



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Pedro Henrique Cardoso de Castro

**AÇÃO DA PREDNISONA E PREDNISOLONA SOBRE O CANAL PARA  
POTÁSSIO Kv1.3**

**Belo Horizonte**

**2022**

Pedro Henrique Cardoso de Castro

**AÇÃO DA PREDNISONA E PREDNISOLONA SOBRE O CANAL PARA  
POTÁSSIO Kv1.3**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia e Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Alessandra Matavel

Belo Horizonte – MG  
2022

043

Castro, Pedro Henrique Cardoso de.

Ação da prednisona e prednisolona sobre o canal para potássio Kv1.3 [manuscrito] / Pedro Henrique Cardoso de Castro. – 2023.

60 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz. Coorientadora: Dra. Alessandra Matavel.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Canalopatias. 3. Doenças Autoimunes. 4. Canais de Potássio. 5. Técnicas de Patch-Clamp. 6. Eletrofisiologia. I. Cruz, Jader dos Santos. II. Matavel, Alessandra. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 561 DE PEDRO HENRIQUE CARDOSO DE CASTRO**

Às 14h00 horas do dia 05 do mês de agosto de 2022, transmitida via Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Pedro Henrique Cardoso de Castro**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Artur Santos Miranda**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Sandra Lauton Santos**, Universidade Federal de Sergipe, **Profa. Dra. Alessandra Cristine de Souza Matavel**, Fundação Ezequiel Dias, coorientadora, e **Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Ação da Prednisona e Prednisolona Sobre o Canal Para Potássio Kv1.3**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 05 de agosto de 2022.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Jader dos Santos Cruz, Chefe de departamento**, em 09/08/2022, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Artur Santos Miranda, Usuário Externo**, em 09/08/2022, às 15:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Cristine de Souza Matavel, Usuária Externa**, em 10/08/2022, às 10:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Lauton Santos, Usuário Externo**, em 10/08/2022, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1630340** e o código CRC **778E9FFC**.

## Agradecimentos

À minha mentora Dr<sup>a</sup> Alessandra Matavel, ao longo dos 5 anos que fiz parte do laboratório de eletrofisiologia construímos uma relação tão genuína e bonita que transpassou os muros da FUNED e deu vida à uma solida amizade. Sua forma de ensinar é inspiradora, nunca perca essa essência!

Agradeço ao Dr Jader Santos por aceitar me orientar. Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia (ICB/UFMG) por formar e transformar meu conhecimento.

Durante a graduação o PROUNI subsidiou o meu sonho, chegou o momento de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Ao Dr Péter Hajdu da Universidade de Debrecen, Hungria, que mesmo sem me conhecer me enviou, de forma gratuita, o plasmídeo contendo o cDNA do canal K<sub>v</sub>1.3.

Agradeço aos meus pais, Deuseni e Noé por todo amor emanado e principalmente por entenderem minhas ausências, sem vocês eu continuaria sonhando baixo. Amo vocês!

À minha irmã Lyara que nunca mede esforços pra fazer o necessário pra me ver feliz, serei sempre grato por ter você, sua felicidade é a minha também, sempre alçaremos voo juntos!

Ao meu namorado Luiz, você me transmitiu força quando eu pensei não ser capaz, foi incrível ter você ao meu lado quando eu descobri que eu era.

À Nathalia e Rhaquel, minhas melhores amigas há quase 10 anos, passamos por muita coisa juntos e sou muito orgulhoso de onde chegamos! Obrigado!

Ao meu amigo Luis, obrigado por me apresentar ao mundo da indústria farmacêutica, você foi crucial durante a conquista desse sonho.

Agradeço a todos os amigos, de Minas e São Paulo, e aos familiares que de alguma forma me mantiveram de pé. Vocês são a prova viva de que o amor e afeto são os verdadeiros agentes transformadores.

À FUNED por todo auxílio estrutural e por ser minha segunda casa durante estes anos. A todos os alunos de PIBIC, IC e aos mestrandos Lucas e Julia que agora trilham os caminhos da pós-graduação. Á Janete por toda disponibilidade, seja me dando dicas valiosas ou me emprestando garrafas de cultivo celular, e ao Marcos Mol que me ajudou nas análises estatísticas.

Aos alunos que fazem parte ou passaram pelo Laboratório de Eletrofisiologia, e de forma mais que especial à Gabi, por todo auxílio e escuta e ao Samuel que me ajudou na aquisição de dados e na manutenção da sanidade mental, nossas conversas diárias ficarão para sempre na minha cabeça e no meu coração.

E tudo a Deus.

## Resumo

Canais iônicos são proteínas integrais que atravessam a membrana celular permitindo a passagem seletiva de íons. Os canais para potássio sensíveis à voltagem estão presentes na membrana plasmática de virtualmente todas as células e são fundamentais durante o potencial de repouso das células, durante a fase de repolarização do potencial de ação, e no controle da proliferação celular, dentre outros. Algumas das patologias autoimunes estão associadas a uma reação imunológica exacerbada mediada pelos linfócitos T, células do sistema imunológico com papel crucial na regulação da resposta imunológica. Os canais para potássio sensíveis à voltagem  $K_v1.3$  são expressos na membrana plasmática de linfócitos T, e desempenham importante papel na ativação e proliferação destes linfócitos. Por este motivo, bloqueadores dos canais  $K_v1.3$  podem atuar como agentes imunomoduladores e sua utilização como alvo terapêutico tem demonstrado grande eficiência no tratamento de doenças autoimunes. Dentre as medicações utilizadas no tratamento das doenças autoimunes, a prednisona e prednisolona, corticoides sintéticos, foram escolhidas a fim de analisar as alterações eletrofisiológicas causadas por estas drogas sobre os canais  $K_v1.3$ , sendo ambas capazes de promover o bloqueio significativo, direto e reversível das correntes para potássio que fluem através dos canais  $K_v1.3$ . Não há estudos na literatura demonstrando interações entre estes corticosteroides e os canais  $K_v1.3$ , portanto investigar esta interação contribui para o delineamento dos mecanismos envolvidos na resposta destes fármacos nas doenças autoimunes.

Palavras-chave: canalopatias; doenças autoimunes; canais  $K_v1.3$ ; eletrofisiologia celular; patch-clamp.

## Abstract

Ion channels are integral proteins on cell membrane that form pores in the lipid bilayer, allowing the selective passage of ions. Ion channels play roles in multiple physiological processes, such as muscle contraction; memory and learning; release of neurotransmitters and hormones; control of cell proliferation, among others. Voltage-gated potassium channels are present in the plasma membrane of virtually every cell and are responsible for the resting potential, the repolarization phase of the action potential, and the control of cell proliferation. Voltage-gated potassium channels Kv1.3 are expressed in the plasma membrane of T lymphocytes and are recognized as promising targets in the therapeutic treatment of autoimmune diseases, since these channels play pivotal role in the activation and proliferation of T lymphocytes. Autoimmune diseases are associated with an exacerbated immune reaction mediated by T lymphocytes. Kv1.3 channels blockers are known as immunomodulating agents and their use as therapeutic target has shown great efficacy in the treatment of these pathologies. Among drugs that are used in the treatment of autoimmune diseases, prednisone and prednisolone, synthetic corticoids, were studied to analyze the electrophysiological changes caused by these drugs on Kv1.3 channels, showing that both could promote significant, direct, and reversible blockade of the potassium currents flowing through the Kv1.3 channels. There are no studies demonstrating interactions between these corticosteroids and Kv1.3 channels, so investigating these interactions contributes to the outlining of the mechanisms involved in the response of these drugs in autoimmune diseases.

Keywords: channelopathies; autoimmune diseases; Kv1.3 channels; cellular electrophysiology; patch-clamp.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                          |   |  |
|--------------------------|---|--|
| <b>cDNA</b>              | - | DNA complementar   |
| <b>CRAC</b>              | - | Canais para cálcio ativados pela liberação de cálcio     |
| <b>DMSO</b>              | - | Dimetilsulfóxido   |
| <b>DP</b>                | - | Duplo positivo   |
| <b>EGFP</b>              | - | Proteína fluorescente verde aprimorada                   |
| <b>GABA</b>              | - | Ácido gama-aminobutírico                                 |
| <b>GR</b>                | - | Receptor de glicocorticoide                              |
| <b>IV</b>                | - | Relação corrente x voltagem                              |
| <b>IP3</b>               | - | Inositol trifosfato                                      |
| <b>K<sub>Ca</sub>3.1</b> | - | Canais para potássio sensíveis à cálcio                  |
| <b>K<sub>v</sub></b>     | - | Canais iônicos para potássio dependentes de voltagem     |
| <b>K<sub>v</sub>1.3</b>  | - | Canais para potássio sensíveis à voltagem da família 1.3 |
| <b>MHC</b>               | - | Complexo de histocompatibilidade principal               |
| <b>PLC</b>               | - | Fosfolipase C  |
| <b>REL</b>               | - | Retículo endoplasmático liso                             |
| <b>T<sub>CM</sub></b>    | - | Linfócitos T de memória central                          |
| <b>TCR</b>               | - | Receptores de linfócitos T                               |
| <b>T<sub>EM</sub></b>    | - | Linfócitos T de memória efetora                          |
| <b>T<sub>EMRA</sub></b>  | - | Linfócitos T de memória efetora RA <sup>+</sup>          |
| <b>TMs</b>               | - | Segmentos transmembrana                                  |
| <b>T<sub>N</sub></b>     | - | Linfócitos T naïve                                       |
| <b>T<sub>reg</sub></b>   | - | Linfócitos T reguladores                                 |
| <b>V<sub>M</sub></b>     | - | Potencial de membrana                                    |



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Representação do canal para potássio sensível a voltagem. ....   | 18 |
| Figura 2. Estrutura cristalizada do canal $K_v1.3$ . ....  | 19 |
| Figura 3. O papel dos canais iônicos na ativação dos linfócitos T.....   | 20 |
| Figura 4. Esquema do bloqueio seletivo de $K_v1.3$ e $K_{ca}3.1$ em linhagens de linfócitos T. ....  | 22 |
| Figura 5. Diferença da estrutura molecular da cortisona, cortisol, prednisona e prednisolona.  | 25 |
| Figura 6. Resumo gráfico do trabalho.....  | 27 |
| Figura 7. Vetor pEGFP-C1 in frame com a proteína verde fluorescente EGFP. ....   | 30 |
| Figura 8. Micropipeta de vidro tocando uma única célula em um registro de whole-cell. ....   | 32 |
| Figura 9. Integridade, quantidade e indicadores de contaminação do cDNA do plasmídeo pEGFP-C1- $K_v1.3$ após amplificação e purificação..... | 37 |
| Figura 10. Parâmetros das células HEK293T transfectadas com $K_v1.3$ . ....  | 38 |
| Figura 11. Células HEK293T transfectadas com o canal $K_v1.3$ EGFP sob luz ultravioleta. ...   | 39 |
| Figura 12. Registro representativo mostrando o bloqueio dos canais $K_v1.3$ por prednisona.  | 40 |
| Figura 13. Registro representativo mostrando o bloqueio dos canais $K_v1.3$ por prednisolona.  | 40 |
| Figura 14. Bloqueio dos canais $K_v1.3$ por prednisona e prednisolona no pico e corrente persistente. ....                                   | 41 |
| Figura 15. Curva concentração-efeito para prednisona no pico da corrente.....  | 42 |
| Figura 16. Concentração-efeito para prednisolona no pico da corrente.....  | 43 |
| Figura 17. Relação corrente-voltagem do bloqueio por prednisona no pico e corrente persistente dos canais $K_v1.3$ .....                     | 45 |
| Figura 18. Relação corrente-voltagem do bloqueio por prednisolona no pico e corrente persistente dos canais $K_v1.3$ .....                   | 46 |
| Figura 19. Gráfico representativo do bloqueio e recuperação da corrente dos $K_v1.3$ após perfusão com prednisona.....                       | 48 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 20. Gráfico representativo do bloqueio e recuperação da corrente dos $K_v1.3$ após perfusão com prednisolona.....               | 48 |
| Figura 21. Efeito do tratamento com prednisona ou prednisolona sobre o pico da corrente e corrente persistente do canal $K_v1.3$ ..... | 49 |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>12</b> |
| <b>1.2. Doenças autoimunes</b> .....                                       | <b>12</b> |
| 1.2.1. A autoimunidade a nível celular.....                                | 13        |
| <b>1.3. Canais iônicos como alvos terapêuticos</b> .....                   | <b>16</b> |
| 1.3.1. Classes de canais iônicos .....                                     | 16        |
| 1.3.2. Canais para potássio dependentes de voltagem (K <sub>v</sub> )..... | 17        |
| <b>1.4. K<sub>v</sub>1.3 e doenças autoimunes</b> .....                    | <b>18</b> |
| <b>1.5. Corticoides</b> .....  | <b>22</b> |
| 1.5.1. Glicocorticoides sintéticos: prednisona e prednisolona.....         | 24        |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>2.2. Resumo gráfico</b> .....   | <b>27</b> |
| <b>3. OBJETIVO</b> .....   | <b>28</b> |
| <b>3.2. Objetivo geral</b> .....   | <b>28</b> |
| <b>3.3. Objetivos específicos</b> .....                                    | <b>28</b> |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>29</b> |
| <b>4.2. Cultivo celular</b> .....  | <b>29</b> |
| <b>4.3. Transformação e transfecção</b> .....                              | <b>29</b> |
| <b>4.4. Eletrofisiologia</b> .....   | <b>31</b> |
| 4.4.1. Soluções eletrofisiológicas .....                                   | 31        |
| 4.4.2. Diluição e preparação dos fármacos .....                            | 31        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4.3. Parâmetros eletrofisiológicos.....   | 32        |
| 4.4.4. Corrente x Voltagem (IV).....  | 33        |
| 4.4.5. Curso temporal.....  | 33        |
| 4.4.6. Curva concentração-efeito .....  | 33        |
| 4.4.7. Efeito de longa exposição aos fármacos .....   | 34        |
| <b>4.5. Análise dos dados.....</b>  | <b>35</b> |
| 4.5.1. Equações .....   | 35        |
| 4.5.2. Estatística.....   | 35        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>  | <b>36</b> |
| 5.2. Quantificação e integridade do plasmídeo pEGFP-C1- Kv1.3 .....                                 | 36        |
| 5.3. Parâmetros da transfecção com o cDNA do Kv1.3 .....  | 37        |
| 5.4. Bloqueio dos canais Kv1.3 por prednisona e prednisolona.....                                   | 39        |
| 5.2. Curva concentração-efeito .....  | 42        |
| Dependência de voltagem do bloqueio das correntes do canal Kv1.3 por prednisona e prednisolona..... | 43        |
| 5.3. Recuperação da corrente.....   | 47        |
| 5.4. Avaliação da resposta genômica da prednisona e prednisolona .....                              | 49        |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>50</b> |
| <b>7. Conclusão.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>8. Referências Bibliográficas .....</b>  | <b>56</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.2. Doenças autoimunes

O sistema imunológico é composto por um conjunto de órgãos, tecidos e células com mecanismos capazes de proteger os hospedeiros contra agentes infecciosos. Para que a resposta imunológica seja eficaz sem que haja o ataque dos próprios tecidos, as células de defesa, a certo nível, toleram antígenos próprios. Entretanto, ocasionalmente essas células acabam por perder a tolerância a estes antígenos próprios, dando origem às doenças autoimunes, um grupo heterogêneo de doenças capazes de afetar um órgão específico ou vários sistemas do organismo (KHAN; GHAZANFAR, 2018).

A etiologia das doenças autoimunes ainda é incerta, fatores ambientais e/ou de polimorfismos genéticos podem estar relacionados à predisposição para o seu desencadeamento, sendo que as formas familiares e esporádicas são capazes de influenciar na patogenicidade da doença (SERRANO-ALBARRÁS et al., 2019).

Quanto à prevalência, os países desenvolvidos parecem ser os mais afetados, e as mulheres mais susceptíveis que os homens, aproximadamente 80% dos pacientes diagnosticados com doenças autoimunes são mulheres. A síndrome de Sjogren, tireoidite de Hashimoto, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide são exemplos de doenças em que as mulheres são 80% mais susceptíveis que os homens (NATRI et al., 2019). A patogenicidade também pode variar de acordo com o sexo, por exemplo, o prognóstico de mulheres portadoras de psoríase é melhor que dos homens; já em relação à hepatite autoimune, homens parecem ter um prognóstico melhor que as mulheres. Existe uma lacuna de conhecimento em relação as diferenças fisiopatológicas entre os sexos, evidenciando a necessidade de mais estudos (NGO; STEYN; MCCOMBE, 2014; ROOK, 2012).

As observações clínicas demonstram o crescimento das doenças autoimunes no mundo, o que ocasiona em impactos socioeconômicos e na saúde pública, no entanto, estes estudos são baseados em dados sistemáticos limitados, e não está claro se há aumento da prevalência ou melhora no diagnóstico destas doenças (DINSE et al., 2020). Seja qual for a hipótese, não se altera o fato de que mais pessoas

estão sendo diagnosticadas por mais de 80 tipos de doenças autoimunes diferentes, o que acentua a busca por terapias efetivas que melhorem o prognóstico dos portadores (NATRI et al., 2019).

Geralmente as doenças autoimunes não se manifestam de forma aguda, mas sim de forma lenta e cumulativa, gerando um quadro crônico da doença. Elas podem ser divididas em dois grupos: doenças autoimunes específicas de órgão e doenças autoimunes sistêmicas. As doenças autoimunes específicas de órgão incluem a doença de Graves, responsável por uma anomalia no funcionamento da glândula tireoide; diabetes mellitus tipo 1, causada pela destruição das células beta das ilhotas de Langerhans no pâncreas; e anemia hemolítica autoimune, destruição de glóbulos vermelhos pelos autoanticorpos, dentre outras. Como exemplos de doenças autoimunes sistêmicas podemos citar lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória crônica capaz de atingir diversos órgãos e tecidos; e artrite reumatoide, que consiste na inflamação crônica das articulações (KHAN; GHAZANFAR, 2018).

#### 1.2.1. A autoimunidade a nível celular

A resposta imunológica precisa e específica é possível devido a especificidade imunológica dos receptores de antígenos de linfócitos T e linfócitos B, resultantes do embaralhamento aleatório de diversos genes, chamado nos linfócitos de recombinação V(D)J (V= variável; D= diversidade; J= junção), que formam o código genético para o sítio de ligação desses receptores. Teoricamente, este processo poderia gerar 1 bilhão de diferentes receptores de linfócitos T (TCRs). Como resultado, o sistema inevitavelmente acaba por gerar diversos receptores que reconhecem antígenos próprios, gerando assim os linfócitos autorreativos. Para impedir este autorreconhecimento, o sistema imunológico possui mecanismos de auto tolerância, que eliminam ou inativam linfócitos com receptores capazes de reconhecer antígenos próprios. Os mecanismos de tolerância imunológica são divididos em dois grupos: tolerância central, que acontece enquanto as células ainda estão nos órgãos linfáticos primários (timo e medula óssea) e tolerância periférica, quando as células migram para periferia (KHAN; GHAZANFAR, 2018).

O timo é um órgão linfóide que durante boa parte da vida é o local primário de desenvolvimento dos linfócitos T, onde células progenitoras provenientes da medula óssea sem expressão de correceptores CD4 e CD8 se diferenciam em linfócitos T

duplo positivos (DP), aqueles que expressam tanto CD4+ como CD8+. É no timo onde os linfócitos T autorreativos, que reconhecem antígenos próprios, serão destruídos por mecanismos de tolerância central. Ao longo da vida este órgão vai diminuindo de tamanho e perdendo sua função primária, a chamada involução tímica (KUMAR; CONNORS; FARBER, 2018). Em adultos, acredita-se que após a involução tímica, novos linfócitos T naíve ( $T_N$ ), aqueles que ainda não foram apresentados a nenhum antígeno específico, sejam formados através da proliferação homeostática e/ou divisão celular de linfócitos TN já existentes, contudo, achados da literatura mostram que a perda da função tímica possa contribuir para a diminuição da efetividade da resposta imunológica em idosos, propiciando o aumento dos casos de autoimunidade e infecções oportunistas (LYNCH et al., 2009).

Quando o TCR de linfócitos T DP falha em se ligar ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) associado a peptídeos derivados de proteínas endógenas (peptídeo-MHC), estas células acabam não recebendo sinais que impediriam a apoptose espontânea e, portanto, morrem no timo por um mecanismo denominado de seleção negativa. Os linfócitos T com receptores que possuem altíssima afinidade ao complexo peptídeo-MHC também sofrem apoptose e morrem por seleção negativa (BURT; VERDA, 2004).

Durante a seleção central, linfócitos T autorreativos podem ser diferenciados em linfócitos T reguladores (Treg). Os Treg são capazes de inibir a produção de citocinas e podem suprimir a proliferação e a função efetora de linfócitos T vizinhos atuando significativamente na supressão ou regulação da resposta imune. Além disso, estas células estão intrinsecamente relacionadas à regulação da resposta autoimune (KONDĚLKOVÁ et al., 2010). Alguns marcadores são facilmente identificados nesse subtipo de linfócitos, como é o caso do CD4, CD25 e a proteína intracelular Foxp3, principal regulador transcricional dos Tregs. Linfócitos T CD4+ naíve e de memória podem ser diferenciadas *in vitro* em Tregs pela indução da expressão do gene Foxp3 (CRETNEY; KALLIES; NUTT, 2013; LU; BARBI; PAN, 2017, p. 3).

É importante salientar que em todas as fases de diferenciação dos linfócitos T eles expressam CD3+, que é necessário para ativação dos mesmos (BURT; VERDA, 2004; KAMRADT; MITCHISON, 2001; KLEIN et al., 2014).

Os linfócitos T em que o TCR tem afinidade intermediária ao complexo MHC, amadurecem no timo e migram para a periferia, processo denominado seleção positiva. Junto da seleção positiva e negativa, os linfócitos DP que são capazes de

reconhecer o MHC de classe I através dos TCR passam a expressar apenas o CD8+ e migram para periferia como linfócitos T citotóxicos. Quando eles reconhecem a MHC de classe II, eles passam a expressar apenas o CD4+ e deixam o timo como linfócitos T auxiliares, por não terem sido apresentados à antígenos específicos, ambos deixam o timo como linfócitos naíve, exibindo fenótipos CD45RA+ e expressando CCR7+. CCR7 é um receptor de quimiocina que recruta os linfócitos para os linfonodos, a co-expressão de CCR7+ e do marcador de células naíve CD45RA+, possibilita a discriminação entre linfócitos T naíve (CD45RA+CCR7+) e outros subtipos de linfócitos (MULLEN et al., 2012).

A maioria dos linfócitos autorreativos serão eliminados pelos mecanismos da tolerância central. No entanto, alguns linfócitos autorreativos conseguirão migrar para periferia, onde diversos outros mecanismos irão atuar para impedir sua reatividade a antígenos próprios, denominada tolerância periférica. Estes mecanismos incluem inativação direta de linfócitos T efetores autorreativos por deleção clonal (remoção via morte celular), conversão em linfócitos Tregs ou indução de anergia, tornando os irresponsivos. Os Tregs geradas durante o desenvolvimento dos linfócito T no timo, suprimem ainda mais as funções efetoras de outros linfócitos na periferia (MUELLER, 2010).

Os linfócitos de memória são responsáveis pela proteção imediata contra antígenos externos nos tecidos periféricos e em órgãos linfoides secundários, como linfonodos e baço. A memória protetora é mediada pelos linfócitos T de memória efetora (TEM) que migram para tecidos periféricos inflamados e possuem função efetora imediata, enquanto a memória reativa é mediada pelos linfócitos T de memória central (TCM) presentes nos órgãos linfoides secundários. Os TCM têm pouca ou nenhuma função efetora, mas alta capacidade proliferativa, quando sensibilizados por antígenos externos proliferam e se diferenciam em TEM em resposta à estimulação antigênica. Os linfócitos T de memória efetora RA, que re-expressam o CD45RA, um marcador de linfócitos T naíve (TEMRA), também são importantes no processo de defesa contra antígenos externos, no entanto, suas características funcionais ainda são controversas. Vários autores os consideram como células efetoras terminalmente diferenciadas responsáveis pela baixa secreção de interleucina-2 e alta secreção de interferon gama, alta citotoxicidade, baixa capacidade proliferativa e alta sensibilidade à apoptose. Em contraste, outros os descrevem como um fenótipo intermediário entre os linfócitos T naíve e os TEM justamente pela expressão de marcadores presentes



nos dois subtipos (VERMA et al., 2017). Os marcadores são de grande importância para discriminar os subtipos de linfócitos T, sendo: linfócitos T naïve com CD45RA+ e CCR7+; TCM com CD45RA- e CCR7+; TEM CD45RA- e CCR7- e os TEMRA com CD45RA+ e CCR7- (KUMAR; CONNORS; FARBER, 2018).

### 1.3. Canais iônicos como alvos terapêuticos

A participação dos canais iônicos nos diversos processos fisiológicos faz com que eles sejam frequentes alvos terapêuticos para o tratamento de patologias, as canalopatias (DOMINGUEZ-VILLAR; HAFLER, 2018). Os canais iônicos são fundamentais nos processos de ativação e supressão de linfócitos T, células diretamente relacionadas a algumas doenças autoimunes.

#### 1.3.1. Classes de canais iônicos

Os canais iônicos podem ser agrupados em três classes principais: canais iônicos ativados por ligantes, como os receptores colinérgicos nicotínicos e os receptores do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA); os canais iônicos mecano-sensíveis, estes canais detectam e fazem a transdução das forças mecânicas externas em sinais elétricos e/ou químicos intracelulares, como é o caso da regulação da pressão sanguínea, da transdução das ondas sonoras em estímulos elétricos ou do tato; e os canais iônicos sensíveis a voltagem, que permitem a passagem de íons como  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  e  $Cl^-$  durante as alterações no potencial da membrana das células (DOLPHIN et al., 2020).

Os íons  $Ca^{2+}$ , que fluem através dos canais para  $Ca^{2+}$ , podem desencadear diversos processos fisiológicos, como a contração muscular, regulação da expressão gênica e transmissão sináptica (CATTERALL; LENAUEUS; GAMAL EL-DIN, 2020).

Os canais para  $K^+$  possuem segmentos transmembrana (TMs) com estrutura em  $\alpha$ -hélices com os segmentos N e C-terminais intracelulares. As subunidades  $\alpha$  formam o poro do canal. Esses canais estão agrupados em três principais classes, de acordo com as estruturas da subunidade  $\alpha$ , funções e mecanismos de abertura: canais iônicos dependentes de voltagem ( $K_v$ ) (seis TMs), canais de corrente retificadora de entrada ( $K_{ir}$ ) (dois TMs) e os de domínio poro em tandem ( $K_{2P}$ ) (quatro TMs). Duas

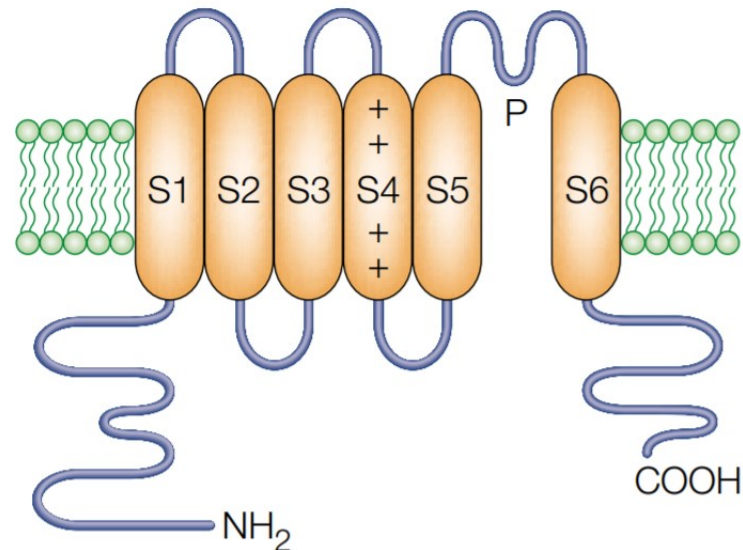
ou quatro dessas subunidades são necessárias para formar um canal funcional, por onde os íons  $K^+$  fluirão através da membrana celular de acordo com seu gradiente eletroquímico (GUTMAN et al., 2005). Os canais iônicos para  $K^+$  desempenham papel importante tanto em células excitáveis como em células não-excitáveis, cerca de 70 genes presentes no genoma humano codificam canais para potássio. Estes canais desempenham uma série de funções fisiológicas, como: regulação da excitabilidade das células, controle da frequência e duração do potencial de ação das células, além de desempenharem papel na proliferação celular, na secreção de hormônios e neurotransmissores, dentre diversas outras (BARRESE; STOTT; GREENWOOD, 2018; TALLEY; BAYLISS, 2002).

### 1.3.2. Canais para potássio dependentes de voltagem ( $K_v$ )

Os  $K_v$  são estruturalmente formados por 4 subunidades  $\alpha$ , que podem ou não estar associadas às subunidades  $\beta$  regulatórias (BARROS et al., 2019). Cada subunidade  $\alpha$  possui seis segmentos transmembranares (S1 a S6) (**Fig. 1**) com as extremidades N- e C-terminal intracelulares. A região N-terminal do canal contém o domínio T1 de tetramerização, necessário para a montagem das subunidades individuais no retículo endoplasmático. Além disso, as subunidades  $K_v\beta$  acessórias podem se ligar ao N-terminal e permitir a ligação de moléculas sinalizadoras, como as quinases (VOROS et al., 2018). O segmento S4 é o sensor de voltagem, contendo um aminoácido carregado positivamente (lisina e arginina) a cada 3-4 aminoácidos. Essas cadeias laterais carregadas positivamente formam uma faixa helicoidal na superfície do domínio que mudam de orientação e/ou conformação em resposta à mudança de voltagem (SANSOM, 2000). A alça de ligação entre os segmentos S5 e S6 entra parcialmente na membrana celular e é conhecido como alça P ou domínio P (P-loop) formando as paredes do poro, mudanças conformacionais dessa alça em resposta as mudanças conformacionais do domínio S4 está acoplado à abertura do canal, permitindo a passagem de íons potássio (OLIVEIRA et al., 2019). Além disso, a alça é uma região muito conservada do canal e possui uma assinatura de aminoácidos (TVGYG) formadora do filtro de seletividade do poro ao íon  $K^+$ .

Estudos realizados na mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster* revelaram um fenótipo comportamental relacionado aos movimentos descontrolados das patas, associado a mutações no gene que foi denominado *shaker*, e posteriormente

identificado como codificador de um canal para  $K^+$ . Trabalhos subsequentes em *Drosophila* identificaram outros três canais para  $K^+$  dependentes de voltagem, referidos como *shab*, *shaw* e *shal*. Estes quatro genes que codificam canais para  $K^+$  são homólogos respectivamente aos genes dos canais para  $K^+$  de mamíferos que codificam os Kv1, Kv2, Kv3 e Kv4 (SALKOFF; WYMAN, 1981; O'GRADY; LEE, 2005).

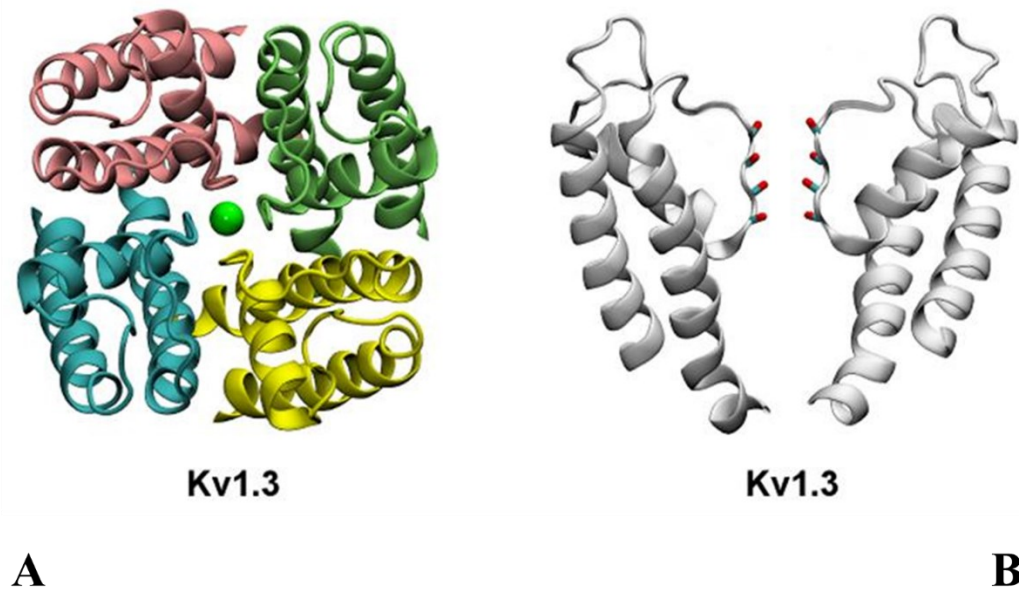


**Figura 1. Representação do canal para potássio sensível a voltagem.** Na figura estão representados os seis segmentos transmembranares (S1-S6) de uma subunidade  $\alpha$ , sendo o segmento S1 com uma extremidade N-terminal e o segmento S6 com um C-terminal. O segmento S4 é o sensor de voltagem, contendo aminoácidos carregados positivamente. Entre os segmentos S5 e S6 há uma alça reentrante chamada de *P-loop* formando o poro e o filtro de seletividade aos íons potássio. Figura modificada de (CHOE, 2002).

#### 1.4. Kv1.3 e doenças autoimunes

Os Kv1.3 são canais sensíveis à voltagem retificadores lentos (*delayed rectifier potassium channels*) da família Kv1 (*shaker*), que permitem o efluxo lento e sustentado de  $K^+$  após despolarização da membrana. Eles também apresentam inativação lenta do tipo C (*C-type*) desempenhando papel crucial no controle da disponibilidade do canal após sucessivas estimulações (ADER et al., 2008). Eles são codificados pelo

gene KCNA3 e são necessárias quatro subunidades iguais (homotetrâmero) para formar um canal funcional. (**Fig. 2**).



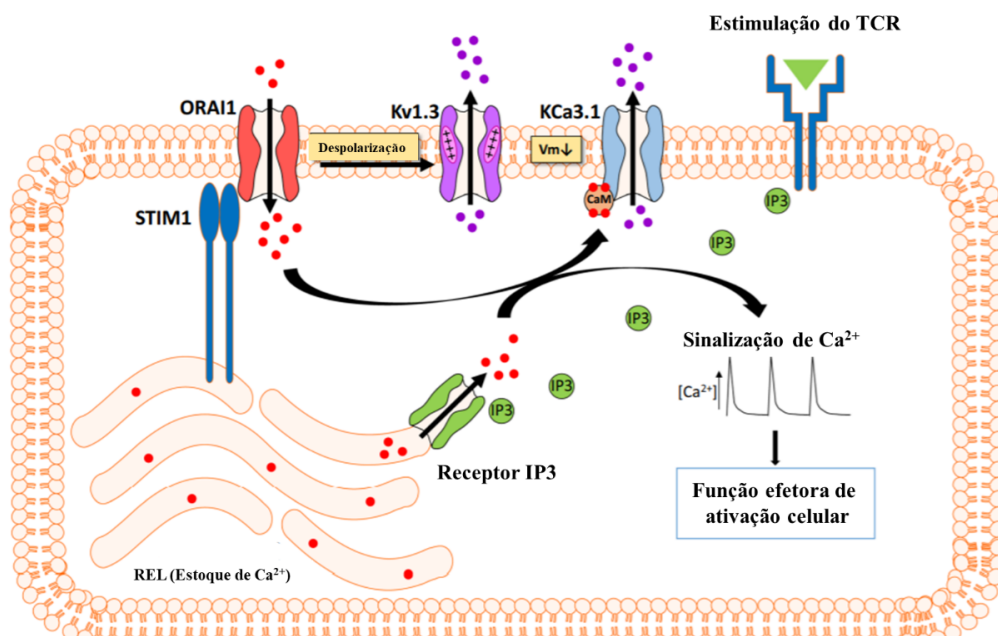
**Figura 2. Estrutura cristalizada do canal Kv1.3.** (a) vista do canal, o círculo verde central representa um íon potássio, cada cor representa uma subunidade do canal. (b) vista do canal mostrando apenas duas subunidades idênticas, a região colorida demonstra o filtro de seletividade do canal. Figura modificada de (CHEN et al., 2016).

Em 1984 estes canais foram descobertos na superfície dos linfócitos T (CHANDY et al., 1984), se tornando o primeiro canal para K<sup>+</sup> a ser descoberto em células não excitáveis eletricamente (WANG et al., 2020). Mais tarde eles foram encontrados em outros tipos celulares como macrófagos, fibroblastos, plaquetas, osteoclastos, micróglia e em alguns tecidos como o bulbo olfatório, hipocampo, córtex cerebral, pulmão, ilhotas pancreáticas, timo, baço e testículos (TEISSEYRE et al., 2019).

Nos linfócitos T, os canais Kv1.3 parecem desempenhar funções cruciais nos processos de ativação dessas células, seja na manutenção do potencial de membrana ( $V_M$ ) ou no controle do influxo de cálcio. A estimulação do receptor de linfócitos T (TCR) por um antígeno específico leva ao aumento da concentração de inositol trifosfato (IP3) no citosol através da ativação da cascata de sinalização da fosfolipase C (PLC) (**Fig. 3**). O aumento da concentração de IP3 ativa o receptor de IP3 presente

na membrana do retículo endoplasmático liso (REL), que libera o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol causa entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular pelo canal de cálcio ativado pela liberação de cálcio (CRAC) por meio da interação das proteínas STIM1 e ORAI1 (GUDLUR; ZHOU; HOGAN, 2013; VARGA; TAJTI; PANYI, 2021). Uma vez que os canais CRAC estão abertos, a magnitude e a cinética das correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  são determinadas pelo seu gradiente eletroquímico que é contrabalanceada pelo efluxo de  $\text{K}^+$  através dos canais  $\text{Kv}1.3$  e canais para potássio sensíveis à cálcio ( $\text{KCa}3.1$ ) (**Fig. 3**) (VARGA; TAJTI; PANYI, 2021).

O efluxo de potássio através dos  $\text{Kv}1.3$  e  $\text{KCa}3.1$  é essencial para manter o potencial de membrana em aproximadamente  $-50$  mV, possibilitando a sinalização eficiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e ativação dos linfócitos T (FESKE; WULFF; SKOLNIK, 2015). Além do mais, os  $\text{Kv}1.3$  e os  $\text{KCa}3.1$  desempenham outras funções regulatórias nos linfócitos T, como proliferação, produção de citocinas e migração *in vivo* (CHANDY et al., 2001, 2004; CHIANG et al., 2017).



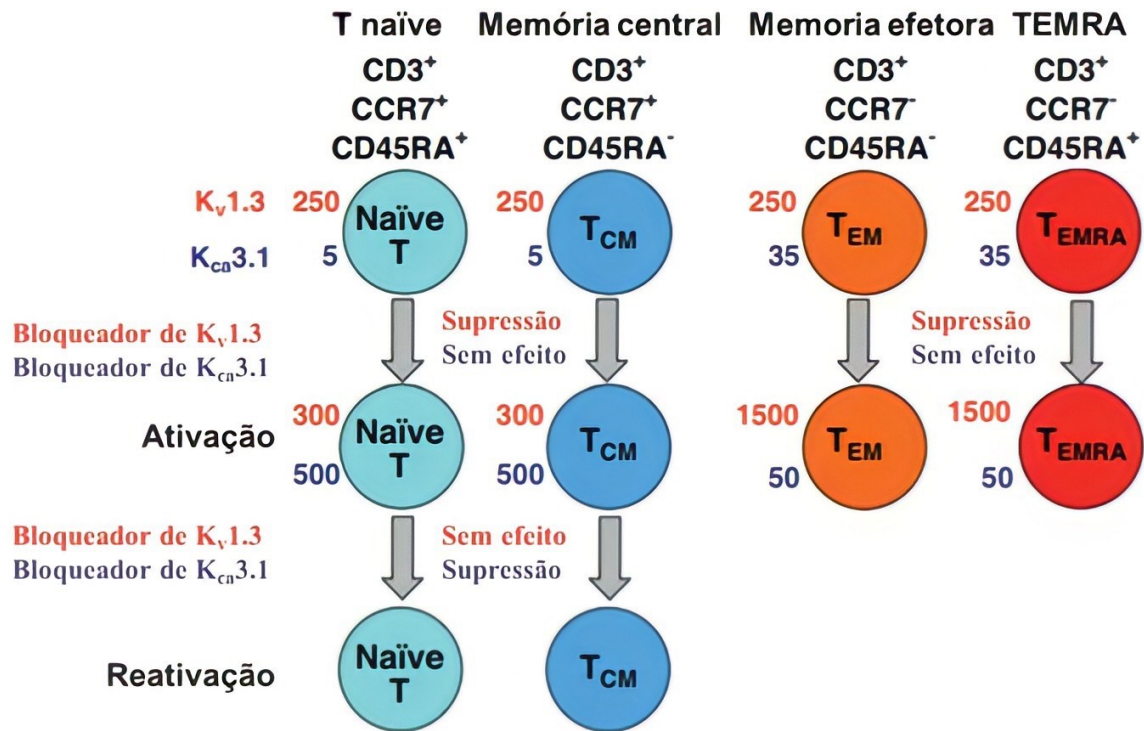
**Figura 3. O papel dos canais iônicos na ativação dos linfócitos T.** A estimulação do TCR por um antígeno específico (triângulo verde) ativa a via da PLC que aumenta as concentrações de  $\text{IP}_3$  no citosol, e liga nos receptores de  $\text{IP}_3$ , liberando  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo no citosol. O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induz a abertura dos canais CRAC (formado pela interação das proteínas STIM1 e ORAI1). O influxo de cálcio despolariza a membrana ativando os canais  $\text{Kv}1.3$  e  $\text{KCa}3.1$ , causando efluxo do  $\text{K}^+$ , e mantendo assim a força motriz que mantém a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta interação complexa da atividade dos canais iônicos gera um sinal característico de  $\text{Ca}^{2+}$  nos linfócitos T ativados. Figura modificada de (VARGA; TAJTI; PANYI, 2021).

Por serem mais específicos que os CRAC e por estarem altamente expressos em células que geram autorreatividade, os canais  $K_v1.3$  são alvos muito promissores na modulação da resposta imunológica mediada por linfócitos T, inclusive com a aprovação para uso clínico em 2017 da toxina da anêmona-do-mar do gênero *Stichodactyla*, a Dalazatida (previamente chamada de ShK-186), um potente bloqueador dos  $K_v1.3$  estudado para o tratamento de doenças autoimunes como lúpus eritematoso, psoríase, artrite reumatoide, doença de Crohn, diabetes tipo 1 e esclerose múltipla (TAJTI et al., 2020).

WULFF et al., 2003 estimaram o número de canais expressos em linfócitos de diferentes estágios de maturação, dividindo a corrente iônica em *whole-cell* pela corrente unitária (**fig. 4**). Linfócitos T naïve ( $T_N$ ) aqueles que nunca foram apresentados a nenhum antígeno, e linfócitos  $T_{CM}$  (T de memória central), que estão em fase de diferenciação, expressam entre 200 e 400 canais  $K_v1.3$  por célula, e entre 5 e 35 canais para potássio sensíveis a cálcio  $K_{Ca3.1}$  (WULFF et al., 2003).

Quando os linfócitos  $T_N$  e  $T_{CM}$  são ativados ou apresentados a antígenos, a expressão de canais  $K_{Ca3.1}$  aumenta sem que haja aumento significativo da expressão de  $K_v1.3$ . Em contrapartida, linfócitos T de memória efetora ( $T_{EM}$ ) e linfócitos T de memória efetora RA, que re-expressam CD45RA, um marcador de linfócitos T naïve ( $T_{EMRA}$ ), células que já foram apresentadas ao antígeno e se encontram no último nível de diferenciação, têm a expressão de  $K_v1.3$  aumentada para cerca de 1.800 canais/célula, sem que haja aumento expressivo dos canais  $K_{Ca3.1}$  (**Fig. 4**) (WULFF et al., 2003, 2004; WULFF; PENNINGTON, 2007). Em algumas doenças autoimunes, os linfócitos  $T_N$  autoantígeno específicos perdem a regulação imunológica e os eventos repetidos de estimulação por seu autoantígeno cognato levam essas células a se diferenciarem em células  $T_{EM}$  ou  $T_{EMRA}$ , principais responsáveis pelas doenças autoimunes relacionadas aos linfócitos T autorreativos.

Os canais  $K_v1.3$  são considerados alvos farmacológicos para o tratamento da perda de tolerância aos antígenos próprios, uma vez que o seu bloqueio é capaz de alterar a função de linfócitos  $T_{EM}$  e  $T_{EMRA}$  sem alterar as funções das células  $T_N$  e  $T_{CM}$ , que são mantidas pela função dos canais  $K_{Ca3.1}$ . Isso preveniria a imunossupressão dos pacientes, mantendo intacta a resposta a novos antígenos e tornando a terapia mais específica, com menos efeitos adversos (CHANDY; NORTON, 2017).



**Figura 4. Esquema do bloqueio seletivo de K<sub>v</sub>1.3 e K<sub>ca</sub>3.1 em linhagens de linfócitos T.** Números estimado de canais K<sub>v</sub>1.3 e K<sub>ca</sub>3.1 em linfócito T naïve, linfócito T<sub>CM</sub> e linfócito T<sub>EM</sub>, demonstrando o efeito dos bloqueadores específicos destes canais na função proliferativa e produção de citocinas. Figura modificada de (CHANDY; NORTON, 2017).

### 1.5. Corticoides

Os corticosteroides são uma classe de hormônios esteroides controlados pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) produzidos e secretados pelas glândulas adrenais em resposta ao hormônio adrenocorticotrófico pituitário (ACTH) e regulados pelo hormônio liberador de corticotropina hipotalâmico (CRH). Os principais corticosteroides produzidos pelo córtex adrenal são o cortisol (glicocorticóides) e a aldosterona (mineralocorticóides). O cortisol exerce seu efeito controlando o humor, o medo e a motivação e impedindo a liberação de mediadores da inflamação, enquanto a aldosterona controla principalmente as concentrações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> normais no sangue, o volume sanguíneo e a pressão arterial (SAMUEL; NGUYEN; CHOI, 2017).

Os glicocorticóides são fármacos amplamente utilizados na clínica médica, não apenas no tratamento de inflamações, mas também em diversas doenças autoimunes (KAPUGI; CUNNINGHAM, 2019). Por serem lipofílicos, os glicocorticoides são capazes de atravessar a bicamada lipídica da membrana celular, atuando diretamente sobre os receptores intracelulares específicos, ou podem ligar a receptores na própria membrana (GRZANKA et al., 2011). O complexo receptor-glicocorticoide pode agir diretamente no citosol da célula, causando efeito rápido, ou ser translocado para o núcleo, onde atuará na expressão gênica e, conseqüentemente, terá ação mais prolongada (JUSKO, 1995).

A ação dos glicocorticoides sobre o sistema imunológico ainda não foi totalmente elucidada, no entanto, acredita-se que agem interrompendo as vias de *up-regulation* do sistema imunológico, inibindo a apresentação de antígenos, a produção de citocinas e a proliferação de linfócitos (CAIN; CIDLOWSKI, 2017; SZATMARI; NAGY, 2008). A literatura mostra que após 4 horas de administração oral de glicocorticoides, se inicia um quadro de linfopenia transitória por indução da redistribuição de linfócitos circulantes na corrente sanguínea para outros compartimentos linfoides. Como estes linfócitos não são destruídos, mas sim redistribuídos, após 24 a 48 horas o quadro se normaliza através da redistribuição destes linfócitos da periferia para circulação (SAMUEL; NGUYEN; CHOI, 2017).

Outro mecanismo proposto sugere que os glicocorticoides sejam capazes de interferir diretamente nos linfócitos T, seja por inibir vias de sinalização dos TCR, como inibição da expressão de quinases envolvidas na sinalização dos TCR, ou por se ligar em receptores de glicocorticoides específicos de linfócitos T auxiliares e T reguladores (BASCHANT et al., 2011; WÜST et al., 2008).

O efeito anti-inflamatório mediado pelos glicocorticoides é multifatorial como a síntese da proteína anexina A1, supressora da fosfolipase A2, bloqueando então a produção de eicosanoides e inibindo ainda vários eventos inflamatórios leucocitários. O resultado final desse processo é a inibição da síntese de prostaglandinas e ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), potencializando o efeito anti-inflamatório (COUTINHO; CHAPMAN, 2011).

Embora os glicocorticoides apresentem potente efeito anti-inflamatório, antirreumático, antialérgico e imunossupressor, a utilização desses medicamentos não específicos em seu modo de ação resultam em vários efeitos adversos, principalmente nos tratamentos com altas dosagens ou de longa duração, tais como:



osteoporose, atrofia de pele, diabetes, obesidade abdominal, glaucoma, catarata, necrose avascular e infecção, retardo de crescimento e hipertensão, além do desenvolvimento de resistência aos glicocorticoides tecido-específica em tratamentos de longa duração (BARNES, 2010; RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2016)

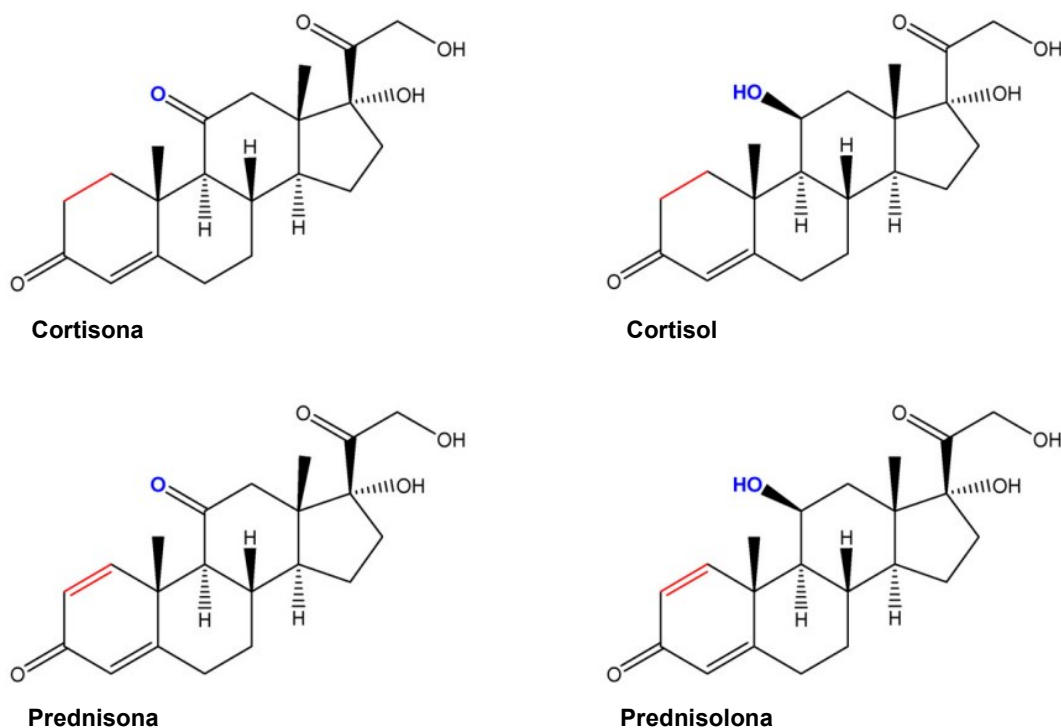
#### 1.5.1. Glicocorticoides sintéticos: prednisona e prednisolona

O cortisol é composto por um núcleo de ciclopentenoperhidrofenantreno, lipídio que dá origem aos esteroides, também chamado de gonano, formado por três anéis de 6 carbonos e um anel de pentano de 5 carbonos. O cortisol tem 21 átomos de carbono com uma cadeia lateral de 2 carbonos ligada à posição 17 e grupos metila nos carbonos C-10 e C-13 (**Fig. 5**). No início da década de 1950, foram realizadas modificações químicas em diversas posições da molécula de esteroides revelando uma série de características estruturais essenciais que propiciaram o surgimento de análogos sintéticos do cortisol com atividade glicocorticoide e/ou mineralocorticoide. A prednisona e prednisolona se diferenciam estruturalmente da cortisona e cortisol, glicocorticoides naturais, por possuírem uma ligação dupla extra localizada entre os carbonos C-1 e C-2 (**Fig. 5**) (SAMUEL; NGUYEN; CHOI, 2017).

A prednisona e a prednisolona são glicocorticoides metabolicamente interconversíveis. A prednisona é um pró-fármaco que precisa ser metabolizado em sua forma ativa, a prednisolona, pela  $11\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 ( $11\beta$ -HSD1) ou cortisona redutase, enzima de ação redutora também responsável por inativar a prednisolona ao transformá-la novamente em prednisona (IONITA; FAST; AKHLAGHI, 2009).

Embora os efeitos fisiológicos, farmacológicos e clínicos dos glicocorticoides sejam bem conhecidos, os mecanismos de ação exatos são incertos. Em doses farmacológicas, os glicocorticoides são usados principalmente por seus efeitos anti-inflamatórios e/ou imunossupressores. A dose oral usual de prednisona e prednisolona varia entre 5 – 60 mg / dia para o tratamento de condições inflamatórias, já para o tratamento de doenças autoimunes de grave prognóstico, como é o caso da esclerose múltipla em exacerbação aguda, a dose oral pode chegar a 1,25 g / dia (AGARWALA; VIJAYVARGIYA; PANDEY, 2021; MORROW et al., 2012). A prednisona administrada via oral é rapidamente convertida em prednisolona com os níveis de prednisolona séricos mensuráveis 30 minutos após a administração oral de

prednisona em humanos, alcançando picos de concentração plasmática entre 1 a 3 horas, e a meia-vida plasmática é de aproximadamente 3 horas (PICKUP, 1979).



**Figura 5. Diferença da estrutura molecular da cortisona, cortisol, prednisona e prednisolona.** Cortisona (C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>, peso molecular = 360,44), cortisol (C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>, peso molecular = 362,46), prednisona (C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>, peso molecular = 358,43) e prednisolona (C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>, peso molecular = 360,44). Figura modificada de (IONITA; FAST; AKHLAGHI, 2009).

Achados da literatura demonstram ação inibitória das correntes dos canais Kv1.3 por cortisona e hidrocortisona, com concentração de CE50 de 81.2±3.8 μM e 42.5±9.8 μM respectivamente (YU et al., 2015), e a inibição desses canais pela dexametasona (1 μM), um corticosteroide sintético (LAMPERT et al., 2003). A literatura não mostra a existência de trabalhos demonstrando a interação entre os glicocorticoides sintéticos prednisona e prednisolona e os canais Kv1.3.

## 2. JUSTIFICATIVA

O número de portadores de doenças autoimunes vem crescendo ao longo dos anos, este crescimento acompanha a urgência por elucidações no campo científico, que busca responder questões sobre a etiologia destas doenças e descobrir formulações mais efetivas e com menos efeitos adversos (DINSE et al., 2020).

Embora os glicocorticoides são utilizados como agentes imunossupressores no tratamento de doenças autoimunes, existe uma grande lacuna na compreensão dos mecanismos de ação, gerando um campo de investigação por serem medicamentos de múltiplos mecanismos, genômicos e não genômicos, com ação cruzada dos glicocorticoides com outros fatores de transcrição, ou até mesmo efeitos independentes dos receptores de glicocorticóides (CAIN; CIDLOWSKI, 2017; GALON et al., 2002).

Este estudo busca elucidar se o mecanismo imunossupressor dos glicocorticóides prednisona e prednisolona envolve o bloqueio direto dos canais Kv1.3, e se o tratamento de longa exposição é capaz de modular a expressão deste canal.

## 2.2. Resumo gráfico

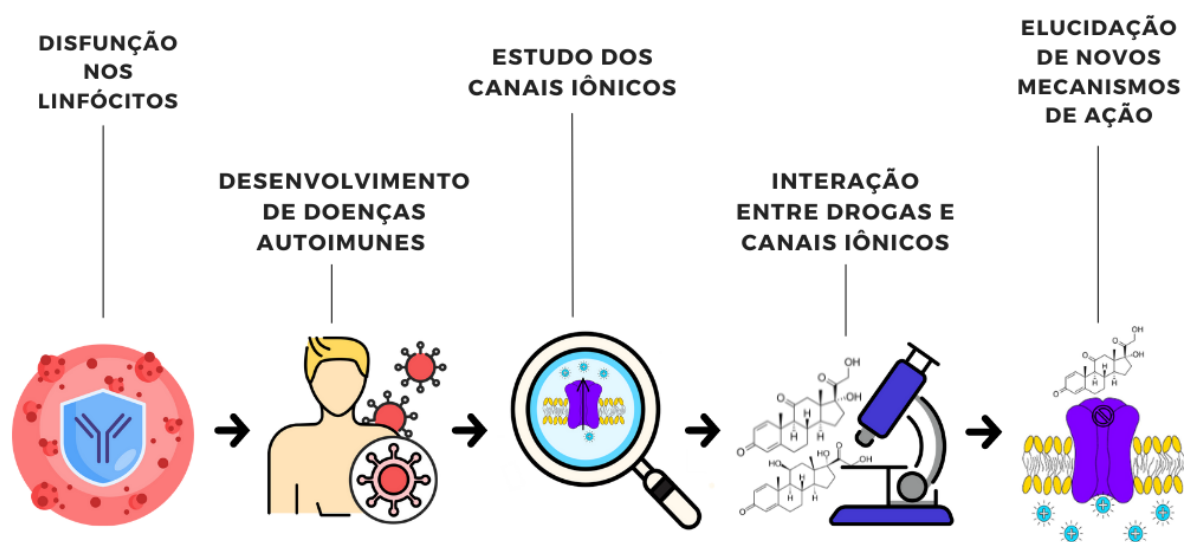


Figura 6. Resumo gráfico do trabalho. Autoria própria.

### 3. OBJETIVO

#### 3.2. Objetivo geral

Elucidar as alterações eletrofisiológicas causadas pela prednisona e prednisolona sobre os canais para  $K^+$   $K_v1.3$  na exposição aguda e prolongada, e a influência destes fármacos nos mecanismos imunossupressores.

#### 3.3. Objetivos específicos

- Estimar o bloqueio das correntes no pico e na corrente persistente dos canais  $K_v1.3$  pelos fármacos prednisona e prednisolona;
- Comparar a cinética das correntes dos canais  $K_v1.3$  na presença e ausência de prednisona e prednisolona;
- Avaliar se há recuperação das correntes dos  $K_v1.3$  após a inibição por prednisona e prednisolona;
- Avaliar a dependência de voltagem do bloqueio das correntes dos canais  $K_v1.3$  por prednisona e prednisolona no pico e na corrente persistente;
- Testar a dependência de concentração da prednisona e prednisolona nas correntes dos canais  $K_v1.3$ ;
- Compreender a influência de exposição prolongada aos glicocorticoides: prednisona e prednisolona no bloqueio das correntes por  $K_v1.3$ .

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

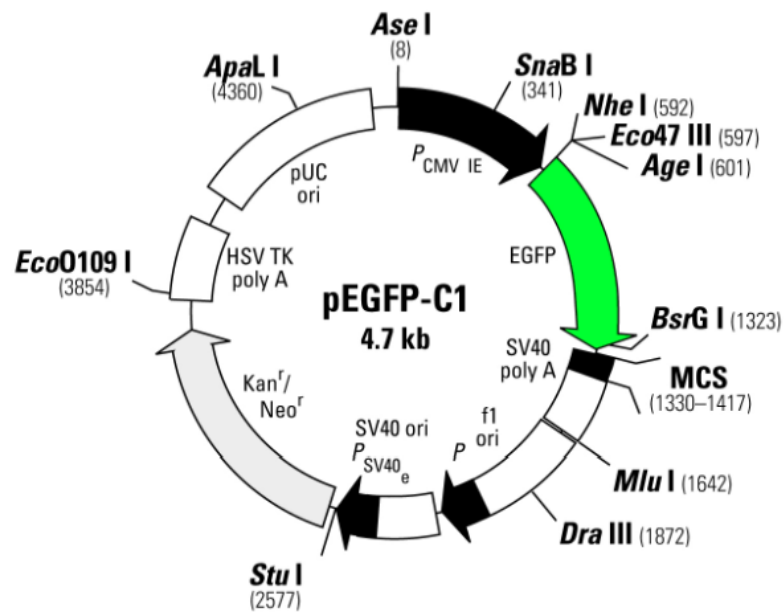
### 4.2. Cultivo celular

As células HEK293T foram cultivadas em garrafas para cultivo de células aderentes com 25 cm<sup>2</sup> em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a temperatura de 37°C. Sempre que as células atingiam aproximadamente 80% de confluência, elas eram transferidas para um frasco novo ou para placas de 24 poços (para a transfecção) com o auxílio de tripsina 0,05% diluída em PBS-EDTA (1 mM).

A linhagem de células de rim embrionário humano HEK293T é derivada das células HEK293, a diferença entre elas é que a HEK293T possui o antígeno T SV40 que permite amplificação de vetores contendo o promotor SV40, o que é o caso do plasmídeo pEGFP-C1 (**Fig. 7**), aumentando os níveis de expressão de proteínas durante a transfecção transiente. As células HEK293T também possuem altos níveis de replicação, consideradas modelo para expressão heteróloga de canais iônicos por possuírem baixa expressão constitutiva de canais e conseqüentemente correntes endógenas pequenas.

### 4.3. Transformação e transfecção

O canal Kv1.3 humano de tipo selvagem (*short version* de 523 aminoácidos #M85217) foi subclonado no plasmídeo pEGFP-C1 (**Fig. 7**) (VOROS et al., 2018) e gentilmente doado pelo pesquisador Dr Péter Hajdú do Departamento de Biofísica e Biologia Celular da Universidade de Debrecen por meio do *material transfer agreement* (MTA) número de autorização RH/602-7/2015 assinado pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e pela *Debrecen University*.



**Figura 7. Vetor pEGFP-C1 in frame com a proteína verde fluorescente EGFP.** O vetor pEGFP-C1 foi utilizado para inserir a sequência *short version* de cDNA do canal Kv1.3 humano.

As bactérias *Escherichia coli* K-12 NM522 termo competentes foram transformadas e utilizadas para amplificação do DNA plasmidial. Brevemente, as bactérias foram retiradas do freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e incubadas com o plasmídeo contendo o cDNA do canal em gelo por 30 minutos. Em seguida, submetidas a choque térmico por 30 segundos à  $42^{\circ}\text{C}$  e mantidas por mais 5 minutos no gelo. As bactérias foram incubadas no agitador tipo “shaker” (200 rpm,  $37^{\circ}\text{C}$ ) em meio 2XYT durante 60 minutos, e plaqueadas em meio LB ágar com o antibiótico canamicina para selecionar as bactérias transformadas.

Para isolar o DNA plasmidial das bactérias foi utilizado kit Pure Link Invitrogen®. O DNA foi quantificado em equipamento de Nanodrop ThermoFisher®, sua integridade e peso molecular foram verificados por eletroforese em gel com 1% de agarose com intercalante de DNA *blue green* (LGC biotecnologia).

As células HEK293T foram transfectadas com o plasmídeo contendo o clone do canal Kv1.3 *in frame* com a proteína verde fluorescente (Enhanced Green Fluorescent Protein - EGFP). A transfecção foi realizada em placas de 24 poços por mediação lipídica, na qual 2  $\mu\text{L}$  do reagente Lipofectamina 2000™ (LifeTechnologies®) e 0.8  $\mu\text{g}$  de DNA foram diluídos em dois tubos distintos contendo 50  $\mu\text{L}$  de meio Opti-MEM Gibco®, após 5 minutos de incubação a solução contendo o cDNA diluído foi

adicionado à lipofectamina diluída e o homogeneizado foi incubado por 20 minutos. Em seguida a alíquota foi adicionada ao poço contendo as células HEK293T que já estavam sendo cultivadas em meio DMEM alta glicose com 10% de SFB (500 uL) e incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C. Após 24 horas de transfecção as células foram repicadas e plaqueadas sobre lamínulas redondas de vidro de 13mm de diâmetro em placas de petri de 60 mm, e mantidas em meio de cultura até o momento do experimento. As células foram utilizadas em experimentos de eletrofisiologia entre 24 e 72 horas após a transfecção como descrito a seguir.

#### 4.4. Eletrofisiologia

Para avaliar as alterações eletrofisiológicas causadas pelos fármacos, as células expressando o canal Kv1.3 foram submetidas à técnica de *whole-cell voltage clamp*.

##### 4.4.1. Soluções eletrofisiológicas

Para os experimentos eletrofisiológicos foram utilizadas as soluções:

Solução interna, em mM: 50 KCl, 25 K-acetato, 55 KOH, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 Na-ATP, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7,2);

Solução externa, em mM: 125 NaCl, 10 NaOH, 10 KCl, 1,8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 glicose, 10 HEPES (pH 7,4).

##### 4.4.2. Diluição e preparação dos fármacos

Os fármacos prednisona e prednisolona (Sigma®) foram diluídas em DMSO. Devido à solubilidade, as concentrações foram limitadas pela concentração máxima de DMSO, que não ultrapassou 1%, por se tratar de um solvente citotóxico em concentrações superiores a 1,4% (SCHMIDT; LEE; AN, 1989).

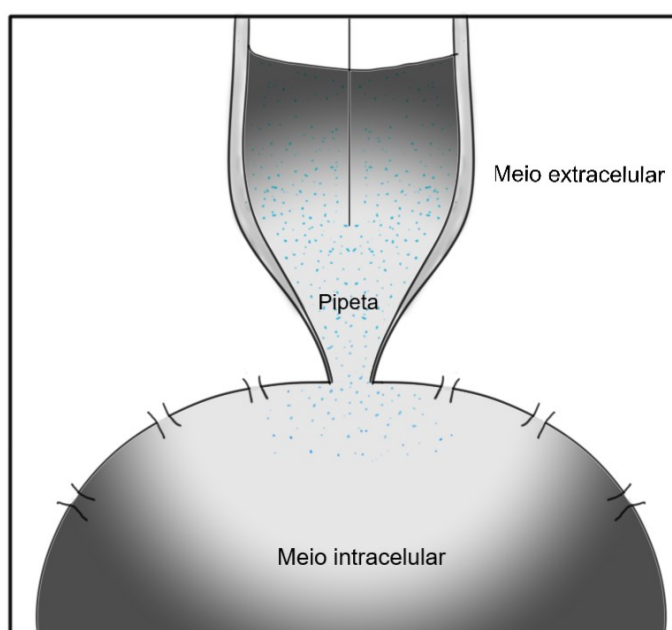


#### 4.4.3. Parâmetros eletrofisiológicos

Correntes macroscópicas foram registradas em temperatura ambiente (20-22°) utilizando a técnica de patch-clamp na configuração whole-cell (Hamill et al., 1981) usando um amplificador EPC-10 (Heka Instruments, Germany) conectado por meio de um conversor analógico-digital integrado à um computador.

Pipetas foram feitas de vidro comum utilizando um estirador de pipetas (*Sutter Instruments P-97*), com resistência entre 1,5 - 3 M $\Omega$ . As pipetas foram preenchidas com a solução interna descrita no item 4.4.1.

No momento dos experimentos, a lamínula contendo as células era colocada em uma placa de petri de 35 mm e o meio de cultura era trocado pela solução externa descrita no ítem 4.4.1. As células transfectadas e expressando o canal Kv1.3 eram escolhidas em microscópio invertido com sistema de fluorescência (ICX41 SunnyOptical®) e tocada com a pipeta. Um contato de altíssima resistência (G $\Omega$ ) era conseguido com uma leve pressão negativa no interior da pipeta. Uma pressão negativa adicional levava ao rompimento da membrana circunscrita pela mesma, criando um contato físico e elétrico entre o interior da pipeta e o interior da célula (*whole-cell*), permitindo o controle da voltagem e das correntes carregadas pelos canais iônicos presentes na membrana da célula (**Fig. 8**).



**Figura 8. Micropipeta de vidro tocando uma única célula em um registro de whole-cell.**  
Figura de autoria.

#### 4.4.4. Corrente x Voltagem (IV)

As células foram mantidas em um potencial de *holding* de -70 mV, pulsos variáveis de voltagem foram aplicados entre -70 mV e +60 mV (incremento de 10 mV), com duração de 500 milissegundos (ms) e frequência de amostragem de 20 KHz, em intervalos de 15 segundos, e as correntes geradas por eles foram registradas. Estes pulsos de voltagem crescente permitem analisar a relação entre a voltagem aplicada e a amplitude da corrente no pico e na corrente persistente, além de avaliar sua cinética. Durante o protocolo a solução externa acrescida com o carreador (DMSO, controle) ou com os fármacos prednisona (800  $\mu$ M) ou prednisolona (800  $\mu$ M) foram perfundidas sobre as células utilizando um sistema de perfusão (ALA Scientific Instruments®) e seu efeito registrado para posterior análise.

#### 4.4.5. Curso temporal

O protocolo de curso temporal foi construído com pulsos despolarizantes para +50 mV com 500 ms de duração e frequência de amostragem de 20 KHz, a cada 15 segundos, a partir de um potencial de *holding* de -70 mV. Durante o protocolo a solução externa acrescida com o carreador (DMSO, controle e lavagem) ou os fármacos prednisona (800  $\mu$ M) ou prednisolona (800  $\mu$ M) foram perfundidas sobre as células e seu efeito registrado para posterior análise.

#### 4.4.6. Curva concentração-efeito

Para determinar como os fármacos prednisona e prednisolona afetam os canais Kv1.3 foi construída uma curva de concentração-efeito. Para aquisição da curva foi utilizado o protocolo de curso temporal supracitado com perfusão dos fármacos nas seguintes concentrações de prednisona: 30  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 800  $\mu$ M, 1 mM e 2 mM; e prednisolona: 30  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 800  $\mu$ M e 2 mM. O ajuste dos pontos destas curvas pela equação 2 (sessão 4.5.1) foi usado para calcular o efeito máximo de ação de cada fármaco, e as concentrações capazes de produzir 50% do efeito máximo (CE<sub>50</sub>) sobre os canais Kv1.3.

#### 4.4.7. Efeito de longa exposição aos fármacos

Para melhor compreender se o efeito destes fármacos era somente sobre os canais Kv1.3 ou se havia algum efeito genômico, as células HEK293T foram transfectadas com o canal Kv1.3 e tratadas durante 24-30 horas com os fármacos prednisona (800  $\mu$ M) e prednisolona (800  $\mu$ M).

## 4.5. Análise dos dados

### 4.5.1. Equações

O *software* SigmaPlot® foi utilizado para construção dos gráficos e ajuste dos pontos pelas equações que se seguem.

#### IV (equação 1)

$$f = 1/(1 + \exp ((V_{1/2} - V_m)/K))$$

Onde  $V_m$  é o potencial da membrana,  $V_{1/2}$  é o potencial em que se observa 50% da corrente máxima e  $K$  é o fator de inclinação da curva.

#### Concentração-efeito (equação 2)

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{CE_{50}}\right)^{-Hillslope}}$$

Onde  $CE_{50}$  é a concentração que causa 50% do efeito máxima e *Hillslope* é o fator de inclinação.

### 4.5.2. Estatística

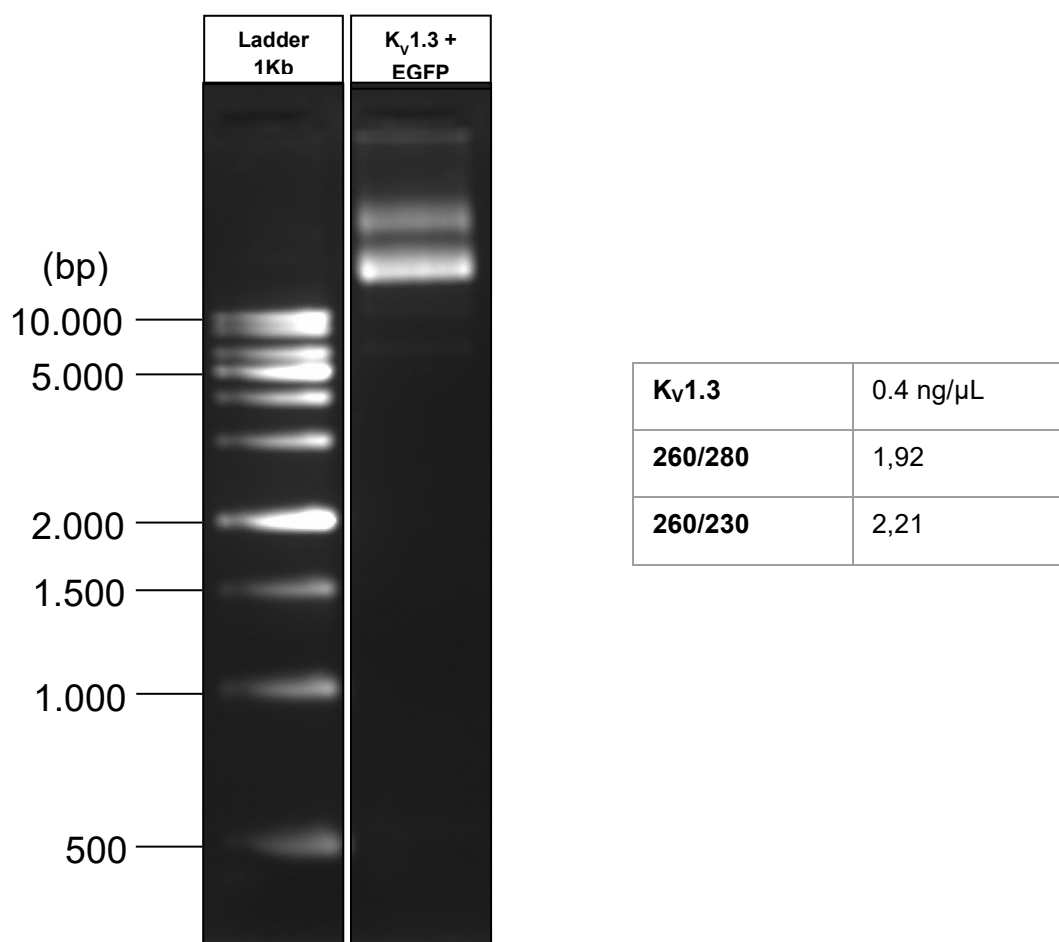
Para análises estatísticas, foi utilizado o *software* SigmaPlot®. Para comparações entre dois grupos foi utilizado o test-t. Para comparar mais de dois grupos foi utilizado o teste ANOVA. Os testes foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de  $P$  foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.2. Quantificação e integridade do plasmídeo pEGFP-C1- Kv1.3

Após a amplificação do plasmídeo pEGFP-C1-Kv1.3 em bactérias K-12 NM522 foi analisada a integridade, pureza e quantidade da amostra. Em espectrofotômetro Nanodrop® é possível avaliar a quantidade e pureza do DNA, através da relação de absorvância 260/280 e 260/230. Ácidos nucleicos têm absorvância máxima em 260 nm. De acordo com a literatura, a proporção 260/280 em torno de 1,8 é adequado para considerar o DNA “puro”. Valores abaixo desta proporção podem indicar contaminação por proteína, fenol ou outros reagentes associados aos protocolos de extração. Da mesma forma, a absorvância em 230 nm também é aceita como resultado de contaminação, a proporção 260/230 adequada é na faixa de 1,8 para considerar o DNA “puro” (DESJARDINS; CONKLIN, 2010). Valores abaixo desta proporção pode ser devida a contaminação com tiocianato.

O cDNA apresentou concentração de 1,4 µg/uL com taxa de pureza 1,92 (260/280) e 2,21 (260/230), indicando que o DNA estava livre de contaminação química, que poderia comprometer a eficiência da transfecção. Verificamos também a integridade do DNA através de eletroforese em gel de agarose 1% (**Fig. 9**), demonstrando a presença do DNA com bandas bem-marcadas, indicando plasmídeo circular, sem rastros ao longo do gel. O tamanho das bandas confere com o tamanho aproximado do clone contendo o canal, que por apresentar DNA circular possui um peso de 7.735 pb. Para melhor avaliar este parâmetro seria mais adequado linearizar o plasmídeo para se obter uma banda única.

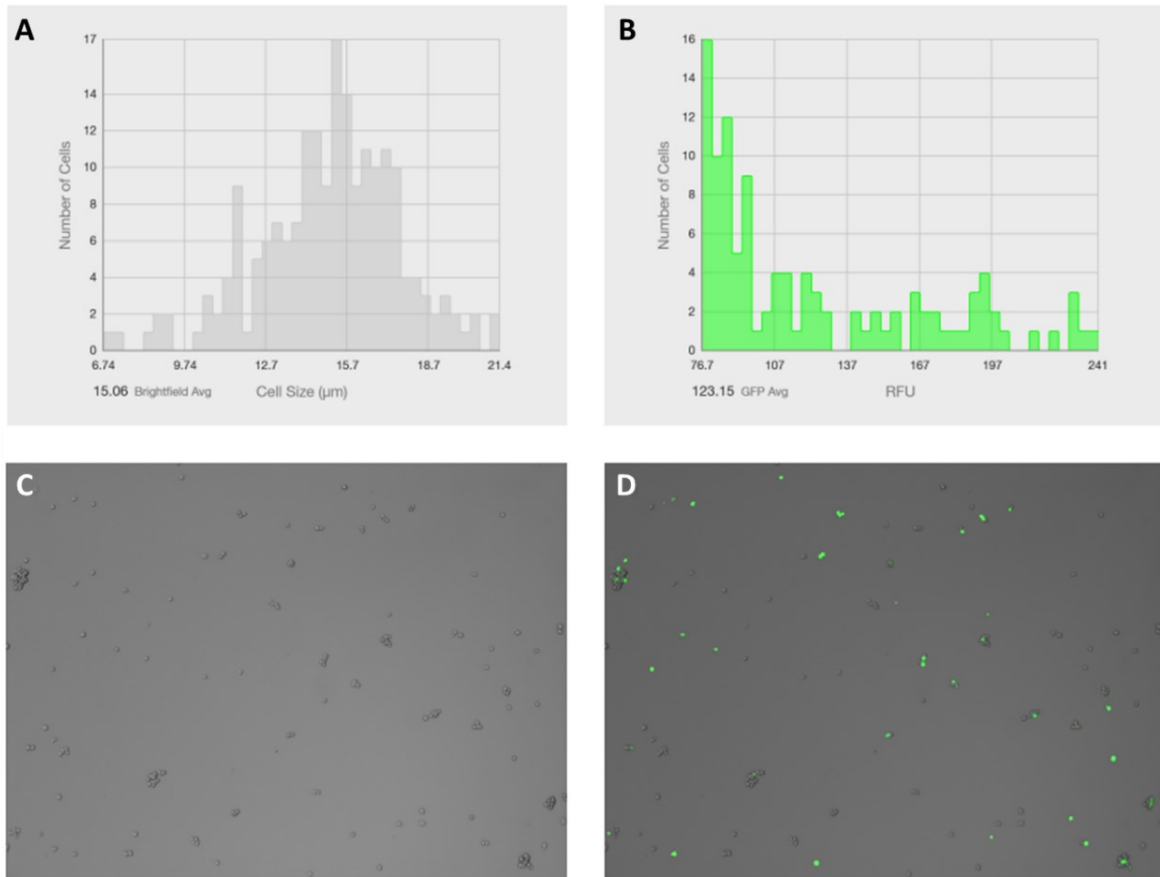


**Figura 9. Integridade, quantidade e indicadores de contaminação do cDNA do plasmídeo pEGFP-C1-K<sub>v</sub>1.3 após amplificação e purificação.** Do lado esquerdo da figura o gel de agarose 1%, na primeira coluna o padrão de DNA de 1Kb e na segunda coluna a amostra com com cDNA do pEGFP-C1-K<sub>v</sub>1.3. Do lado direito da figura, tabela representativa contendo a quantificação do cDNA do pEGFP-C1-K<sub>v</sub>1.3 em espectrofotômetro Nanodrop® e os indicadores de contaminação pela razão de absorvância 260/280 e 260/230.

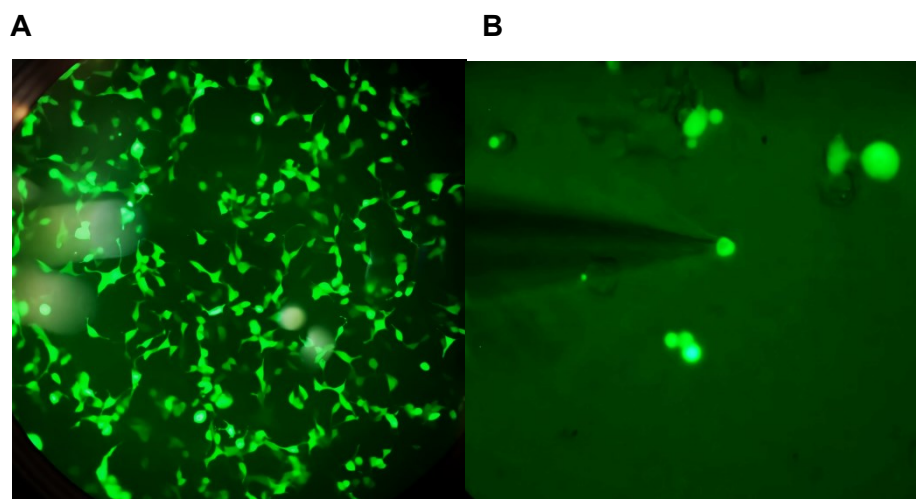
### 5.3. Parâmetros da transfecção com o cDNA do K<sub>v</sub>1.3

As células HEK293T foram transfectadas com o plasmídeo pEGFP-C1-K<sub>v</sub>1.3 com a sequência da proteína EGFP *in-frame*, para contagem de células fluorescentes e aquisição dos parâmetros relacionados ao tamanho das células e intensidade da fluorescência foi utilizado o contador de células automático Countess™ 3 FL (Invitrogen®). Para a amostra analisada o tamanho médio das células HEK293T foi aproximadamente 15,06 μm com a média de 123 unidades de fluorescência relativa

(RFU) (**Fig. 10**). O sucesso de transfecção foi de 55% de células, possibilitando que elas fossem facilmente identificadas em microscópio de fluorescência (**Fig. 11**).



**Figura 10. Parâmetros das células HEK293T transfectadas com Kv1.3.** Células HEK293T em contador automático de células fluorescentes. **(A)** Gráfico de dispersão pelo tamanho das células (tamanho médio = 15,06 μm). **(B)** Gráfico de dispersão pela intensidade de fluorescência (intensidade de fluorescência média RFU=123.15). Imagem das células sob luz transmitida (C) e sob luz UV (D) demonstrando 55% das células transfectadas.

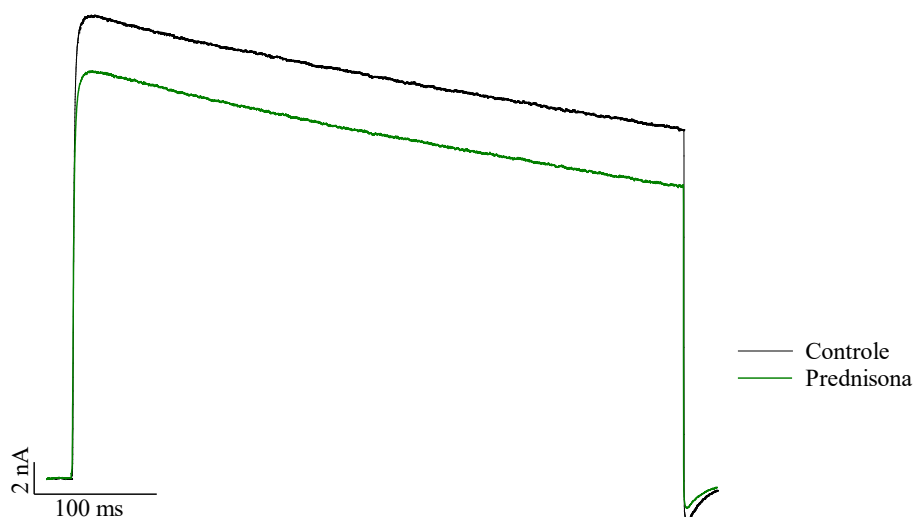


**Figura 11. Células HEK293T transfetadas com o canal Kv1.3 EGFP sob luz ultravioleta.** (a) Células HEK293T transfetadas expressando a proteína EGFP quando submetidas à luz UV do microscópio de fluorescência (aumento 40x). (b) Uma única célula transfetada sendo tocada por uma micropipeta de vidro (aumento 100x) utilizada nos experimentos eletrofisiológicos.

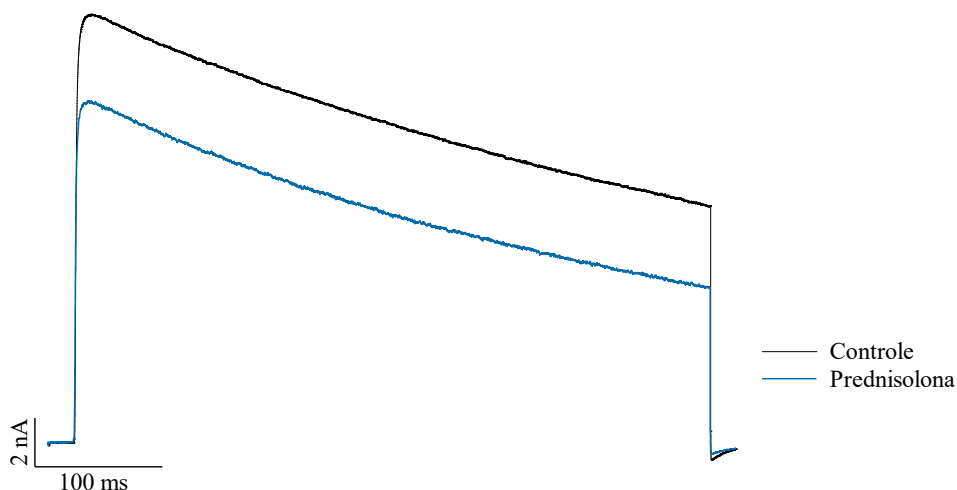
#### 5.4. Bloqueio dos canais Kv1.3 por prednisona e prednisolona

A figura 12 mostra o registro representativo da corrente que passa pelos canais Kv1.3 no pulso para +50 mV e seu bloqueio por prednisona (**Fig. 12**) ou prednisolona (**Fig. 13**). Em ambos os registros, o traço preto refere-se à corrente no controle, com rápida cinética de abertura e alcance da corrente máxima no início do pulso (pico da corrente), além de inativação muito lenta, fazendo com que a corrente se mantenha alta até o final do pulso (corrente persistente).



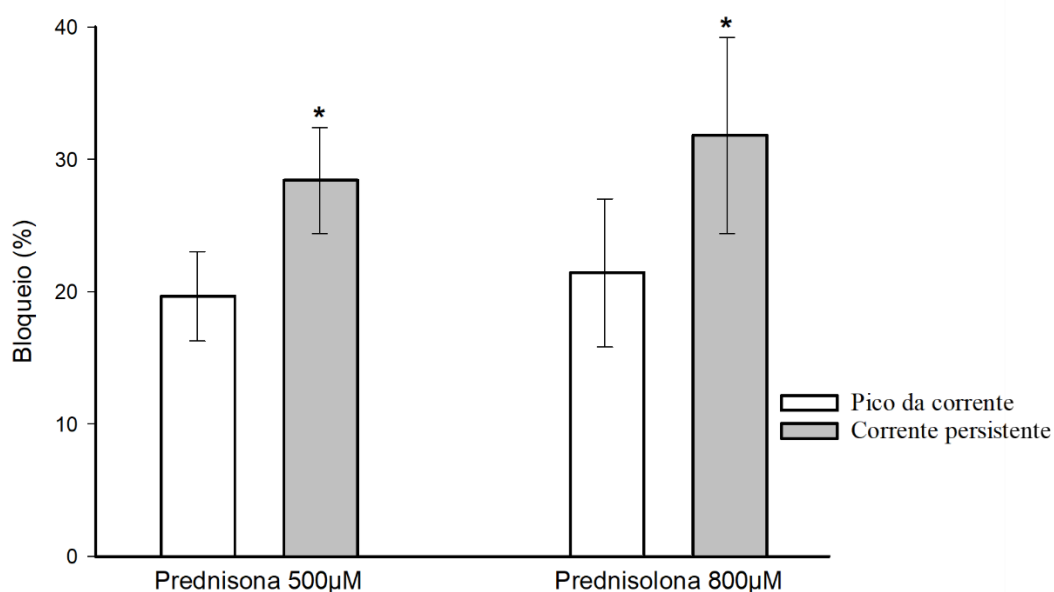


**Figura 12. Registro representativo mostrando o bloqueio dos canais Kv1.3 por prednisona.** As células, mantidas em potencial de *holding* de -70 mV, foi dado um pulso de +50 mV por 500 ms. Ambos os registros foram realizados na mesma célula nas mesmas condições na presença de perfusão controle (preto) ou prednisona 500  $\mu$ M (verde).



**Figura 13. Registro representativo mostrando o bloqueio dos canais Kv1.3 por prednisolona.** As células, mantidas em potencial de *holding* de -70 mV, foi dado um pulso de +50 mV por 500 ms. Ambos os registros foram realizados na mesma célula nas mesmas condições na presença de perfusão controle (preto) ou prednisolona 800  $\mu$ M (azul).

A figura 14 mostra a porcentagem de bloqueio das correntes de  $K^+$  no pico e na corrente persistente por prednisona e prednisolona no potencial de +50 mV a partir do potencial de *holding* -70 mV em células HEK293T transfectadas. Na presença da prednisona (500  $\mu$ M, n=5) foi observado bloqueio no pico da corrente de  $19,65 \pm 3,38$  % ( $p < 0,001$ ), e na corrente persistente de  $28,39 \pm 4,00$  % ( $p < 0,001$ ). Já a prednisolona (800  $\mu$ M, n=6) foi capaz de inibir o pico da corrente em  $21,41 \pm 5,6$  % ( $p < 0,05$ ) e a corrente persistente em  $31,8 \pm 7,4$  % ( $p < 0,05$ ). Tanto a prednisona como a prednisolona levaram ao bloqueio mais acentuado da corrente persistente em relação ao pico ( $p < 0,05$ ).

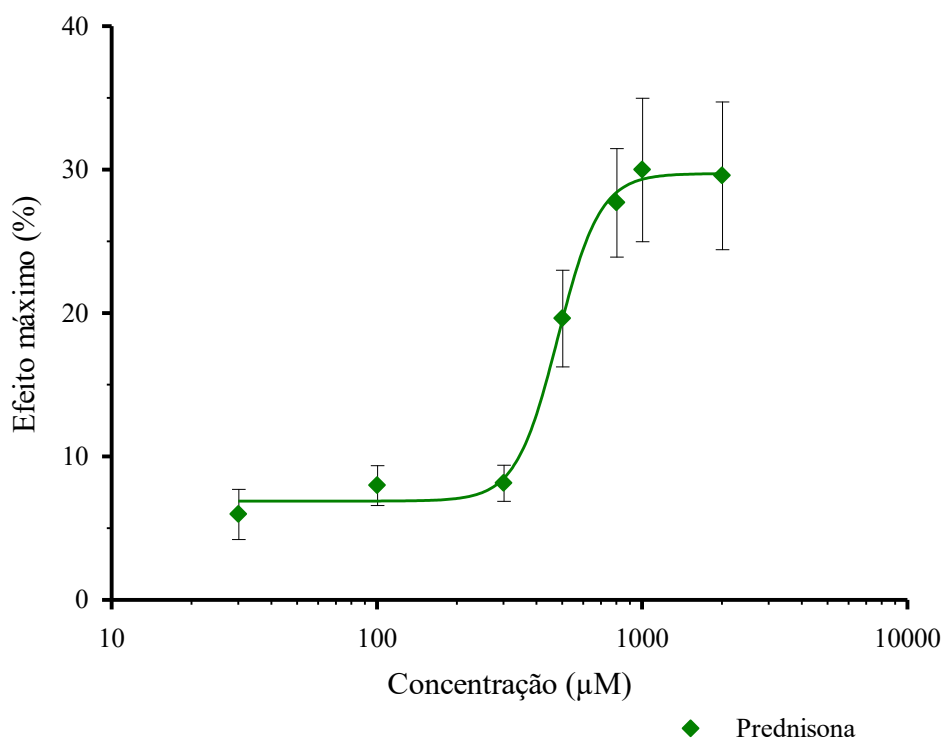


**Figura 14. Bloqueio dos canais  $Kv1.3$  por prednisona e prednisolona no pico e corrente persistente.** Porcentagem de bloqueio por prednisona 500  $\mu$ M (n=5) e prednisolona 800 $\mu$ M (n=6) no pico (barras brancas) e na corrente persistente (barras cinzas) durante um pulso despolarizante para +50 mV. As barras representam a média do bloqueio  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ .

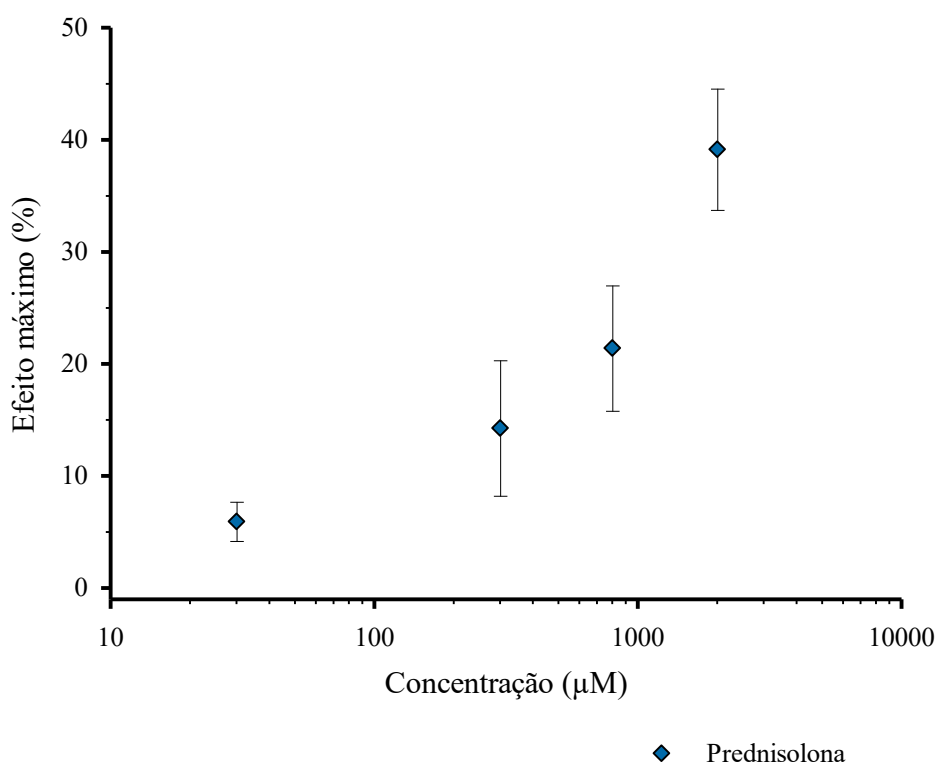
## 5.2. Curva concentração-efeito

Para avaliar como o bloqueio dos canais  $K_v1.3$  varia com a concentração, foi realizada a curva concentração-efeito. Para a prednisona foram utilizadas as concentrações de 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$ , 1 mM e 2 mM, mantendo sempre a concentração de DMSO em 1%. A concentração de prednisona que causou metade do efeito máxima ( $CE_{50}$ ) no pico da corrente foi 481,7  $\mu\text{M}$  (**Fig. 15**), com a inibição máxima de  $29,72 \pm 0,76$  %.

As concentrações de prednisolona utilizadas foram 30  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$  e 2 mM, mantendo sempre a concentração de DMSO em 1%. A curva concentração-efeito para prednisolona demonstrou comportamento exponencial, não alcançando o platô, tornando o valor de  $CE_{50}$  instável. Para não exceder a concentração máxima de DMSO (1%) não foi possível testar concentrações mais elevadas, capazes de atingir o platô de efeito máximo (**Fig. 16**).



**Figura 15. Curva concentração-efeito para prednisona no pico da corrente.** Efeito da prednisona 30  $\mu\text{M}$  (n=3), 100  $\mu\text{M}$  (n=4), 300  $\mu\text{M}$  (n=3), 500  $\mu\text{M}$  (n=6) 800  $\mu\text{M}$  (n=14), 1 mM (n=6) e 2 mM (n=4) no pico da corrente do canal  $K_v1.3$ .  $CE_{50}$ = 481,7  $\mu\text{M}$ , efeito máximo:  $29,72 \pm 0,76$  %.



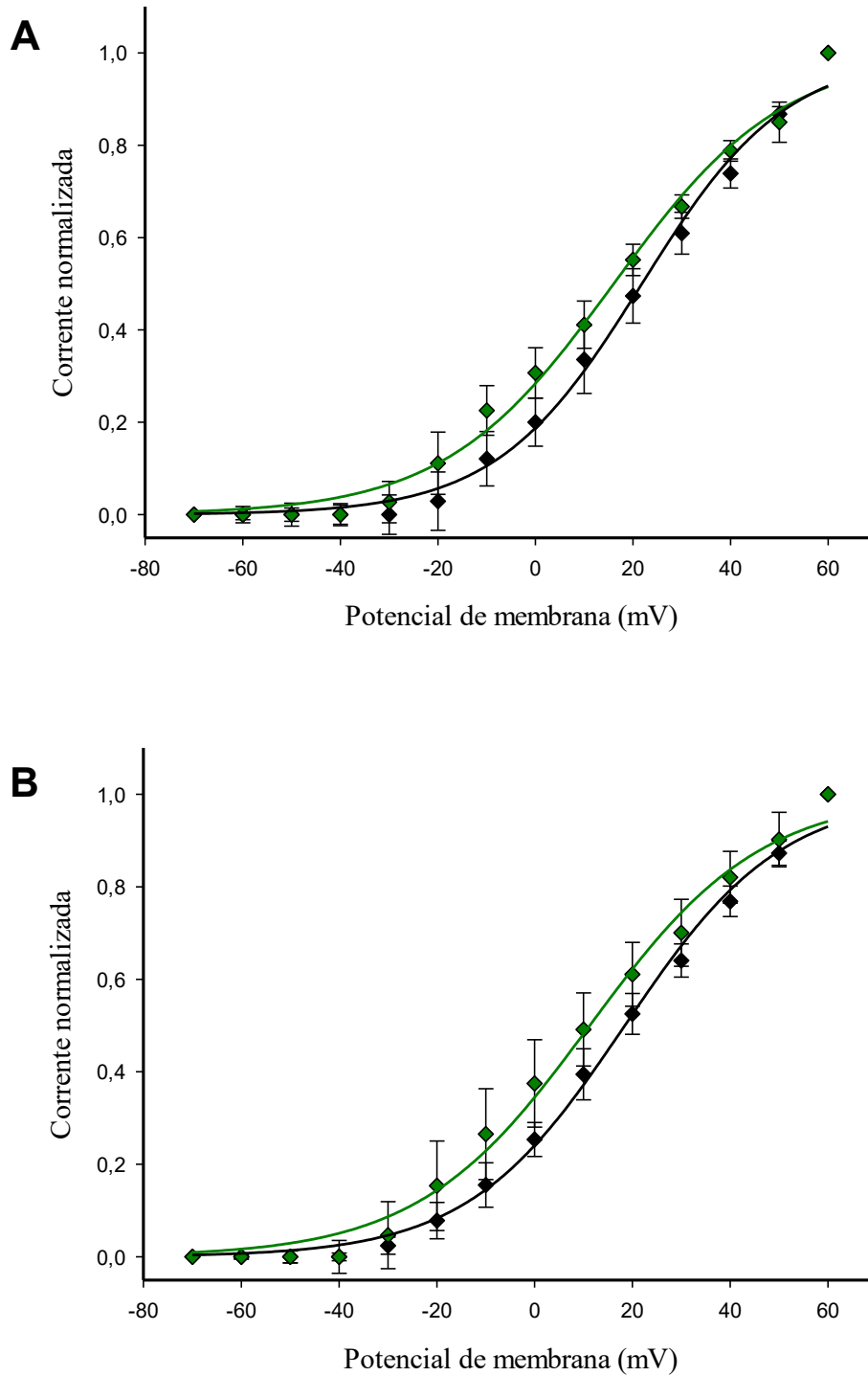
**Figura 16. Concentração-efeito para prednisolona no pico da corrente.** Efeito máximo da prednisolona 30 μM (n=4), 300 μM (n=3), 800 μM (n=6) e 2 mM (n=5) no pico da corrente do canal  $K_v1.3$ .

### **Dependência de voltagem do bloqueio das correntes do canal $K_v1.3$ por prednisona e prednisolona**

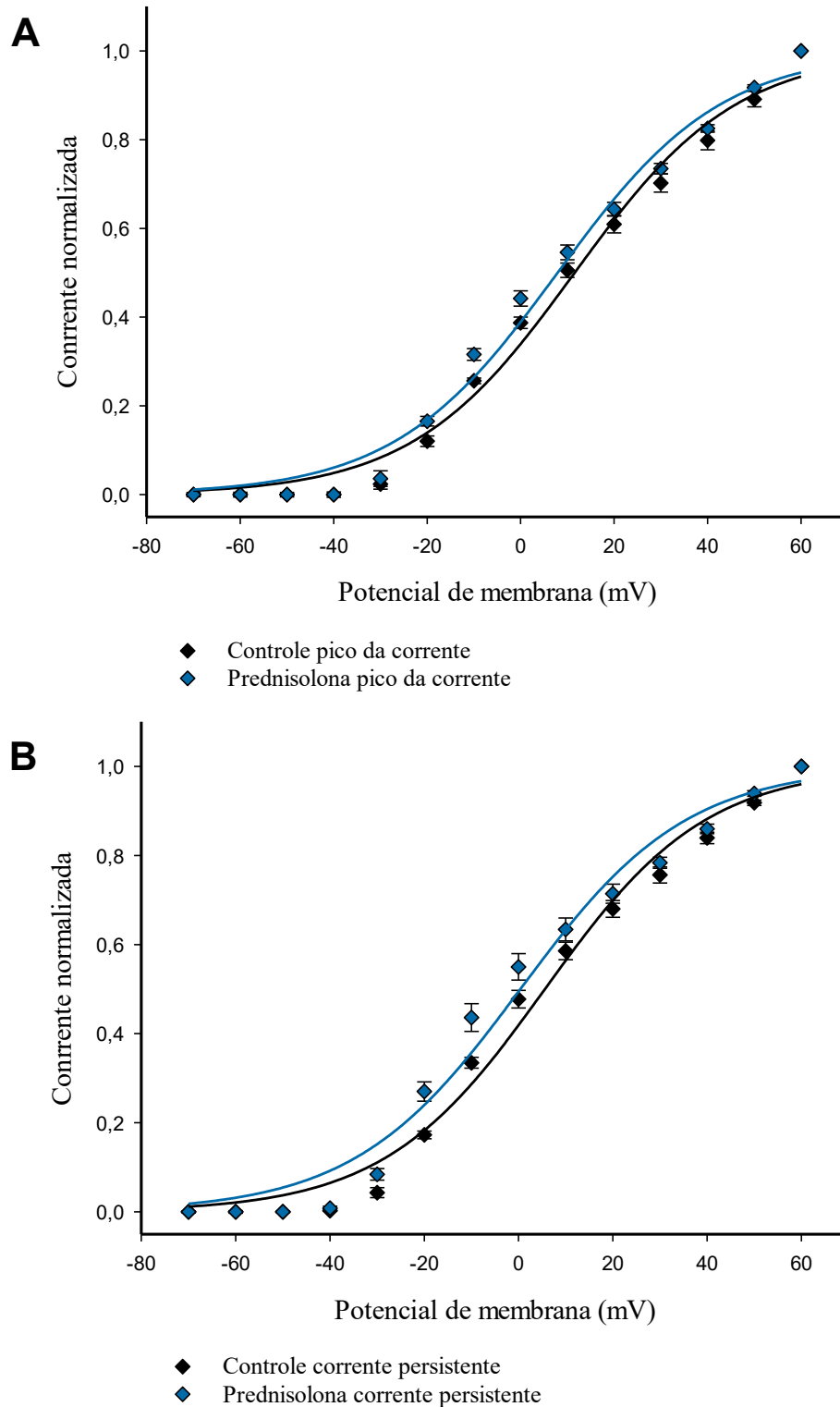
Para verificar se o bloqueio por prednisona e prednisolona era dependente de voltagem, foi realizado um protocolo para avaliar a corrente em relação à voltagem (IV), o aumento da corrente que acompanha o aumento da voltagem aplicada no interior da célula representa o recrutamento de mais canais para  $K^+$  na medida que seu interior fica mais positivo, somado à força motriz dos íons  $K^+$ , que são dependentes de suas concentrações intra e extracelular. A célula foi submetida ao protocolo IV durante a perfusão controle e durante a perfusão com os fármacos. Antes de iniciar o protocolo de IV foram realizados pulsos despolarizantes em +50 mV para garantir que as correntes haviam se estabilizado, tanto durante a perfusão controle como sob perfusão dos fármacos.

O potencial que ativou 50% dos canais ( $V_{1/2}$ ) no pico da corrente no controle foi de  $20,96 \pm 3,41$  mV ( $n=3$ ) e não foi significativamente diferente nos dados pareados com o bloqueio por prednisona  $800 \mu\text{M}$ ,  $V_{1/2} = 16,30 \pm 3,71$  mV ( $n=3$ ) (**Fig. 17a**). O fator de inclinação da curva (K) também não mostrou diferença significativa,  $14,94 \pm 1,33$  no controle e  $16,20 \pm 1,96$  na prednisona  $800 \mu\text{M}$ . Para a corrente persistente, o controle apresentou  $V_{1/2} = 18,35 \pm 3,25$  mV e  $9,60 \pm 6,33$  mV após o bloqueio por prednisona ( $800 \mu\text{M}$ ,  $n=3$ ), sendo o valor de K respectivamente  $15,75 \pm 0,49$  e  $K = 17,5 \pm 1,97$  (**Fig. 17b**), não sendo estatisticamente diferente ( $p > 0,05$ ).

Quando o bloqueio por prednisolona ( $800 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ) foi avaliado, o  $V_{1/2}$  no pico da corrente foi de  $7,92 \pm 0,88$  mV, comparado com o controle pareado de  $11,65 \pm 1,27$  mV. O valor de K foi  $17,25 \pm 0,58$  no controle e  $17,38 \pm 0,53$  após o bloqueio por prednisolona (**Fig. 18a**). Para a corrente persistente, o controle apresentou  $V_{1/2} = 5,63 \pm 1,15$  mV com  $K = 16,97 \pm 0,59$  e após o bloqueio por prednisolona ( $800 \mu\text{M}$ )  $V_{1/2} = 0,39 \pm 1,76$  mV e  $K = 17,31 \pm 0,62$  ( $n=6$ ) (**Fig. 18b**). O deslocamento das curvas de ativação para valores mais negativo na presença de prednisolona foi significativo ( $p < 0,05$ ), sem alterar a inclinação em ambas as análises ( $p > 0,05$ ).



**Figura 17. Relação corrente-voltagem do bloqueio por prednisona no pico e corrente persistente dos canais Kv1.3.** Dados pareados normalizados obtidos entre os potenciais de -70 e +60 mV com incremento de 10 mV quando perfundidas por solução controle ou na presença de prednisona 800  $\mu$ M **(a)** no pico da corrente; e **(b)** na corrente persistente. A curva foi ajustada utilizando a equação de Boltzmann (equação 1).

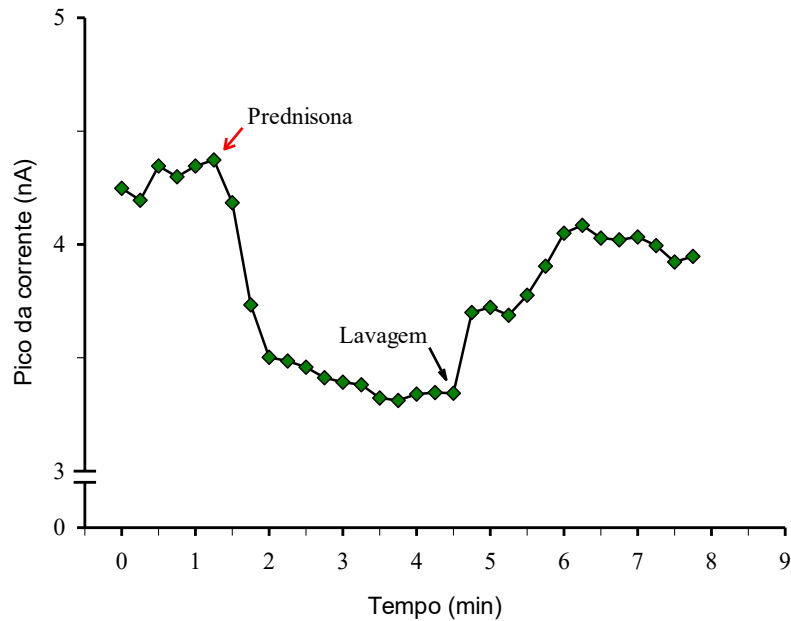


**Figura 18. Relação corrente-voltagem do bloqueio por prednisolona no pico e corrente persistente dos canais  $K_v1.3$ .** Dados pareados normalizados obtidos entre os potenciais de -70 e +60 mV com incremento de 10 mV quando perfundidas por solução controle ou na presença de prednisolona 800  $\mu\text{M}$  **(a)** no pico da corrente; e **(b)** na corrente persistente. A curva foi ajustada utilizando a equação de Boltzmann (equação 1).

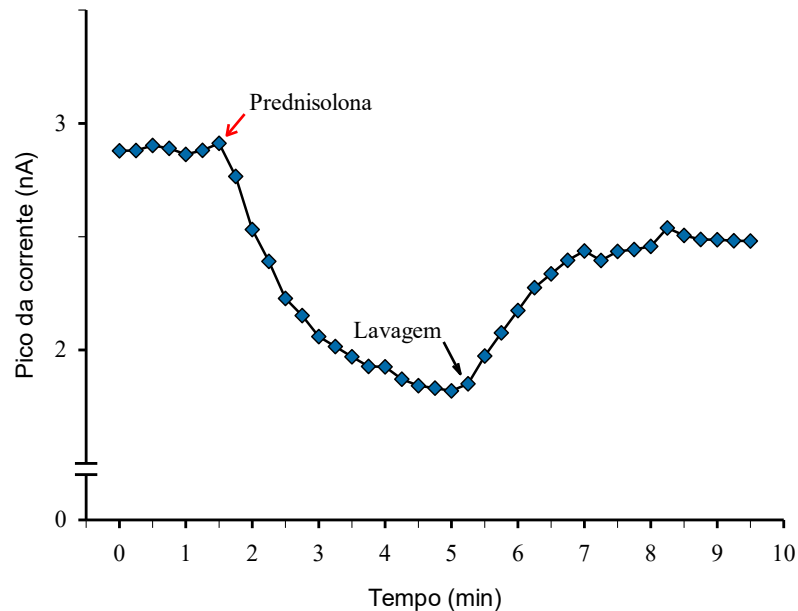
### 5.3. Recuperação da corrente

Para verificarmos se o bloqueio do canal pela prednisona (**Fig. 19**) e prednisolona (**Fig. 20**) era devido à ligação dos fármacos diretamente na superfície extracelular do canal ou se havia translocação dos mesmos para dentro da célula, foi analisado se o efeito poderia ser lavado pela perfusão controle e se a cinética de lavagem era consistente com uma ou outra hipótese. Nas células perfundidas por prednisona houve uma recuperação de  $93,36 \pm 1,02\%$  do pico da corrente em relação a corrente inicial após 3 minutos e 25 segundos de lavagem com solução externa (controle), enquanto nas células perfundidas pela prednisolona houve uma recuperação de  $86,46 \pm 0,40\%$  após 4 minutos e 25 segundos de lavagem, o que corrobora com a ligação dos fármacos na superfície externa do canal.





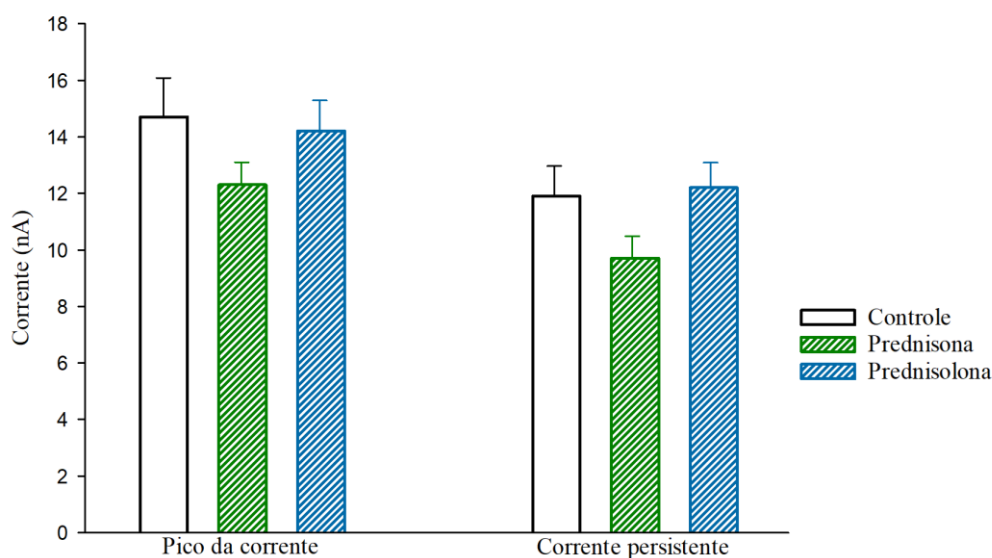
**Figura 19. Gráfico representativo do bloqueio e recuperação da corrente dos Kv1.3 após perfusão com prednisona.** Cada ponto representa um pulso despolarizante de +50 mV (500 ms) a partir do potencial de *holding* de -70 mV. Célula perfundida com prednisona (800  $\mu$ M) a partir da seta vermelha e com solução controle para lavagem a partir da seta preta.



**Figura 20. Gráfico representativo do bloqueio e recuperação da corrente dos Kv1.3 após perfusão com prednisolona.** Cada ponto representa um pulso despolarizante de +50 mV (500 ms) a partir do potencial de *holding* de -70 mV. Célula perfundida com prednisolona (800  $\mu$ M) a partir da seta vermelha e com solução controle para lavagem a partir da seta preta.

#### 5.4. Avaliação da resposta genômica da prednisona e prednisolona

A prednisona e a prednisolona são lipossolúveis e podem gerar respostas fisiológicas por mecanismos genômicos, uma vez que são capazes de atravessar a membrana celular. No intuito de testar se estes fármacos eram capazes de causar alterações nas correntes para  $K^+$  por mecanismos genômicos as células transfectadas foram tratadas 24-30 horas antes da realização dos experimentos com prednisona 800  $\mu\text{M}$  (n=14) e prednisolona 800  $\mu\text{M}$  (n=13) (**Fig. 21**). Não houve inibição significativa das correntes no pico ou na corrente persistente, pelos fármacos.



**Figura 21. Efeito do tratamento com prednisona ou prednisolona sobre o pico da corrente e corrente persistente do canal  $K_v1.3$ .** Os dados foram obtidos no potencial de +50 mV no pico e na corrente persistente. Os experimentos foram realizados com no mínimo 24 horas de tratamento com os fármacos: prednisona 800  $\mu\text{M}$  (n=14) e prednisolona 800  $\mu\text{M}$  (n=13), ou com DMSO 1% (controle, n=14).

## 6. DISCUSSÃO

Os glicocorticoides sintéticos prednisona e prednisolona são anti-inflamatórios com atividade imunossupressora, estes fármacos agem no organismo por dois mecanismos conhecidos, os genômicos e não genômicos. Os mecanismos genômicos clássicos dos glicocorticoides envolvem a ativação do receptor de glicocorticoide (GR) localizado no citosol da célula e a translocação deste receptor para o núcleo, regulando a expressão de genes capazes de interferir na ativação transcricional de proteínas importantes (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013). O mecanismo não genômico clássico dos glicocorticoides também é mediado pela ativação do GR presente no citosol ou na membrana, no entanto, este mecanismo é físico-químico e seu efeito se dá pela modulação na ativação de diversas quinases, um mecanismo muito mais rápido que o genômico (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013; RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2016).

Nossos experimentos foram realizados em células HEK293T, células que não expressam GR de forma constitutiva (AGRESTI et al., 2005; BLADH et al., 2005), portanto as alterações desencadeadas pelos glicocorticoides nos canais Kv1.3 expressos nessas células não é um mecanismo via GR.

A prednisona é considerada um fármaco inerte, que não tem efeito farmacológico até que seja biotransformada no fármaco ativo, a prednisolona, pela enzima 11 $\beta$ -HSD1. Células HEK293T não expressam 11 $\beta$ -HSD1 de forma constitutiva (ATANASOV et al., 2008), portanto, a ação da molécula de prednisona nos canais Kv1.3 expressos em HEK293T demonstrada em nossos resultados, não é devida à biotransformação em prednisolona, além disso, a grande diferença entre as curvas concentração-efeito corrobora em favor de moléculas distintas.

A cinética da corrente dos canais Kv1.3 é marcada pela rápida ativação, com alcance do pico da corrente em milissegundos, e inativação lenta do tipo C, que perdura por mais de 200 ms no potencial de +50 mV, e é causada por um rearranjo na região externa do poro (PÉREZ-GARCÍA; CIDAD; LÓPEZ-LÓPEZ, 2018). A inativação desses canais pode assumir comportamento cumulativo, que é a inativação do canal por despolarizações repetidas com intervalos curtos resultando na perda gradual da corrente, também chamada de *run-down* (TAJTI et al., 2021). Nossos experimentos limitaram a frequência de despolarizações com intervalos de 15

segundos entre os pulsos para minimizar o *run-down* e permitir a recuperação da inativação e assim avaliar o efeito da prednisona e da prednisolona na cinética das correntes por um protocolo de longa despolarização (500 ms). Esta despolarização leva os canais Kv1.3 do estado fechado para o estado aberto, culminando no pico da corrente, que inativa de forma gradual e incompleta ao longo do pulso, permanecendo uma corrente residual no final pulso, a corrente persistente. Para concentração próxima de CE<sub>50</sub> a prednisona (500 µM) (**Fig 12**) foi capaz de bloquear o pico da corrente em 19,65±3,38 % e a corrente persistente em 28,39±4,00 %. e a prednisolona (800 µM) (**Fig 13**) foi capaz de bloquear o pico da corrente em 21,42±5,60 % e a corrente persistente em 31,81±7,40 %, em ambos os casos, o bloqueio da corrente persistente foi maior que o bloqueio no pico ( $p < 0,05$ ), indicando que os fármacos sejam capazes de acelerar a inativação da corrente. (**Fig 14**). Este bloqueio dos canais Kv1.3 pelos fármacos testados neste estudo sugere que estes favoreçam o estado inativado do canal, o que é consistente com o bloqueio mais significativo da corrente persistente.

A prednisona e prednisolona, foram capazes de bloquear os canais Kv1.3 de forma dependente de concentração. A concentração de prednisona que causou metade do efeito máximo foi 481,7 µM (n=38) (**Fig 15**). Para que a concentração máxima de DMSO não excedesse 1%, não foi possível chegar em uma diluição com concentração de prednisolona que atingisse o platô do efeito máximo, o que resultou no comportamento exponencial da curva concentração-efeito para prednisolona, impossibilitando a determinação precisa do CE<sub>50</sub> (**Fig. 16**).

Nossos resultados demonstraram a necessidade da utilização de concentrações relativamente altas dos fármacos prednisona e prednisolona para observar as respostas *in vitro* nos canais Kv1.3. Seria inviável realizar a conversão das doses *in-vitro* para concentrações *in-vivo* devido as inúmeras variáveis relacionadas à biodistribuição, metabolismo e excreção dos fármacos, no entanto, estas concentrações mais altas parecem ser utilizadas também na clínica médica para o tratamento de condições imunológicas graves, chegando a 1250 mg / dia, uma dose consideravelmente maior que a utilizada para o tratamento de condições inflamatórias (5 – 60 mg / dia).

O bloqueio das correntes também foi analisado quanto à dependência de voltagem. O bloqueio por prednisona demonstrou ser voltagem-independente por não ser capaz de deslocar o  $V_{1/2}$  ou alterar a inclinação da curva (K) em relação a corrente controle nem para o pico da corrente nem para corrente persistente (**Fig.17a, b**). Já a prednisolona (**Fig.18a, b**) demonstrou bloqueio dependente de voltagem ( $p < 0,05$ ), deslocando significativamente o  $V_{1/2}$  do pico em  $\sim 3,73$  mV e da corrente persistente em  $\sim 5,24$  mV, ambos para um potencial mais negativo e sem alterar a inclinação da curva (K). A modificação da dependência de voltagem pela prednisolona e não pela prednisona pode ser devido a diferença de polaridade entre as duas moléculas, sendo a prednisolona mais polar com coeficiente de partição teórico 10x menor que o da prednisona (HARGET; ELLIS, 1989). É possível que as regiões polares da prednisolona estejam interagindo com os aminoácidos carregados do segmento S4 do canal, causando alterações na dependência de voltagem.

Experimentos realizados por Marom e Levitan (1994) nos canais  $K_v1.3$  na década de 90 demonstraram que a inativação dos canais  $K_v1.3$  pode ocorrer a partir de um estado fechado, antes da abertura do canal. O estudo de VARGA et al. (2001) mostrou que a melatonina é capaz de deslocar o  $V_{1/2}$  para valores mais negativos tanto na corrente de ativação como na corrente de inativação, demonstrando mais uma vez que a inativação de  $K_v1.3$  está acoplada à ativação do canal. A prednisolona demonstrou alterar o  $V_{1/2}$  tanto do pico quanto da corrente persistente para potenciais mais negativos sem alterar o (K), sugerindo que este fármaco tenha maior afinidade ao estado inativado dos canais e provavelmente permanece ligada quando os canais se abrem no pulso despolarizante, o que justifica o bloqueio da corrente persistente ser maior que a corrente do pico.

A prednisona e a prednisolona são lipossolúveis, possuindo a capacidade de atravessar a membrana celular, podendo modular a corrente dos canais  $K_v1.3$  pela via extra ou intracelular. Analisando o comportamento do bloqueio ao longo do tempo por prednisona e prednisolona, vimos que o mesmo foi rápido e reversível (**Fig. 19, 20**). A recuperação completa das correntes provavelmente não foi atingida provavelmente ao *run-down* da corrente. A velocidade de inibição da corrente e a reversibilidade do efeito bloqueador sugerem a ligação dos fármacos na superfície do canal. Esse dado, porém, não descarta a possibilidade do mecanismo genômico também estar acontecendo.

Existem alguns estudos que relacionam o tratamento de longa exposição por corticoides e a inibição dos canais Kv1.3, como é o caso do estudo de (LAMPERT et al., 2003) em que foram realizados pré-tratamentos com dexametasona 2-3 h ou 24 h antes dos experimentos, demonstrando inibição da corrente dos canais Kv1.3 em linfócitos T Jurkat, embora o pré-tratamento de longa exposição tenha levado à inibição das correntes, o estudo não aborda a sinalização que medeia este efeito, não deixando claro ser um mecanismo genômico ou não genômico. Já o estudo de Villalonga et al. (2010), tratou macrófagos expressando o canal Kv1.3 por 24 h com dexametasona e demonstrou alterações na expressão de canais Kv1.3 via mecanismos genômicos consequentes do tratamento de longa exposição,

Nos nossos resultados o pré-tratamento de longa exposição com prednisona 800  $\mu$ M e prednisolona 800  $\mu$ M em células HEK293T expressando o canal Kv1.3, não inibiu de forma significativa o pico da corrente nem a corrente persistente, mais uma vez indicando que a interação entre os Kv1.3 e estes glicocorticoides acontece de forma não genômica, direta na superfície do canal (**Fig. 21**).

Segundo Chandy et al. (2017), o bloqueio específico dos canais Kv1.3 em linfócitos T<sub>EM</sub> e T<sub>EMRA</sub> é fundamental para supressão da resposta autoimune, uma vez que os K<sub>Ca</sub>3.1 não conseguem suprir o efluxo de potássio para o funcionamento dessas células, ocasionando em sua senescência. Eles mostraram também que o bloqueio dos Kv1.3 em células que serão importantes para o bom funcionamento do sistema imunológico como os linfócitos T<sub>N</sub> e T<sub>CM</sub>, têm suas funções preservadas pelos canais K<sub>Ca</sub>3.1. Nossos resultados mostraram que a prednisolona, embora não tenha capacidade de bloquear completamente as correntes que passam através dos canais Kv1.3, consegue deslocar a dependência de voltagem destes canais, possibilitando que eles se abram em potenciais mais negativos, no entanto, com correntes reduzidas pelo bloqueio. Embora a prednisolona tenha deslocado a curva de ativação para valores mais negativos, a força motriz para a saída de K<sup>+</sup> não é favorecida nesses potenciais, o que deve ter gerado pouco impacto no potencial da membrana. A diferença no percentual de bloqueio da corrente no pico e a persistente, sugere que os fármacos se liguem ao estado aberto, deslocando o canal para o estado inativado, que seria o mecanismo de bloqueio proposto.

Para que o pudéssemos analisar a influência do bloqueio dos Kv1.3 por estes fármacos na função imunológica contra antígenos próprios e não próprios, seria necessário o estudo do bloqueio diretamente em linfócitos T extraídos de

camundongos, e a avaliação das alterações na expressão dos Kv1.3 e K<sub>Ca</sub>3.1, assim, poderíamos inferir sobre participação dos glicocorticoides na imuno modulação via Kv1.3 *in vivo*.

## 7. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que tanto a prednisona como a prednisolona são capazes de bloquear os canais  $K_v1.3$  acelerando a cinética de inativação das correntes. Até o momento não existiam estudos demonstrando a interação entre estes fármacos e os canais  $K_v1.3$ .

O bloqueio dos  $K_v1.3$  por prednisona e prednisolona foi rápido, reversível e não genômico, sugerindo a ligação direta entre estes fármacos e os canais.

Este estudo mostrou que a prednisona é mais eficiente que a prednisolona no bloqueio dos canais  $K_v1.3$ , o que não era esperado, uma vez que a prednisona se comporta como pró-fármaco, inerte no organismo antes da biotransformação.

A prednisolona demonstrou bloquear estes canais de maneira dependente de voltagem com maior afinidade pelo estado inativado do canal.

Este estudo mostra a necessidade de melhor compreender a interação entre prednisona e prednisolona e os canais  $K_v1.3$  e sua influência nos mecanismos imunomoduladores desses fármacos.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADER, C. et al. A structural link between inactivation and block of a K<sup>+</sup> channel. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, n. 6, p. 605–612, jun. 2008.

AGARWALA, S. R.; VIJAYVARGIYA, M.; PANDEY, P. Avascular necrosis as a part of “long COVID-19”. **BMJ case reports**, v. 14, n. 7, p. e242101, 2 jul. 2021.

AGRESTI, A. et al. GR and HMGB1 Interact Only within Chromatin and Influence Each Other's Residence Time. **Molecular Cell**, v. 18, n. 1, p. 109–121, 1 abr. 2005.

ATANASOV, A. G. et al. Direct protein-protein interaction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 8, p. 1536–1543, ago. 2008.

BARNES, P. J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, n. 2–3, p. 76–85, maio 2010.

BARRESE, V.; STOTT, J. B.; GREENWOOD, I. A. KCNQ-Encoded Potassium Channels as Therapeutic Targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 58, p. 625–648, 6 jan. 2018.

BARROS, F. et al. New Structures and Gating of Voltage-Dependent Potassium (Kv) Channels and Their Relatives: A Multi-Domain and Dynamic Question. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 248, 10 jan. 2019.

BASCHANT, U. et al. Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 48, p. 19317–19322, 29 nov. 2011.

BLADH, L.-G. et al. Identification of Target Genes Involved in the Antiproliferative Effect of Glucocorticoids Reveals a Role for Nuclear Factor- $\kappa$ B Repression. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 3, p. 632–643, 1 mar. 2005.

BURT, R. K.; VERDA, L. 68 - Immune Reconstitution. Em: LANZA, R. et al. (Eds.). **Handbook of Stem Cells**. Burlington: Academic Press, 2004. p. 745–761.

CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 233–247, abr. 2017.

CATTERALL, W. A.; LENAUEUS, M. J.; GAMAL EL-DIN, T. M. Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 60, n. 1, p. 133–154, 6 jan. 2020.

CHANDY, K. G. et al. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 160, n. 2, p. 369–385, 1 ago. 1984.

CHANDY, K. G. et al. Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxicology**, v. 39, n. 9, p. 1269–1276, set. 2001.

CHANDY, K. G. et al. K<sup>+</sup> channels as targets for specific immunomodulation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 5, p. 280–289, maio 2004.

CHANDY, K. G.; NORTON, R. S. Peptide blockers of Kv1.3 channels in T cells as therapeutics for autoimmune disease. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 38, p. 97–107, jun. 2017.

CHEN, R. et al. Peptidomimetic Star Polymers for Targeting Biological Ion Channels. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0152169, 2016.

CHIANG, E. Y. et al. Potassium channels Kv1.3 and KCa3.1 cooperatively and compensatorily regulate antigen-specific memory T cell functions. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14644, abr. 2017.

COUTINHO, A. E.; CHAPMAN, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 1, p. 2–13, 15 mar. 2011.

CRETNEY, E.; KALLIES, A.; NUTT, S. L. Differentiation and function of Foxp3+ effector regulatory T cells. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 2, p. 74–80, 1 fev. 2013.

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 45, p. 2565, 22 nov. 2010.

DINSE, G. E. et al. Increasing Prevalence of Antinuclear Antibodies in the United States. **Arthritis & Rheumatology**, v. 72, n. 6, p. 1026–1035, 2020.

DOLPHIN, A. C. et al. Introduction to the Theme “Ion Channels and Neuropharmacology: From the Past to the Future”. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 60, n. 1, p. 1–6, 6 jan. 2020.

DOMINGUEZ-VILLAR, M.; HAFNER, D. A. Regulatory T cells in autoimmune disease. **Nature Immunology**, v. 19, n. 7, p. 665–673, jul. 2018.

FESKE, S.; WULFF, H.; SKOLNIK, E. Y. Ion channels in innate and adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 33, p. 291–353, 2015.

GALON, J. et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 1, p. 61–71, jan. 2002.

GRZANKA, A. et al. Molecular mechanisms of glucocorticoids action: implications for treatment of rhinosinusitis and nasal polyposis. **European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery**, v. 268, n. 2, p. 247–253, fev. 2011.

GUDLUR, A.; ZHOU, Y.; HOGAN, P. G. STIM-ORAI interactions that control the CRAC channel. **Current Topics in Membranes**, v. 71, p. 33–58, 2013.

GUTMAN, G. A. et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 473–508, dez. 2005.

HARGET, A. J.; ELLIS, D. S. Classification of Steroid Partition Coefficients by a Pattern Recognition Technique. **Croatia Chemica Acta**, v. 62, n. 3, p. 449–458, 10 out. 1989.

IONITA, ILEANA. A.; FAST, DOUGLAS. M.; AKHLAGHI, F. Development of a sensitive and selective method for the quantitative analysis of cortisol, cortisone, prednisolone and prednisone in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 8–9, p. 765–772, mar. 2009.

JUSKO, W. J. Pharmacokinetics and receptor-mediated pharmacodynamics of corticosteroids. **Toxicology**, v. 102, n. 1–2, p. 189–196, 1 set. 1995.

KAMRADT, T.; MITCHISON, N. A. Tolerance and autoimmunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 9, p. 655–664, 1 mar. 2001.

KAPUGI, M.; CUNNINGHAM, K. Corticosteroids: **Orthopaedic Nursing**, v. 38, n. 5, p. 336–339, 2019.

KHAN, U.; GHAZANFAR, H. T Lymphocytes and Autoimmunity. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 341, p. 125–168, 2018.

KLEIN, L. et al. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, n. 6, p. 377–391, jun. 2014.

KONDĚLKOVÁ, K. et al. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 53, n. 2, p. 73–77, 2010.

KUMAR, B. V.; CONNORS, T. J.; FARBER, D. L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. **Immunity**, v. 48, n. 2, p. 202–213, 20 fev. 2018.

LAMPERT, A. et al. Effect of dexamethasone on voltage-gated K<sup>+</sup> channels in Jurkat T-lymphocytes. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 447, n. 2, p. 168–174, nov. 2003.

LU, L.; BARBI, J.; PAN, F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. **Nature Reviews. Immunology**, v. 17, n. 11, p. 703–717, nov. 2017.

LYNCH, H. E. et al. Thymic involution and immune reconstitution. **Trends in immunology**, v. 30, n. 7, p. 366–373, jul. 2009.

MAROM, S.; LEVITAN, I. B. State-dependent inactivation of the Kv3 potassium channel. **Biophysical Journal**, v. 67, n. 2, p. 579–589, ago. 1994.

MORROW, S. A. et al. MS patients report excellent compliance with oral prednisone for acute relapses. **The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques**, v. 39, n. 3, p. 352–354, maio 2012.

MUELLER, D. L. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. **Nature Immunology**, v. 11, n. 1, p. 21–27, jan. 2010.

MULLEN, K. M. et al. Expression of CCR7 and CD45RA in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subsets in cerebrospinal fluid of 134 patients with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases. **Journal of Neuroimmunology**, v. 249, n. 1–2, p. 86, 15 ago. 2012.

NATRI, H. et al. The Pregnancy Pickle: Evolved Immune Compensation Due to Pregnancy Underlies Sex Differences in Human Diseases. **Trends in genetics: TIG**, v. 35, n. 7, p. 478–488, jul. 2019.

NGO, S. T.; STEYN, F. J.; MCCOMBE, P. A. Gender differences in autoimmune disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 347–369, ago. 2014.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 132, n. 5, p. 1033–1044, nov. 2013.

O'GRADY, S. M.; LEE, S. Y. Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 8, p. 1578–1594, ago. 2005.

OLIVEIRA, I. S. et al. Scorpion toxins targeting Kv1.3 channels: insights into immunosuppression. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, 15 abr. 2019.

PÉREZ-GARCÍA, M. T.; CIDAD, P.; LÓPEZ-LÓPEZ, J. R. The secret life of ion channels: Kv1.3 potassium channels and proliferation. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 314, n. 1, p. C27–C42, 1 jan. 2018.

PICKUP, M. E. Clinical Pharmacokinetics of Prednisone and Prednisolone: **Clinical Pharmacokinetics**, v. 4, n. 2, p. 111–128, 1979.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 42, n. 1, p. 15–31, vii, fev. 2016.

ROOK, G. A. W. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 42, n. 1, p. 5–15, fev. 2012.

SALKOFF, L.; WYMAN, R. Genetic modification of potassium channels in Drosophila Shaker mutants. **Nature**, v. 293, n. 5829, p. 228–230, 17 set. 1981.

SAMUEL, S.; NGUYEN, T.; CHOI, H. A. Pharmacologic Characteristics of Corticosteroids. **Journal of Neurocritical Care**, v. 10, n. 2, p. 53–59, 27 dez. 2017.

SANSOM, M. S. P. Potassium channels: Watching a voltage-sensor tilt and twist. **Current Biology**, v. 10, n. 5, p. R206–R209, 1 mar. 2000.

SERRANO-ALBARRÁS, A. et al. Fighting rheumatoid arthritis: Kv1.3 as a therapeutic target. **Biochemical Pharmacology**, Therapeutic Advances in Arthritis Diseases. v. 165, p. 214–220, 1 jul. 2019.

SZATMARI, I.; NAGY, L. Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. **The EMBO Journal**, v. 27, n. 18, p. 2353–2362, 17 set. 2008.

TAJTI, G. et al. The voltage-gated potassium channel KV1.3 as a therapeutic target for venom-derived peptides. **Biochemical Pharmacology**, v. 181, p. 114146, nov. 2020.

TAJTI, G. et al. Immunomagnetic separation is a suitable method for electrophysiology and ion channel pharmacology studies on T cells. **Channels (Austin, Tex.)**, v. 15, n. 1, p. 53–66, dez. 2021.

TALLEY, E. M.; BAYLISS, D. A. Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17733–17742, 17 maio 2002.

TEISSEYRE, A. et al. Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 as a Target in Therapy of Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 933, 24 set. 2019.

VARGA, Z. et al. Multiple binding sites for melatonin on Kv1.3. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 3, p. 1280–1297, mar. 2001.

VARGA, Z.; TAJTI, G.; PANYI, G. The Kv1.3 K<sup>+</sup> channel in the immune system and its “precision pharmacology” using peptide toxins. **Biologia Futura**, v. 72, n. 1, p. 75–83, mar. 2021.

VERMA, K. et al. Human CD8<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> TEMRA cells: Too young to be called “old”. **PloS One**, v. 12, n. 5, p. e0177405, 2017.

VILLALONGA, N. et al. Immunomodulation of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in macrophages: molecular and biophysical consequences. **The Journal of General Physiology**, v. 135, n. 2, p. 135–147, fev. 2010.

VOROS, O. et al. The C-terminal HRET sequence of Kv1.3 regulates gating rather than targeting of Kv1.3 to the plasma membrane. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5937, 12 abr. 2018.

WANG, X. et al. Kv1.3 Channel as a Key Therapeutic Target for Neuroinflammatory Diseases: State of the Art and Beyond. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, 2020.

WULFF, H. et al. The voltage-gated Kv1.3 K<sup>(+)</sup> channel in effector memory T cells as new target for MS. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 11, p. 1703–1713, jun. 2003.

WULFF, H. et al. K<sup>+</sup> channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 173, n. 2, p. 776–786, 15 jul. 2004.

WULFF, H.; PENNINGTON, M. Targeting effector memory T-cells with Kv1.3 blockers. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 10, n. 4, p. 438–445, jul. 2007.

WÜST, S. et al. Peripheral T Cells Are the Therapeutic Targets of Glucocorticoids in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 12, p. 8434–8443, 15 jun. 2008.

YU, J. et al. Cortisone and hydrocortisone inhibit human Kv1.3 activity in a non-genomic manner. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 6, p. 653–661, jun. 2015.