

Anita de Oliveira Silva

**Efeito inibitório da rPnTx1 em canais de sódio
ativados por voltagem.**

Belo Horizonte

2012

Anita de Oliveira Silva

**Efeito inibitório da rPnTx1 em canais de sódio
ativados por voltagem.**

Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica e Imunologia
do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão

Dedico esse trabalho ao meu amado pai, **Olavo Gomes da Silva** e à minha amada mãe, **Ana Maria de Oliveira Silva**, pois tudo que sou e conquistei devo a eles. E ao meu amado esposo, **Éder Ricardo de Moraes**, meu melhor amigo e companheiro de aventuras.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. **Paulo Beirão**, que é para mim um exemplo de honestidade, sabedoria e simplicidade.

Ao Dr. **Marcelo Diniz**, que me recebeu com generosidade em seu laboratório, pelos valiosos ensinamentos.

À Dra. **Fernanda Silva Torres** que me ensinou os primeiros passos na Biologia Molecular.

Ao laboratório de Eletrofisiologia Celular, **Eletrocel**, especialmente ao Dr. **Christopher Kushmerick**, à Dra. **Lígia Naves** e ao Dr. **Éder Moraes** que me ensinaram a cultura de neurônios DRG e sempre me estenderam a mão quando precisei de ajuda.

À **Ana Valentim** pelos valiosos ensinamentos de Cromatografia e pelos bons momentos compartilhados.

À **Márcia Borges** e **Jomara** pela ajuda na espectrometria de massas. **A Marta e Mike** pelos ensinamentos e **Alcides** pela disponibilidade e atenção.

À Dra. **Maria Elena de Lima** pelo apoio, amizade, confiança e por proporcionar a ida à Bélgica. Aos amigos do **LVTA**. E ao Dr. **Jan Tytgat**, Dra. **Juliana**

Cassoli e Steve Peigneur pelos ensinamentos e pelos preciosos momentos em Leuven.

Ao Dr. **Frederic Frezard** e **Flaviana Fernandes** pelo auxílio com os experimentos de Dicroísmo Circular.

Ao Dr. **Adriano Pimenta**, Dr. **Carlos Chávez** e Dra. **Alessandra Matavel** pela contribuição enriquecedora na qualificação.

Ao laboratório de membranas excitáveis, **Lamex**, em especial ao Dr. **Jader Cruz e Eduardo Gervásio**, pela disponibilidade, convivência e pelos experimentos com corrente de cálcio. E aos demais colegas pela convivência e aprendizado. Ao **Narciso** cuja presença se fez imprescindível no laboratório. E ao Dr. **Lucas Bleicher** que enriqueceu meus conhecimentos de bioinformática.

Ao Dr. **Ronaldo Nagen e Rubens** pelas valorosas discussões.

Aos técnicos do departamento **Neuza, Elimar, Eneilda, Beth, Ilda, Julinho e Jamil** pela ajuda, disponibilidade e pelo carinho de sempre.

A **Celise e Grazielle** sempre prestativas e atenciosas.

Aos membros da banca de doutorado: **Dra. Marília Zaluar, Dr. Demétrius Araújo, Dr. Christopher Kushmerick, Dra. Maria Elena de Lima e Dr. Paulo Beirão** pelas sugestões enriquecedoras para a tese.

A todos meus familiares, em especial **Tia Lúgia** pelo incentivo e por seu exemplo na caminhada acadêmica e **Mariana** por todos os momentos compartilhados.

À **Dona Helena, Allen, Jamile, João Marcus e Marina**, por serem minha família querida em Minas Gerais.

À **Aida** amiga amada e companheira para todas as horas.

A todos meus amigos, **Aída e Daniel, Ana Maria e Maurício, Flaviana e André, Milena e André, Juliano, Gina e Fernando, Alessandra e Ivan, Karla e Marcus** pelo carinho, pelo apoio, pelas palavras e por fazerem parte de minha vida.

Sumário

Lista de Tabelas.....	IX
Lista de Figuras.....	X
Lista de Abreviaturas.....	XII
Resumo.....	13
Abstract.....	14
Introdução.....	15
<i>Canais de sódio ativados por voltagem.....</i>	15
<i>O veneno de aranha Phoneutria nigriventer.....</i>	20
<i>A toxina PnTx1.....</i>	23
<i>A toxina recombinante rPnTx1.....</i>	24
Justificativa.....	26
Objetivo.....	27
<i>Objetivos específicos.....</i>	27
Materiais e Métodos.....	28
<i>Expressão da toxina recombinante.....</i>	28
<i>Preparação e armazenamento da toxina.....</i>	37
<i>Cultura de células dos Gânglios das Raízes Dorsais de ratos</i> <i>(DRG- Dorsal Root Ganglion).....</i>	37
<i>Cultura de células HEK 293 expressando canais Na_v1.3.....</i>	46
<i>Expressão heteróloga de canais de sódio ativados por voltagem</i> <i>em ovócitos de Xenopus laevis.....</i>	47
Análise dos dados.....	51
Dicroísmo Circular.....	51
Resultados.....	53
<i>Efeito da rPnTx1 em correntes de sódio de células dos DRG.....</i>	53
<i>Ensaio do efeito da toxina recombinante em diferentes</i> <i>isoformas de canais de sódio.....</i>	59
<i>Análise cinética do efeito da toxina recombinante em canais Na_v1.2.....</i>	63

<i>Efeito da rPnTx1 na recuperação da inativação</i>	67
<i>Efeito da rPnTx1 em canais deficientes na inativação rápida</i>	70
<i>Comparação biofísica e estrutural entre as toxinas nativa e recombinante</i>	72
<i>Efeito da rPnTx1 em correntes de cálcio de células dos DRG</i>	76
Discussão.....	78
Conclusão.....	86
Referências Bibliografias.....	87
Anexo: Publicação Científica.....	95

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características das diferentes isoformas do canal de sódio ativado por voltagem de mamíferos.....	19
Tabela 2: Sítios de ligação de neurotoxinas em canais de sódio ativados por voltagem.....	21
Tabela 3: Toxinas que apresentam seletividade relativa às isoformas de canais de sódio.....	22
Tabela 4: Sequência de aminoácidos da PnTx1 e da rPnTx1.....	25
Tabela 5: Comparação dos parâmetros obtidos pelo ajuste das curvas de recuperação da inativação.....	69

Lista de Figuras

Figura 1- Estrutura dos canais de sódio ativados por voltagem.....	17
Figura 2: Figura representativa obtida através Cromatografia de afinidade de uma amostra contendo rPnTx1.....	30
Figura 3: Figura representativa obtida através Cromatografia de gel filtração de uma amostra contendo rPnTx1.....	32
Figura 4: Figura representativa obtida através Cromatografia de fase reversa de uma amostra contendo rPnTx1.....	34
Figura 5: Figura representativa obtida através Espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF MS de uma amostra contendo rPnTx1.....	36
Figura 6- Registro representativo da célula perfundida com solução de banho isenta de sódio.....	42
Figura 7- Curso temporal da troca de solução pelo sistema de perfusão.....	43
Figura 8- Experimento representativo mostrando a inibição nas correntes de sódio de neurônios dos DRG.....	55
Figura 9- Experimento representativo da inibição das correntes de sódio resistentes a TTX de neurônios DRG.....	56
Figura 10- Registros representativos das correntes de sódio com potencial de membrana mantido em -50 mV em neurônio dos DRG.....	57
Figura 11- Relação concentração- resposta em neurônios dos DRG.....	58
Figura 12- Efeito da rPnTx1 em diferentes subtipos de canais de sódio expressos em ovócitos de <i>Xenopus laevis</i>	61

Figura 13- Porcentagem média de inibição das correntes de sódio em diferentes subtipos de canais expressos em ovócitos.....	62
Figura 14- Efeito de rPnTx1 na relação corrente <i>versus</i> voltagem.....	64
Figura 15 - Efeito da rPnTx1 na dependência de voltagem da ativação.....	65
Figura 16- A dependência de voltagem da inativação do estado estacionário.....	66
Figura 17: Experimento representativo da inibição das correntes de sódio de canais de sódio Na _v 1.3 expressos em células HEK 293.....	68
Figura 18- Velocidade de recuperação da inativação.....	69
Figura 19- Efeito da rPnTx1 nos canais Na _v 1.2 deficientes de inativação rápida.....	71
Figura 20- Comparação do efeito da rPnTx1 com o efeito da toxina nativa (PnTx1) em canais Na _v 1.2.....	73
Figura 21- Gráfico da dependência da concentração de toxina na inibição de canais Na _v 1.2.....	74
Figura 22- Espectro de dicroísmo circular das toxinas nativa e recombinante.....	75
Figura 23- Efeito de 1 μM rPnTx1 em canais de cálcio de neurônios dos DRG.....	77
Figura 24- Alinhamento das sequências de aminoácidos das toxinas rPnTx1 e KIIIA.....	81

Lista de Abreviaturas

ATP: Trifosfato de adenosina

BAPTA: *1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid*

Ca_v: Canais de cálcio ativados por voltagem

CD: *circular dichroism*

CHO: *Chinese hamster ovary*

DRG: *Dorsal Root Ganglion*

HEK: *Human Embryonic Kidney*

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HPLC: *High-performance liquid chromatography*

IPTG: isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

IxV: relação corrente *versus* voltagem

LB: *Luria-Bertani*

MALDI: *Matrix-assisted laser desorption/ionization*

MS: *mass spectrometry*

Na_v: Canal de Sódio ativado por voltagem

PnTx1: Toxina 1 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*

PnTx3-3: Toxina 3-3 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*

rPnTx1: Toxina 1 recombinante

TEA-Cl: cloreto de tetraetilamônio

TEA-OH: hidróxido de tetraetilamônio

TTX: tetrodotoxina

TOF: *time-of-flight mass spectrometer*