seu dado prático. Este programa mostrou que a predição mais próxima ao espectro da PnTx2-6 foi K2d, mostrando 8 % de α -hélice, 49 % de folha- β e 43 % de estrutura randômica.

Tabela 4: Parâmetros de ajuste dos experimentos controle e na presença das toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer*.

Condição experimental	g_{Na}	V_r (mV)	V_g (mV)	K_g	V_h (mV)	K_h	τ_f (ms)	τ_s (ms)
Controle <i>loose</i>	$54,5 \pm 9,4 \text{ mS/cm}^2$	$67,3 \pm 1,7$	$-30,3 \pm 1,6$	$5,8 \pm 0,2$	$-72,8 \pm 2,1$	$6,7 \pm 0,2$	$0,79 \pm 0,10$	-
PnTx2-6 $1 \mu\text{M}$ <i>loose</i>	$26,5 \pm 2,9 \text{ mS/cm}^2$	$57,8 \pm 1,3$	$-38,7 \pm 2,9$	$7,7 \pm 0,4$	$-82,8 \pm 2,0$	$9,0 \pm 0,9$	$0,69 \pm 0,08$	$9,8 \pm 4,2$
Controle PnTx2-5	$0,82 \pm 0,07 \text{ pF/pS}$	$66,0 \pm 1,5$	$-21,3 \pm 1,1$	$5,9 \pm 0,3$	$-61,5 \pm 1,7$	$5,8 \pm 0,1$	$0,34 \pm 0,02$	-
PnTx2-5 200 nM	$1,18 \pm 0,28 \text{ pF/pS}$	$63,0 \pm 0,6$	$-32,5 \pm 0,5$	$6,8 \pm 0,9$	$-75,5 \pm 3,0$	$9,5 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,01$	$2,99 \pm 0,14$
Controle PnTx2-6	$0,63 \pm 0,05 \text{ pF/pS}$	$68,9 \pm 2,0$	$-19,8 \pm 0,9$	$5,3 \pm 0,2$	$-59,2 \pm 1,4$	$6,5 \pm 0,2$	$0,39 \pm 0,02$	-
PnTx2-6 100 nM	$0,49 \pm 0,07 \text{ pF/pS}$	$65,1 \pm 2,4$	$-27,6 \pm 0,6$	$7,4 \pm 0,4$	$-79,5 \pm 3,8$	$15,8 \pm 0,7$	$1,21 \pm 0,15$	$6,31 \pm 0,83$

Os valores de V_g e K_g se referem àqueles obtidos no ajuste da curva de ativação da corrente de sódio. Os valores de τ_f e τ_s se referem ao decaimento exponencial da corrente para sódio que, nos experimentos utilizando o *loose patch clamp* foram obtidos no potencial de -13 mV, e nos experimentos com a GH3 foram obtidos no potencial de 0 mV.

Recuperação e curva dose-resposta

Condição experimental	τ_r ou τ_l (ms)	a	τ_2 (ms)	b	$K_{0,5}$	Modificação máxima
Controle <i>loose</i>	$1,60 \pm 0,14$	-	-	-	-	-
PnTx2-6 $1 \mu\text{M}$ <i>loose</i>	$2,14 \pm 0,23$	-	-	-	$0,8 \mu\text{M}$	0,68
Controle PnTx2-5	$1,51 \pm 0,35$	$0,69 \pm 0,05$	$8,17 \pm 1,55$	$0,34 \pm 0,06$	-	-
PnTx2-5 200 nM	$1,27 \pm 0,15$	$0,72 \pm 0,02$	$6,46 \pm 0,99$	$0,28 \pm 0,02$	95,2 nM	0,56
Controle PnTx2-6	$1,99 \pm 0,24$	$0,84 \pm 0,04$	$4,37 \pm 1,09$	$0,16 \pm 0,04$	-	-
PnTx2-6 100 nM	$0,91 \pm 0,07$	$0,79 \pm 0,02$	$10,65 \pm 0,77$	$0,21 \pm 0,02$	32,6 nM	3,09 ms

Tabela 5: Média dos parâmetros dos experimentos controle (média \pm erro padrão da média). * representam parâmetros significativamente diferentes da situação sem perfusão 0 minutos. Os parâmetros Vg e Kg foram obtidos dos gráficos de condutância.

A

Sem Perfusão	g_{Na} (pS/pF)	Vr (mV)	Vg (mV)	Kg	n	Vh	Kh	n
0 minutos	0,79 \pm 0,09	64,3 \pm 1,8	-13,8 \pm 0,75	7,0 \pm 0,3	13	-61,5 \pm 3,0	7,8 \pm 0,5	5
5 minutos	0,74 \pm 0,12	63,3 \pm 1,8	-18,7 \pm 1,53*	6,9 \pm 0,4	11	-70,5 \pm 6,6	7,9 \pm 1,2	3
10 minutos	0,87 \pm 0,14	62,0 \pm 2,5	-21,6 \pm 2,10*	6,6 \pm 0,4	8	-67,4 \pm 4,1	6,9 \pm 0,2	3
15 minutos	0,86 \pm 0,15	63,9 \pm 1,4	-23,5 \pm 2,06*	6,6 \pm 0,4	8	-67,4 \pm 3,3	7,1 \pm 0,2	4
20 minutos	0,81 \pm 0,15*	63,3 \pm 1,6	-26,0 \pm 2,16*	6,4 \pm 0,4	9	-65,7 \pm 1,3	7,4 \pm 0,6	3
25 minutos	0,87 \pm 0,15*	62,1 \pm 2,3	-28,5 \pm 2,31*	6,6 \pm 0,6	8	-70,0 \pm 5,2	7,4 \pm 0,2	3
30 minutos	0,89 \pm 0,21*	60,2 \pm 2,4	-31,7 \pm 2,78*	6,5 \pm 0,4	6	-69,5 \pm 3,6	8,9 \pm 1,0*	2

B

Perfusão Controle	g_{Na} (pS/pF)	Vr (mV)	Vg (mV)	Kg	n	Vh	Kh	n
5 minutos	0,97 \pm 0,16	61,8 \pm 1,6	-18,3 \pm 1,2*	6,7 \pm 0,3	7	-64,5 \pm 1,9	7,3 \pm 0,2	7
10 minutos	0,86 \pm 0,19	63,6 \pm 0,9	-23,3 \pm 1,2*	6,7 \pm 0,3	5	-67,5 \pm 2,6	7,9 \pm 0,4	6
15 minutos	0,88 \pm 0,38	61,6 \pm 2,0	-24,1 \pm 1,9*	6,2 \pm 0,2	6	-70,7 \pm 2,7*	8,5 \pm 0,5	6
20 minutos	0,79 \pm 0,19	64,1 \pm 1,6	-26,1 \pm 2,4*	7,2 \pm 0,6	5	-72,0 \pm 2,0*	8,9 \pm 0,7	4

C

Perfusão Albumina 0,1%	g_{Na} (pS/pF)	Vr (mV)	Vg (mV)	Kg	n	Vh	Kh	n
5 minutos	0,99 \pm 0,20	58,4 \pm 3,1	-22,42 \pm 1,0*	5,51 \pm 0,6*	4	-61,24 \pm 1,1	6,29 \pm 0,2*	4
10 minutos	0,90 \pm 0,15	58,7 \pm 3,2	-26,82 \pm 0,8*	5,58 \pm 0,6*	5	-64,68 \pm 1,3	6,55 \pm 0,3	5
15 minutos	1,04 \pm 0,20	56,4 \pm 5,0	-31,71 \pm 1,2*	5,26 \pm 0,8*	4	-67,46 \pm 1,3	7,07 \pm 0,8	3
20 minutos	1,32 \pm 0,31	64,9 \pm 2,1	-34,77 \pm 1,6*	4,03 \pm 1,5*	2	-68,58 \pm 0,6	6,32 \pm 0,5	2

- Discussão -

Os experimentos apresentados aqui mostram um claro efeito das toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer*, PnTx2-5 e PnTx2-6, sobre os canais de sódio. As toxinas modificam a inativação dos canais de sódio deixando-a mais lenta. Este efeito, típico das toxinas do tipo α de escorpião, já foi descrito em algumas toxinas de aranha (Fletcher et al., 1997; Escoubas et al., 2000).

Os experimentos de competição sugerem que a PnTx2-6 se liga ao sítio 3 na superfície dos canais de sódio. Estes experimentos (onde a PnTx2-6 competiu com a toxina AaHII) foram feitos em sinaptosomas de cérebro total, que possui as mesmas isoformas de canal de sódio que as células GH3. Os resultados mostraram que a PnTx2-6 deslocou 31% da AaHII, o que nos leva às seguintes possibilidades:

1. a PnTx2-6 se liga ao macrosítio 3, onde existem alguns aminoácidos que participam também da ligação da AaHII, porém tem outras interações distintas com o canal. Desta forma não haveria uma completa superposição dos sítios, resultando em uma competição parcial. Este conceito de macrosítio vem sendo bastante utilizado para as toxinas que se ligam ao sítio 3;
2. O não deslocamento total pode significar que a toxina não modifica, ou modifica com diferentes afinidades, todas as isoformas dos canais de sódio presentes na preparação;
3. As duas toxinas se ligam a sítios diferentes, mas a ligação da PnTx2-6 altera alostericamente a ligação da AaHII.

Para distinguirmos entre estas duas possibilidades, seria necessária a expressão heteróloga das isoformas do canal de sódio, seguida de ensaios de ligação. Mutações sítio-dirigida dos possíveis aminoácidos que constituem cada sítio seriam necessárias para mapear corretamente o macrosítio 3 para ambas toxinas. Embora possível teoricamente, não há exemplo demonstrado da hipótese “3”.

As análises dos resultados eletrofisiológicos na situação controle (tabela 4) mostram que os canais de sódio de músculo esquelético de rã ativam e inativam em voltagens mais negativas que em células GH3. As inclinações das curvas dos gráficos de ativação e inativação (mostrados pelos valores de k_g e k_h , respectivamente) não foram diferentes nas duas isoformas de canais de sódio. O decaimento da corrente de sódio obedece a uma função mono-exponencial em todas as situações controle, e foi duas vezes mais lento em músculo esquelético que em células GH3. Isso deve ser reflexo da temperatura dos experimentos, que nos de músculo esquelético era tipicamente 10°C,

enquanto em células GH3 os experimentos foram feitos à temperatura ambiente (21-25°C). A corrente de sódio se recupera da inativação de acordo com uma função exponencial dupla em células GH3, sendo que o componente de maior contribuição (rápido) possui um valor aproximado daqueles encontrados na recuperação da inativação dos canais de sarcolema de rã, que mostrou um comportamento mono-exponencial.

Os experimentos controle em células GH3 (tabela 5) mostram um deslocamento espontâneo das curvas de ativação (V_g) e estado estacionário da inativação (V_h) para valores negativos ao longo do tempo de experimento. O efeito de V_g foi descrito anteriormente por Fernandez et al. (1984), que atribuíram este deslocamento ao aparecimento de um potencial pseudo-Donnan, devido ao fato de ser lenta a troca de alguns anions (macromoléculas) do citoplasma da célula, o que gera um potencial que vai se dissipando à medida que estes anions vão se difundindo para dentro da pipeta. Por se tratar de um potencial gerado por um artefato de medição, ele deve afetar igualmente V_g e V_h , o que foi observado.

Os experimentos com as toxinas em células GH3 foram feitos de 10 a 15 minutos após o estabelecimento da condição *whole-cell* na presença da PnTx2-5 e próximo de 10 minutos na presença da PnTx2-6, e os experimentos controle em um tempo próximo de 5 minutos. Nessas situações também foi observado deslocamento da dependência de potencial de ativação (V_g), com magnitude semelhante à observada nos experimentos controle. Em músculo esquelético de rã, o deslocamento de V_g parece ser real, visto que não há a formação do *whole-cell*. Além disso, após a pipeta tocar a superfície da membrana era sempre aguardado um tempo de 10 minutos para o início dos registros, e os protocolos foram gerados na mesma sequência. Assim, todos os registros foram obtidos em tempos de experimentos semelhantes para cada protocolo.

As curvas do estado estacionário de inativação (V_h) também foram deslocadas para valores negativos em células GH3 na situação controle. Esse deslocamento na presença das toxinas poderia, também, ser atribuído ao efeito pseudo-Donnan, se a magnitude do deslocamento fosse semelhante ao do controle. Porém, neste caso, há duas situações que precisam ser mais bem analisadas: o deslocamento foi maior que na situação controle; e houve significativa alteração da inclinação da curva (k_h). Se o deslocamento fosse devido somente ao efeito pseudo-Donnan, então o valor de k_h não deveria ser alterado, já que todos os canais estariam sujeitos à mesma alteração. Dessa forma, os dados sugerem um efeito real das toxinas sobre os parâmetros (V_h e k_h). Também, em canais de sódio de músculo esquelético de rã, podemos observar um efeito significativo sobre V_h na curva da inativação no estado estacionário. Não podemos atribuir este efeito ao tempo de experimento, visto que foram similares, mas podemos atribuir esse efeito ao acoplamento da dependência de voltagem da inativação à ativação, já que os deslocamentos foram similares (-8,4 mV na ativação e -10 mV na inativação).

Admitimos 3 hipóteses para explicar a alteração do valor de k_h :

1. As toxinas poderiam estar alterando o valor de V_h e, como há canais modificados e não-modificados pelas toxinas, haveria canais que estariam respondendo a potenciais mais negativos que outros, o que espalharia a proporção de canais inativados por uma faixa mais ampla, refletindo no parâmetro k_h ;
2. As toxinas estariam alterando as cargas de superfície do canal e, conseqüentemente, a voltagem 'vista' por este, isto é, a diferença de potencial aparente presente entre os lados intra e extracelulares da membrana plasmática;
3. As toxinas estariam alterando cargas que se movem e que são importantes para a inativação do canal.

Se existisse um efeito devido às cargas de superfície (*screening*), o deslocamento resultante seria para valores positivos, já que em pH fisiológico as toxinas tem carga positiva, aumentando ainda mais a diferença de potencial entre as superfícies externa e interna da membrana celular. Como foi visto, o deslocamento aconteceu para valores mais negativos, então podemos excluir a hipótese 2. As curvas de dependência da concentração da PnTx2-5 (bem como da PnTx2-6 em músculo esquelético) nos mostram que, mesmo na saturação, parte dos canais se comporta como se não tivessem sido modificados, o que reforça a hipótese 1. Para verificarmos a hipótese 3 seriam necessários experimentos medindo correntes de *gating*, que não foi possível devido a limitações técnicas. Não podemos afirmar com segurança, mas as evidências apontam para a 1ª hipótese, porque há o deslocamento do valor de V_h e nem todos os canais são alterados. É esperado que, havendo uma mistura de canais que foram mais deslocados que outros (modificados e não modificados) o valor de k_h estaria maior. A recuperação do valor de k_h após a lavagem é consistente com esta hipótese. Em relação ao efeito da PnTx2-6 em células GH3 não foi possível avaliar as proporções de canais modificados ou não pela toxina, porém o valor do parâmetro k_h variou com a concentração de PnTx2-6, desta forma, podemos considerar a mesma hipótese nesta situação.

A análise da recuperação da inativação mostrou que somente a PnTx2-6 modificou esta curva, acelerando-a, tanto nos experimentos em músculo esquelético de rã, quanto para aqueles feitos em células GH3. É curioso o fato da PnTx2-5 não ter afetado esse parâmetro, visto que ela possui uma grande proporção de canais que não inativaram (componente 'c') na curva do estado estacionário da inativação. Necessitando de menos tempo para esta transição, um circuito neural pode disparar com maior frequência, o que explica, juntamente com os outros resultados, os sintomas excitatórios da injeção de PnTx2-6.

Ambas as toxinas analisadas modificaram a cinética de inativação da corrente de sódio nas duas preparações estudadas. A PnTx2-6 age diferencialmente dependendo do tipo celular. No

músculo esquelético de rã ela induziu o aparecimento de um componente exponencial adicional, mais lento, sem alterar o componente rápido. Enquanto nas células GH3 também houve o aparecimento de um componente mais lento, porém o componente rápido também se tornou progressivamente mais lento com o aumento da concentração da toxina, o que não aconteceu em músculo esquelético. Seria possível admitir que o aumento da constante de tempo rápida da corrente de sódio das células GH3 fosse um reflexo do aumento de tempo necessário para se atingir o pico da corrente de sódio, o que não acontece na preparação muscular. No entanto, o aumento da constante de tempo rápida também foi observado em potenciais mais despolarizados, como o de 40 mV, no qual a velocidade da ativação está próxima do máximo e o tempo para o pico é menor do que aquele a 0 mV no controle. Isto significa que esta hipótese está incorreta, e que a toxina PnTx2-6 modifica, de fato, a constante de tempo lenta.

Analisando os dados como um todo, podemos verificar que o efeito da PnTx2-5 sobre os canais de sódio de células GH3 é, primariamente, sobre a cinética de inativação. O efeito sobre o deslocamento da dependência de voltagem da curva de ativação parece ser um reflexo do deslocamento espontâneo dependente de tempo de *whole-cell*. Podemos, então, dizer que eletrofisiologicamente, a PnTx2-5 é uma toxina do tipo α típica. Nas mesmas células, a ligação da PnTx2-6 ao seu sítio modifica mais profundamente os canais de sódio, modificando não somente a cinética de inativação da corrente, mas também tornando a recuperação da corrente de sódio mais rápida, e mais lento o tempo necessário para se atingir o pico da corrente. Nas duas situações parece haver um deslocamento da dependência de voltagem do estado estacionário da inativação para valores mais negativos. Em músculo esquelético, a PnTx2-6 modifica os canais de sódio de forma diferente que em células GH3. Isto não é surpresa, já que as espécies moleculares dos canais existentes nestas preparações são diferentes, havendo aminoácidos diferentes não somente no sítio receptor da toxina.

Sem dúvida uma pergunta inevitável seria: o que explicaria as diferenças entre os efeitos da PnTx2-5 e da PnTx2-6 sobre os canais de sódio se elas se diferem em somente cinco aminoácidos?

Como pode ser visto na figura 3, a PnTx2-6 e a PnTx2-5 diferem nos seguintes aminoácidos:

Posição do resíduo	PnTx2-6	PnTx2-5
9	Prolina (CCC*)	Treonina (ACC**)
12	Glutamato (GAA*)	Valina (GTA**)
35	Tirosina (TAC*)	Asparagina (AAC**)
37	Triptofano (TGG*)	Leucina (TTG**)
45	Asparagina (AAC*)	Serina (AGC**)

As seqüências de aminoácidos bem como os códons que codificam para cada um deles foram retirados das referências *Matavel et al., 2002 e **Penaforte, 2000.

É sabido que a prolina possui uma importante influencia na arquitetura de proteínas, pois seu grupo amino secundário (imino) confere rigidez à ligação N-C α , o que reduz a flexibilidade estrutural neste ponto de cadeia peptídica. Desta forma, quando substituída na sequência de aminoácidos, pode alterar a conformação da toxina. A treonina é um aminoácido polar, devido ao seu grupo hidroxila, e é possível que ele esteja exposto ao solvente ou interagindo com algum aminoácido hidrofílico em outra região da molécula.

Rogers e colaboradores (1996) identificaram um resíduo de glutamato entre os segmentos transmembrana S3 e S4 do domínio IV (sítio 3) do canal de sódio neuronal como importante na ligação das α -toxinas. Foram identificados aminoácidos básicos presentes na superfície destas toxinas determinantes para sua ligação ao canal. Existe, por exemplo, uma lisina muito conservada nesta classe de toxinas $\alpha\beta$ (Fletcher, et al., 1997; Zilberberg et al., 1997; Hassani et al., 1999). Parece que estes aminoácidos carregados direcionam a toxina para o seu sítio receptor, porém não são os únicos determinantes para a interação toxina-canal, pois suas substituições alteram a afinidade da toxina ao canal mas não eliminam a ligação da toxina ao canal de sódio. Ambas toxinas da aranha *P. nigriventer* possuem em suas sequências de aminoácidos, quatro resíduos de lisina e dois de arginina, que podem fazer a aproximação da toxina ao canal. Além dos resíduos positivos, muitos autores identificaram aminoácidos aromáticos importantes para a ligação das toxinas do tipo α de escorpião aos canais de sódio, e que estão conservados em α -toxinas de diferentes espécies (Fletcher et al., 1997; Zilberberg et al., 1997; Hassani et al., 1999, Sun et al., 2003). Estes aminoácidos estão dispostos na estrutura tridimensional da toxina formando a chamada “superfície hidrofóbica conservada”. Além disso, estes aminoácidos são essenciais não somente para a função da toxina, como também para sua estrutura (Sun et al., 2003).

Como podemos notar na tabela 6, dois aminoácidos aromáticos da PnTx2-6 foram substituído por um aminoácido neutro e hidrofílico, e o outro hidrofóbico na PnTx2-5, podendo alterar profundamente a função da toxina. A tirosina e o triptofano são significativamente mais polares que a fenilalanina, devido ao grupo hidroxila da tirosina e ao nitrogênio do anel indol do triptofano. Isso pode explicar porque os resíduos de triptofano da PnTx2-6 estão expostos ao solvente, como foi visto na figura 20, sem que isso seja desfavorável à estrutura. Ambos, tirosina e triptofano, podem participar de interações hidrofóbicas, que são particularmente fortes quando aromáticos estão reunidos um ao lado do outro (Lehninger et al., 2000). Além disso, representam 2 ou 3 aminoácidos mais comumente encontrados em interações proteína –proteína (Bogan & Thorn, 1998).

Como vimos na figura 3, a PnTx2-6 possui a seguinte sequência entre os aminoácidos 35 e 41: **YFWIAWY**; enquanto a PnTx2-5 possui **NFLIAWY**. Comparando as duas sequências, podemos notar que a PnTx2-6 possui grande número de aminoácidos aromáticos (sobretudo

tirosina e triptofano) próximos na sequência de aminoácidos, e em ambiente apolar. Isso não significa que estes aminoácidos estejam expostos na estrutura terciária da toxina. Entretanto, nossos dados mostraram que os triptofanos estão expostos ao solvente (figura 20A), que a PnTx2-6 possui $K_{0,5}$ três vezes menor que a PnTx2-5. Assim é possível que estes aminoácidos aromáticos realmente estejam participando da ligação das toxinas ao canal de sódio, determinando a maior afinidade da PnTx2-6 e a forte ligação desta toxina ao seu sítio receptor, que não se desliga do canal mesmo com fortes despolarizações (figura 16). Estes aminoácidos aromáticos devem participar da “superfície hidrofóbica conservada” da PnTx2-6 e devem ser cruciais para a determinar a diferença de afinidade das duas toxinas estudadas.

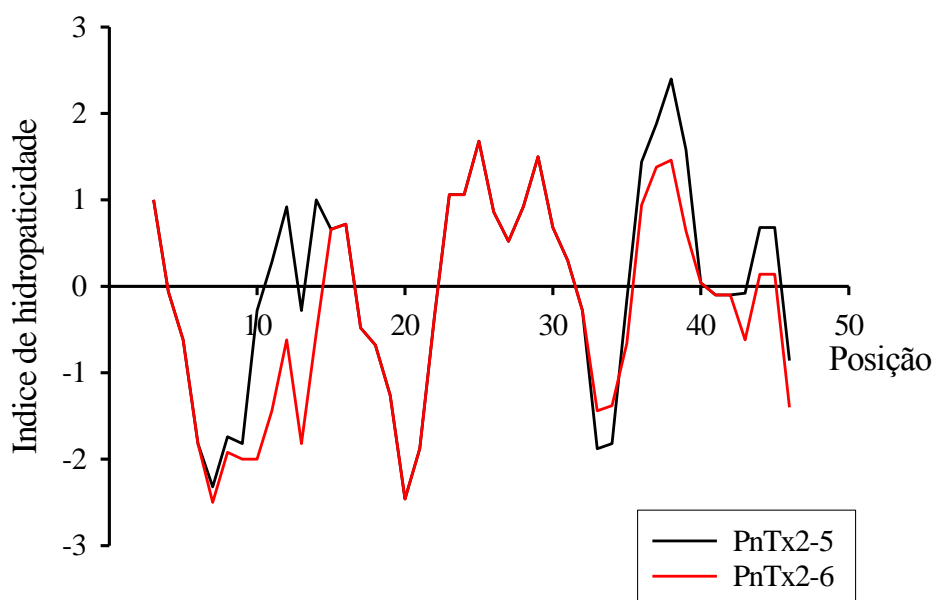


Figura 22: Gráfico de hidropaticidade da PnTx2-5 e da PnTx2-6. O gráfico foi construído segundo Kyte & Doolittle (1982), utilizando uma janela de 5 aminoácidos. Valores positivos representam caráter hidrofóbico, e negativo, hidrofílico. O traço vermelho representa a toxina PnTx2-6 e o preto, PnTx2-5.

O gráfico de hidropaticidade mostrado na figura 22 (construído usando os índices de Kyte & Doolittle, 1982), que compara as duas toxinas, PnTx2-5 e PnTx2-6, mostrando que diferem quanto ao seu caráter polar, basicamente, nas extremidades da cadeia peptídica. Podemos notar também que, de modo geral, a PnTx2-6 é mais hidrofílica que a PnTx2-5, de forma que a presença dos aminoácidos aromáticos na posição 35 e 37 da PnTx2-6 não foi suficiente para romper esta característica.

A substituição da serina por asparagina pode ter um efeito menos drástico na estrutura/função das toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer*, sendo que ambos são aminoácidos polares não carregados.

É bastante interessante notar que todas estas substituições de aminoácidos ocorreram em decorrência da alteração de uma única base nitrogenada no códon que codifica para cada aminoácido (Matavel et al., 2002; Penaforte, 2000), e que, exceto na última substituição há sempre troca de uma purina (A e G) por uma pirimidina (C e T) ou vice-versa, sugerindo que estas toxinas possuem um ancestral comum.

A estrutura tridimensional de várias toxinas de aranha, que agem em diferentes canais iônicos, tem sido determinada por ressonância nuclear magnética, como, por exemplo, as toxinas ω -atracotoxina (Fletcher et al., 1997a), δ -atracotoxina-Ar1 (robustoxina) (Pallagy et al., 1997), δ -atracotoxina-Hv1 (versutoxina) (Fletcher et al., 1997b), ω -agatoxina-IVA (Reily et al., 1994) e IV (Yu et al., 1993), μ -agatoxina -I (Omencinsky et al., 1996), huwentoxina-1 (Qu et al., 1995; 1997) e hanatoxina-1 (Takahashi et al., 2000). Todos estes peptídeos possuem um motivo estrutural comum, existente nas toxinas do tipo α de escorpião (Housset et al., 1994; Sun et al., 2003), composto por 3 fitas β antiparalelas, estabilizadas por pontes dissulfeto internas (Pellaghy et al., 1993) (figura 20). Neste motivo, quatro elementos estruturais estão presentes: a fita β I conectada à fita β II por uma alça ou uma pequena α hélice, uma volta β e a terceira fita- β . Este motivo estrutural parece ser bem conservado ao longo da evolução, pois mesmo toxinas de diferentes filós, que possuem pouca ou nenhuma similaridade na sequência primária e que agem em diferentes tipos de canais iônicos, conservam este motivo (figura 22) (Pellaghy et al., 1993; Escoubas et al., 2000). Um padrão comum também foi visto em relação as pontes dissulfeto, que são formadas entre as cisteínas I-IV, II-V e III-VI, para as toxinas com 3 pontes dissulfeto (Escoubas et al., 2000).

A análise do espectro de dicroísmo circular mostrou que a PnTx2-6 possui uma estrutura secundária onde há predominância de folhas- β e estrutura randômica, e baixa proporção de α -hélice. Além disso, este espectro foi semelhante ao publicado por outros pesquisadores (Zilberberg et al., 1997; Sun et al., 2003), que mostraram, também, as estruturas cristalográficas ou modelagem por homologia, das toxinas do tipo α -like BmK M1 (do escorpião *Buthus martensii* Karsch) ou Lqh α IT (do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus*), mostrando uma estrutura com predominância de folhas- β e uma pequena α -hélice entre as folhas β I e β II.

Comparando nossos dados com os da literatura, sugerimos que a toxina da aranha *Phoneutria nigriventer*, PnTx2-6, possui estrutura terciária definida, com predominância de folhas- β , provavelmente dispostas como as folhas- β das toxinas de aranhas e escorpiões publicadas até o momento.

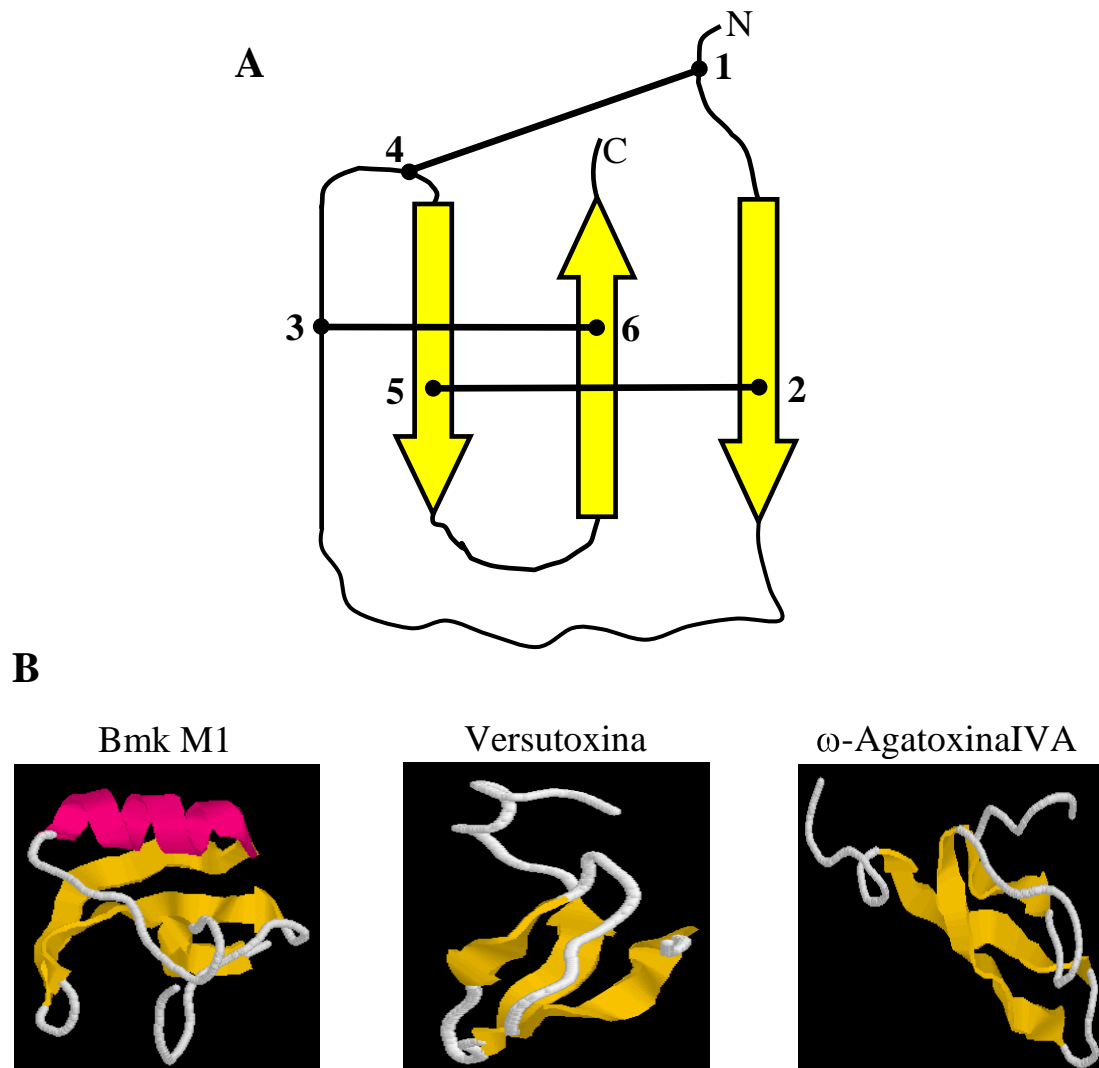


Figura 23: Modelo estrutural das toxinas de escorpião e aranha. A. Padrão de estrutura terciária e pontes dissulfeto encontrado em diversas toxinas de aranha e escorpião. **B.** Bmk M1: toxina do tipo α do escorpião *Buthus martensii* Karsh; Versutoxina: toxina tipo α da aranha *Hadronyche versutus*; ω -agatoxina IVA: toxina da aranha *Agelenopsis aperta* que agem em canal de cálcio.

- Referências bibliográficas -

- Albuquerque EX, Daly JW, Witkop B (1971) Batrachotoxin: chemistry and pharmacology. *Science* **172**: 995-1002.
- Antunes E, Marangoni RA, Borges NCC, Hyslop S, Fontana MD, de-Nucci G (1993) Effects of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **26**: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, Ronjas E (1973) Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J. Gen. Physiol.* **62**: 375-391.
- Armstrong CM & Bezanilla F (1977) Inactivation of sodium channel. II. Gating current experiments. *J. Gen. Physiol.* **70**: 567-590.
- Armstrong CM (1981) Sodium channel and gating currents. *Physiol. Rev.* **61**: 644-683.
- Armstrong CM & Matteson DR (1985) Two distinct population of calcium channels in the clonal line of pituitary cells. *Science* **227**: 65-67.
- Beneski DA & Catterall WA (1980) Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 639-643.
- Bénitah, JP; Rangan, R.; Yamagishi, T.; Janecki, M.; Tomaselli, G.; Marban, E. (1997) Molecular motions within the pore of voltage-dependent sodium channels. *Biophys. J.* **73**: 603-613.
- Bénitah JP, Chen ZH, Balsler JR, Tomaselli GF, Marban E (1999) Molecular dynamics of sodium channel pore vary with gating: interaction between P segment motion and inactivation. *J. Neurosci.* **19**: 1577-1585.
- Brasil V & Vellard J (1925) Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. *Mem Isnt Butantan* **2**: 5-77.
- Brasil OV, Leite GB, Fontana MD (1988) Modo de ação da peçonha da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891), nas aurículas isoladas de cobaias *Ciência e Cultura* **40**: 181-185.
- Campos FV (2002) Dissociação dependente de voltagem da Tityustoxina do sítio de ligação em canais de sódio. Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 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 (1977) Activation of the action potential Na⁺ ionophore by neurotoxins. An allosteric model. *J Biol Chem* **252**: 8669-8676.
- Catterall WA (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**: 15-43.
- Catterall WA, Gainer M (1985) Interaction of brevetoxin a with a new receptor site on the sodium channel. *Toxicon* **23**: 497-503.
- Catterall, W.A. (1988) Structure and function of voltage-sensitive ion channel. *Science* **242**: 50-61.

- Catterall WA (1992) Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol. Rev.* **72**: S15-S48.
- Catterall WA (2001) A 3D view of sodium channel. *Nature* **409**: 988-991.
- Cestèle, S.; Khalifa, R.B.; Pelhate, M.; Rochat, H.; Gordon, D. (1995) a-scorpion toxins binding on rat and insect sodium channels reveal divergent allosteric modulations by brevetoxin and veratridine. *J. Biol. Chem.* **270**: 15153-15161.
- Cestèle S, Qu Y, Rogers JC, Rochat H, Scheuer T, Catterall WA (1998) Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by b-scorpion toxin bound to the S3-S3 loop in domain II. *Neuron* **21**: 919-931.
- Cestèle S, Catterall WA (2000) Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channel. *Biochimie* **82**: 883-892.
- Cha A, Ruben PC, George AL, Fugimoto E, Bezanilla F (1999) Voltage sensor in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na⁺ channel fast inactivation. *Neuron* **22**: 73-87.
- Chahine M, Chen LQ, Fotouhi N, Walsky R, Fry D, Santarelli V, Horn R, Kallen RG (1995) Characterizing the mu-conotoxin binding site on voltage-sensitive sodium channel with toxin analogs and channel mutations. *Receptors Channels* **3**: 161-174.
- Chahine M, Sirois J, Marcotte P, Chen LQ, 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 m-conotoxin GIIIA binding site. *Biophys. J.* **75**: 236-246.
- Chen H, Gordon D, Heinemann SH (2000) Modulation of cloned skeletal muscle sodium channels by the scorpion toxins Lqh II, Lqh III, and Lqh alphaIT. *Pflugers. Arch.* **439**: 423-432.
- Chen H, Heinemann SH (2001) Interaction of scorpion alpha-toxins with cardiac sodium channels: binding properties and enhancement of slow inactivation. *J. Gen. Physiol.* **117**: 505-518.
- Chiamvimonvat N, Pérez-García MT, Ranjan R, Marban E, Tomaselli GF (1996) Depth asymmetries of the pore-lining segments of the sodium channel revealed by cysteine mutation. *Neuron* **16**: 1037-1047.
- Choudhary G, Yotsu-Yamashita M, Shang L, Yasumoto T, Dudley Jr SC (2003) Interaction of the C-11 hydroxyl of tetrodotoxin with channel outer vestibule. *Biophys. J.* **84**: 287-294.
- 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**: 153-156.
- Cordeiro MN, Richardson M, Gilroy J, Figueredo SG, Beirão PSL, Valentim AC, Diniz CR (1995) Properties of the venom from the South American 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891). *J. Toxicol. – Toxicon Reviews* **14**: 309-326.
- Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, Yang AS, Kass RS (2002) Secondary structure of human cardiac Na⁺ channel C terminus – evidence for a role of a helical structures in modulation of channel inactivation. *J. Biol. Chem.* **277**: 9233-9241.
- Cota G, Armstrong CM (1989) Sodium channel gating in clonal pituitary cells. The inactivation step is not voltage dependent. *J. Gen. Physiol.* **94**: 213-232.
- Crill WE (1996) Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 349-362.
- Drummond Y (2000) Efeitos de toxinas de escorpião sobre a liberação de acetilcolina em átrios isolados de ratos e sobre canais de sódio de células GH3. Tese defendida em Ciências Biológicas (Fisiologia e Farmacologia) - Universidade Federal de Minas Gerais.
- Dudley SCJR, Todt H, Lipkind G, Fozzaed HA (1995) A m-conotoxin-insensitive Na⁺ channel mutant: possible localization of a binding site at the outer vestibule. *Biophys J* **69**: 1657-1665.

- Edelhoc H (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**: 1948-1954.
- El-Sherif N, Fozzard HA, Hanck DA (1992) Dose-dependent modulation of the cardiac sodium channel by sea anemone toxin ATX II. *Circ. Res.* **70**: 285-301.
- Escoubas P, Diochot S, Corzo G (2000) Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie* **82**: 893-907.
- Fasman GD (1996) Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules, 1st ed. Plenum Press, New York.
- Filatov GN, Nguyen TP, Kraner SD, Barchi RL (1998) Inactivation and secondary structure in the D4/S4-S5 region of the SkM1 sodium channel. *J. Gen. Physiol.* **111**: 703-715.
- Fontana MD, Brasil OV (1985) Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **18**: 557-565.
- Fontana MD (1990) Pharmacology of *Phoneutria* venom. *Mem. Inst. Butantan* **52**: 59-60.
- Fontecilla-Campos JC, Habersetzer-Rochat C, Rochat H (1988) *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* **85**: 7443-7447.
- Fozzard HA & Hank DA (1996) Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. *Physiol. Rev.* **76**: 887-926.
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channel. *Neuron* **28**: 365-368.
- Goldin AL (2002) Evolution of voltage gated Na⁺ channel. *J. Exp. Biol.* **205**: 575-584.
- Goldman L, Schauf CL (1972) Inactivation of the sodium current in *Myxicola* giant axons – evidence for coupling to the activation process. *J. Gen. Physiol.* **59**: 659-675.
- Gonoi T & Hille B (1987) Gating Na channel. Inactivation modifiers discriminate among models. *J. Gen. Physiol.* **89**: 253-274.
- Gordon D, Martin-Euclaire 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**: 8034-8045.
- Gordon D, Savarin P, Gurevitz M, Zinn-Justin S (1998) *J. Toxicol. Toxin. Rev.* **17**: 131-159.
- Gordon D, Gurevitz M (2003) The selectivity of scorpion a-toxin for sodium channel subtypes is determined by subtle variations at the interaction surface. *Toxicon* **41**: 125-128.
- Halon MR & Wallace BA (2002) Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory β subunits. *Biochemistry* **41**: 2886-2894.
- 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. *Pflügers Arch.* **391**: 85-100.
- Hartmann HA, Tiedeman AA, Chen S-F, Brown AM, Kirsch GE (1994) Effects of III-IV linker mutations on human heart Na⁺ channel inactivation gating. *Circul. Res.* **75**: 114-122.
- Heinemann SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S (1992) Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* **356**: 441-443.
- Heinemann SH, Terlau H, Imoto K (1992) Molecular basis for pharmacological differences between brain and cardiac sodium channel. *Pflügers Arch.* **422**: 90-92.
- Hille B (2001) *Ionic channels of excitable membranes*. 3rd ed., p. 693, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Hodgkin AL, & Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **106**: 500-544.

- Hoyt RC (1963) The squid giant axon: mathematical models. *Biophys. J.* **3**: 399.
- Hoyt RC (1968) Sodium inactivation in nerve fibers. *Biophys. J.* **8**: 1074.
- Ishibashi K, Suzuki M, Imai M (2000) Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**: 370-376.
- Isom LL & Catterall WA (1996) Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature* **383**: 307-308.
- Ji S, Georges AL, Horn R, Barchi RL (1995) Sodium channel mutations and disorders of excitation human skeletal muscle. *In* Ion channel and genetic diseases. The Rockefeller University Press, New York. 61-76.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cedene M, Chait BT, Mackinnon R (2003a) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**: 33-41.
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, Mackinnon R (2003b) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**: 42-48.
- Kalaphothakis E, Penaforte CL, Leão RM, Cruz JS, Prado VF, Cordeiro MN, Diniz CR, Romano-Silva MA, Prado MA, Gomez MV, Beirão PS (1998) Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (*Phoneutria nigriventer*). *Toxicon* **36**: 1971-1980.
- Kharrat R, Darbon H, Rochat H, Granier C (1989) *Eur. J. Biochem.* **181**: 381-390.
- Kao CY, Nishiyama A (1965) Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems. *J. Physiol.* **180**: 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 sodium channel inactivation gate during inactivation. *J. Biol. Chem.* **271**: 30971-30979.
- Keynes RD (1994) The kinetics of voltage-gated ion channels. *Q. Rev. Biophys.* **27**: 339-434.
- Keynes RD & Elinder F (1998) Modelling the activation, opening, inactivation and reopening of the voltage-gated sodium channel. *Proc. R. Soc. Lond. B* **265**: 263-270.
- Kimitsuki T, Mitsuiye T, Noma A (1990) Negative shift of cardiac Na⁺ channel kinetics in cell-attached patch recordings. *Am. J. Physiol.* **258(1 Pt 2)**: H247-H254.
- Kimura T, Kinoshita E, Yamaoka K, Yuki T, Ykehiro M, Seyama I (2000) On site of action of grayanotoxin in domains 4 segment 6 of rat skeletal muscle sodium channel. *FEBS Lett* **465**: 18-22.
- Kontis KJ, Goldin AL (1997) Sodium channel inactivation is altered by substitution of voltage sensor positive charges. *J. Gen. Physiol.* **110**: 403-413.
- Kontis KJ, Rounaghi A, Goldin AL (1997) Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J. Gen. Physiol.* **110**: 391-401.
- Kostyuk PG, Krishtal OA, Pidoplichko VI (1975) Effect of internal fluoride and phosphate on the membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells. *Nature* **257**: 691-693.
- Kushmerick C, de Souza Castro M, Cruz JS, Bloch Jr. C, Beirão PSL (1998) Functional and structural features of gamma-zethionins, a new class of sodium channels blockers. *FEBS Lett.* **440**: 302-306.
- Kushmerick C, Kalaphotakis E, Beirão PSL, Penaforte, CL, Prado VF, Cruz JS, Diniz CR, Cordeiro MN, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado MA (1999) *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K⁺ currents controlling Ca²⁺ oscillation frequency in GH3 cells. *J. Neurochem.* **72**: 1472-1481.

- Lakowicz JR (1999) Principles of fluorescence spectroscopy. 2st ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Le Sueur LP, Kalapothakis E, Cruz-Höfling MA (2003) Breakdown of the blood-brain barrier and neuropathological changes induced by Phoneutria nigriventer spider venom. *Acta Neuropathol.* **105**: 125-134.
- Li HM, Wang D-C, Zeng ZH, Jin L, Hu RQ (1996) *J. Mol. Biol.* **261**: 415-431.
- Li HM, Zhao T, Jin L, Wang M, Zhang Y, Wang D-C (1999) *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallog.* **55**: 341-344.
- Linford NJ, Cantrell AR, Qu Y, Scheuer T, Catterall WA (1998) Interaction of batrachotoxin with the local anesthetic receptor site in membrane segment IVS6 of the voltage-gated sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13947-13952.
- Lipkind GM & Fozzard HA (2000) KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na⁺ channel pore. *Biochemistry* **39**: 8161-8170.
- Little MJ, Wilson H, Zappia C, Cestèle S, Tyler MI, Martin-Eauclaire MF, Gordon D, Nicholson GM (1998) Delta-atracotoxins from Australian funnel-web spiders compete with scorpion alpha-toxin binding on both rat brain and insect sodium channels. *FEBS Lett* **439**: 246-252.
- Loret EP, del Valle RM, Mansuelle P, Sampieri F, Rochat H (1994) Positively charged amino acid residues located similarly in sea anemone and scorpion toxin. *J. Biol. Chem.* **269**: 16785-16788.
- Makita N, Bennett Jr. PB, George Jr. AL (1996a) Multiple domains contribute to the distinct inactivation properties of human heart and skeletal muscle Na⁺ channels. *Circ. Res.* **78**: 244-252.
- Makita N, Bennett Jr. PB, George Jr. AL (1996b) Molecular determinants of β 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent sodium channels. *J. Neurosci.* **16**: 7117-7127.
- Marcotte P, Chen LQ, Kallen RG, Chahine M (1997) Effects of *Tityus serrulatus* scorpion toxin on voltage-gated Na⁺ channels. *Circ. Res.* **80**: 363-369.
- Matavel A, Cruz JS, Penaforte CL, Araujo DA, Kalapothakis E, Prado VF, Diniz CR, Cordeiro MN, Beirao PS. (2002) Electrophysiological characterization and molecular identification of the Phoneutria nigriventer peptide toxin PnTx2-6. *FEBS Lett.* **523**: 219-223.
- Mattiello-Sverzuta AC, da Cruz-Höfling MA. (2000) Toxin 2 (PhTx2), a neurotoxic fraction from *Phoneutria nigriventer* spider venom, causes acute morphological changes in mouse skeletal muscle. *Toxicon* **38**: 793-812.
- McCormick KA, Srinivasan J, White W, Scheuer T, Catterall WA (1999) The extracellular domain of the β 1 subunit is both necessary and sufficient for β 1-like modulation of sodium channel gating. *J. Biol. Chem.* **274**: 32638-32646.
- McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA (1994) A mutation in segment IVS6 disrupts fast inactivation of sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12346-12350.
- McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA (1995) A critical role for transmembrane IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *J. Biol. Chem.* **270**: 12025-12034.
- 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 α -subunit in fast inactivation. *J. Biol. Chem.* **273**: 1121-1129.
- Mitrovic N, George AL, Horn R (1998) Independent versus coupled inactivation in sodium channel – Role of the domain 2 S4 segment. *J. Gen. Physiol.* **111**: 451-462.
- Monjaraz E, Navarrete A, Lopez-Santiago LF, Vega AV, Arias-Montañón JA, Cota G (2000) L-type calcium channel activity regulates sodium channel levels in rat pituitary GH3 cells. *J. Physiol.* **523**: 45-55.

- Moorman JR, Kirsch GE, Brown AM, Joho RH (1990) Changes in sodium channel gating produced by point mutation in a cytoplasmic linker. *Science* **250**: 688-691.
- Nakamura Y, Nakajima S, Grudfest 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 T (1960) Stabilization and rectification of the 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 axon. *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**: 1443-1453.
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Raftery MA, Hirose T, Inayama S, Hayashida H, Miyata T, Numa S (1984) Primary structure of *Eletrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**: 121-127.
- Noda M, Suzuki H, Numa S, Stühmer W (1989) A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* **259**: 213-216.
- O'Leary ME, Chen L-Q, Kallen RG, Horn R (1995) A molecular link between activation and inactivation of sodium channel. *J. Gen. Physiol.* **106**: 641-658.
- Patton DE, West JW, Catterall WA, Goldin AL (1992) Amino acid residues required for fast Na⁺ - channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10905-10909.
- Penzotti JL, Fozzard HA, Lipkind GM, Dudley Jr SC (1998) Differences in saxitoxin and tetrodotoxin binding revealed by mutagenesis of the Na⁺ channel outer vertubule. *Biophys. J.* **75**: 2647-2657.
- Pérez-García MT, Chiamvimonvat N, Marban E, Tomaselli GF (1996) Structure of sodium channel pore revealed by serial cysteine mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 300-304.
- Qu Y, Curtis R, Lawson D, Gilbride K, Ge P, DiStefano PS, Silos-Santiago I, Catterall WA, Scheuer T (2001) Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium current by the β 1, β 2 and β 3 subunits. *Mol. Cell. Neurosci.* **18**: 570-580.
- Ramos CHI (2003) A spectroscopic-based laboratory course for protein conformation studies. *Biochem. Mol. Biol. Edu.* (In press)
- Ren D, Navarro B, Xu H, Yue L, Shi Q, Clapham DE (2001) A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science* **294**: 2372-2375.
- 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**: 1225-1233.
- Rogers JC, Qu YS, 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**: 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. *J. Biol. Chem.* **268**: 17114-17119.
- Satin J, Kile JW, Chen M, Bell P, Cribbs LL, Fozzard HA Rogard RB A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science* **256**: 1202-1205.
- Sato KY, Ishida K, Wakamatsu R, Kato H, Honda Y, Ohizumi H, Nakamura M, Ohya M, Lancelin JM, Kohda D (1991) Active site of m-conotoxin GIIIA, a peptide blocker of muscle sodium channels. *J. Biol. Chem.* **266**: 16989-16991.

- Sato C, Ueno Y, Asai K, Takahashi K, Sato M, Engel A, Fugiyoshi Y (2001) The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* **409**: 1047-1051.
- Sheets MF, Hanck DA (1995) Voltage-dependent open-state inactivation of cardiac sodium channels: gating currents studies with Anthopleurin-A toxin. *J. Gen. Physiol.* **106**: 617-640.
- Sirota FL, Pascutti PG, Anteneodo C (2002) Molecular modeling and dynamics of the sodium channel inactivation gate. *Biophys. J.* **82**: 1207-1215.
- Stefan MM, Potts JF, Agnews WS (1994) The m1 skeletal muscle sodium channel: mutation E403Q eliminates sensitivity to tetrodotoxin but not to m-conotoxin GIIIA and GIIIB. *J Memb Biol* **137**: 1-8.
- 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**: 221-242.
- Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang X, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* **339**: 597-603.
- Sun Y-M, Liu W, Zhu R-H, Goudet C, Tytgat J, Wang D-C (2002) *J. Pep. Res.* **60**: 247-256.
- Sun Y-M, Bosmans F, Zhu R-H, Goudet C, Xiong Y-m, Tytgat J, Wang D-C (2003) Importance of the conserved aromatic residues in the scorpion a-like toxin BmK M1. *J. Biol. Chem.* **278**: 24125-24131.
- Tang L, Chehab N, Wieland SJ, Kallen RG (1998) Glutamine substitution at alanine¹⁶⁴⁹ in the S4-S5 cytoplasmic loop of domain 4 removes the voltage sensitivity of fast inactivation in the human heart sodium channel. *J. Gen. Physiol.* **111**: 639-652.
- 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**: 8742-8746.
- Terlau H, Heinemann SH, Stühmer W, Push M, Conti F, Imoto K, Numa S (1991) Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett.* **293**: 93-96.
- Thamkun 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**: 1676-1688.
- Thomsen WJ, Catterall WA (1989) Localization of the receptor site for alpha-scorpion toxin by antibody mapping: implications for sodium channel topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 10161-10165.
- Trainer VL, Thomsen WJ, Catterall WA, Baden DG (1991) Photoaffinity labeling of the brevetoxin receptor site on sodium channels in rat brain synaptosomes. *Mol Pharmacol* **40**: 988-994.
- Trainer VL, Moreau E, Guedin D, Baden DG, Catterall WA (1993) Neurotoxin binding and allosteric modulation at receptor sites 2 and 5 on purified and reconstituted rat brain sodium channels. *J. Biol. Chem.* **268**: 17114-17119.
- Trainer VL, Baden DG, Catterall WA (1993) Identification of peptide components of the brevetoxin receptor site of rat brain sodium channels. *J Biol Chem* **269**: 17114-17119.
- Trainer VL, Brown GB, Catterall WA (1996) Site of covalent labeling by a photoreactive batrachotoxin derivative near transmembrane segment IS6 of the sodium channel alpha subunit. *J Biol Chem* **271**: 11261-11267.
- 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**: 463-475.
- Ulbricht W (1969) The effect of veratridine on excitable membranes of nerve and muscle. *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol.* **61**: 18-71
- Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA (1988) Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* **241**: 1658-1661.

- Vellard J (1936) Le venin des araignées. Masson et Cie., Paris.
- Vijverberg HP, Pauron D, Lazdunski M (1984) The effect of *Tityus serrulatus* scorpion toxin gamma on sodium channels in neuroblastoma cells. *Pflügers Arch.* **401**: 297-303.
- Wang SY, Wang GY (1998) Local anesthetic block of batrachotoxin-resistant muscle Na⁺ channels. *Mol Pharmacol* **54**: 389-396.
- 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**: 10910-10914.
- Yamagishi T, Janecki M, Marban E, Tomaselli GF (1997) Topology of the P segments in the sodium channel pore revealed by cysteine mutagenesis. *Biophys. J.* **73**: 195-204.
- Yamagishi T, Li RA, Hsu K, Marban E, Tomaselli GF (2001) Molecular architecture of voltage-dependent Na channel: functional evidence for a helices in the pore. *J. Gen. Physiol.* **118**: 171-181.
- Yang J, Ellinor PT, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW (1993) Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels. *Nature* **366**: 158-161.
- Yanagawa Y, Abe T, Satake M (1987) m-conotoxins share a common binding site with tetrodotoxin and eel electroplax sodium channels. *J. Neurosci.* **7**: 1498-1502.
- Yang N & Horn R (1995) Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* **15**: 213-218.
- Zilberberg N, Froy O, Loret E, Cestèle S, Arad D, Gordon D, Gurevitz M (1997) Identification of structural elements of a scorpion α -neurotoxin important for receptor site recognition. *J. Biol. Chem.* **272**: 14810-14816.