

## Resumo

A toxina PnTx1 representa aproximadamente 0,45% da proteína total do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* e foi expressa em forma recombinante (rPnTx1). Por causa de seus efeitos fisiológicos semelhantes aos da PnTx1, a rPnTx1 torna-se uma nova e interessante ferramenta para o estudo da fisiologia molecular dos canais de sódio. O objetivo do presente estudo é caracterizar o efeito eletrofisiológico da rPnTx1 em diferentes isoformas dos canais de sódio ativados por voltagem de mamíferos e artrópodes. Para experimentos eletrofisiológicos com neurônios dos Gânglios da Raiz Dorsal de ratos, era utilizada a técnica de *patch clamp* na modalidade *whole cell*. Ocorreu inibição das correntes de sódio de  $38,4 \pm 6,1\%$  em perfusão com solução contendo  $1,5 \mu\text{M}$  de rPnTx1. Para o registro das correntes iônicas em ovócitos de *Xenopus laevis*, foi utilizada a técnica de *voltage clamp* com dois microeletrodos. Após testar o efeito da rPnTx1 em diferentes isoformas de canais de sódio ativados por voltagem, a seguinte ordem de seletividade foi encontrada:  $r\text{Na}_v1.2 > r\text{Na}_v1.7 \approx r\text{Na}_v1.4 \geq r\text{Na}_v1.3 > m\text{Na}_v1.6 \geq h\text{Na}_v1.8$ . Nenhum efeito foi observado na isoforma  $h\text{Na}_v1.5$  e em isoformas de canais provenientes de artrópodes. A dependência de concentração da rPnTx1 foi comparada com a toxina nativa na isoforma  $r\text{Na}_v1.2$ , mostrando a mesma inibição máxima (PnTx1:  $85 \pm 0,8\%$ ; rPnTx1:  $83,3 \pm 1,9\%$ ), mas o  $\text{IC}_{50}$  da toxina recombinante ( $\text{IC}_{50}$ :  $33,7 \text{ nM}$ ) é significativamente menor que o  $\text{IC}_{50}$  de toxina nativa ( $\text{IC}_{50}$ :  $104,8 \text{ nM}$ ). Por ter uma alta seletividade relativa para canais de sódio neuronais, a rPnTx1 torna-se uma ferramenta importante para estudos estruturais e farmacológicos.

## Abstract

Toxin PnTx1 represents approximately 0.45% of the total protein of the spider *Phoneutria nigriventer* venom's and was expressed in recombinant form (rPnTx1). Because of its physiological effects similar to PnTx1, rPnTx1 becomes a new interesting tool for study of the molecular physiology of sodium channels. The aim of this study is characterize electrophysiologically the effect of rPnTx1 in different isoforms of sodium channels of mammals and arthropods. To measure the sodium current in DRG, the patch clamp technique was used in the modality of whole cell. The inhibition of sodium currents was  $38,4 \pm 6,1\%$  when perfused with solution containing  $1,5 \mu\text{M}$  rPnTx1. In *Xenopus oocytes*, two-electrode voltage clamp recordings were performed. The observed order of potency for rPnTx1 was  $r\text{Na}_v1.2 > r\text{Na}_v1.7 \approx r\text{Na}_v1.4 \geq r\text{Na}_v1.3 > m\text{Na}_v1.6 \geq h\text{Na}_v1.8$  while no effect was seen on hNav1.5 and arthropod isoforms. The concentration-dependence of rPnTx1 inhibition was compared with that of the native toxin in the isoform  $\text{Na}_v1.2$  and showed the same maximal effect (PnTx1:  $85 \pm 0,8\%$ ; rPnTx1:  $83,3 \pm 1,9\%$ ), whereas the  $\text{IC}_{50}$  of the recombinant toxin ( $\text{IC}_{50}$ :  $33,7\text{nM}$ ) was significantly lower than the  $\text{IC}_{50}$  of native toxin ( $\text{IC}_{50}$ :  $104,8 \text{ nM}$ ). For its high relative selectivity to neuronal type sodium channels, rPnTx1 becomes an important tool for structural and pharmacological studies.

## Introdução

### Canais de sódio ativados por voltagem

Canais de sódio ativados por voltagem formam uma superfamília de proteínas transmembranas que atuam na sinalização elétrica e homeostase iônica em células eletricamente excitáveis. Por terem alta seletividade aos íons sódio e por seu mecanismo de abertura ser dependente de potencial, eles têm a função de iniciar e propagar o potencial de ação. Esse canal é formado por uma subunidade  $\alpha$  de 220-260 kDa que pode estar associada a uma ou mais subunidades  $\beta$  ( $\beta$ 1-4) (Catterall, 2000; Catterall *et al* 2007).

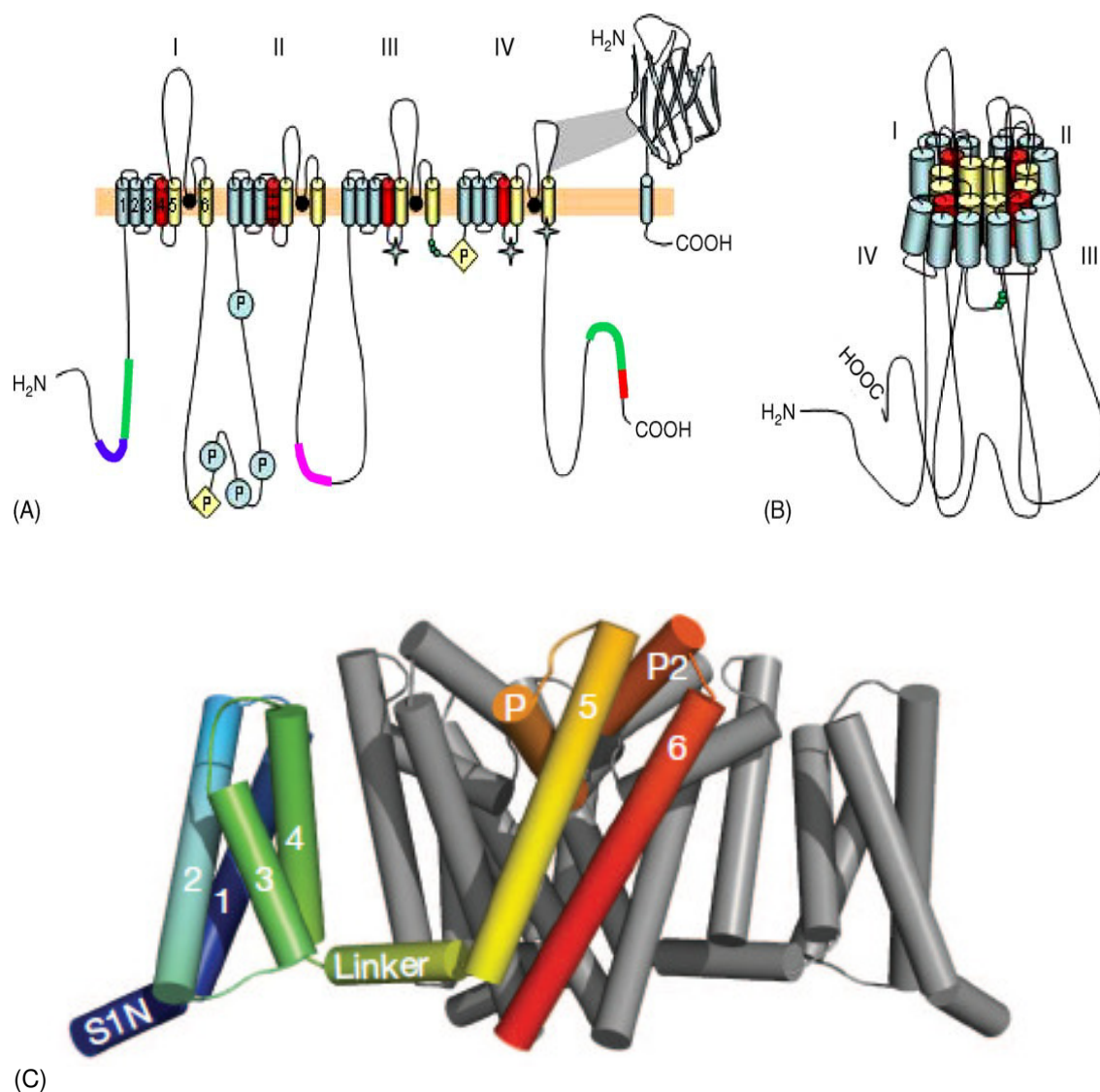
A subunidade  $\alpha$  é suficiente para a expressão funcional do canal de sódio (Figura 1C). Essa subunidade é constituída de 4 domínios homólogos com 6 segmentos transmembrana (S1-S6) cada (Figura 1A). A alça reentrante entre os segmentos S5 e S6 (denominada alça p) forma a porção extracelular do poro condutor enquanto os segmentos S6 e S5 formam a porção intracelular. O filtro de seletividade do canal de sódio está intimamente relacionado ao motivo altamente conservado DEKA (D: Aspartato; E: Glutamato; K: Lisina; e A: Alanina) localizado nas alças p dos domínios I, II, III e IV do canal, respectivamente (Favre *et al*, 1996).

Os segmentos S4 possuem motivos com resíduos de aminoácidos carregados com cargas positivas, entremeados com 2 resíduos hidrofóbicos, que movem para o lado extracelular em resposta à despolarização da

membrana. Dessa forma, produzem uma modificação conformacional no canal que abre o poro condutor (Catterall *et al*, 2007) sendo, portanto, os sensores de voltagem do canal. Enquanto o movimento dos segmentos S4 dos domínios 1, 2 e 3 estão relacionados com a ativação do canal, o movimento do S4 do domínio 4 está relacionado à inativação (Chanda & Bezanilla, 2002; Campos *et al*, 2008). Tanto a ativação quanto a inativação do canal são processos que dependem de tempo e voltagem.

Além disso, entre o segmento S6 do domínio 3 e o segmento S1 do domínio 4, existe uma alça intracelular na qual encontra-se o motivo IFM (I: Isoleucina; F: Fenilalanina; e M: Metionina). O movimento dessa alça causa a inativação rápida do canal (West *et al*, 1992).

A cinética e a dependência de voltagem da abertura do canal são modificadas pela subunidade  $\beta$  e essas subunidades auxiliares estão envolvidas na localização e interação celular como moléculas de adesão à matriz extracelular e citoesqueleto intracelular (Catterall *et al*, 2005). As subunidades  $\beta$  (1-4) possuem 33-36 KDa e se apresentam como um único segmento transmembrana e um curto segmento C-terminal intracelular (Catterall *et al*, 2007).



**Figura 1: Estrutura dos canais de sódio ativados por voltagem.** (A) Representação bidimensional da subunidade  $\alpha$  dos canais de sódio ativados por voltagem ilustrando sua topologia na membrana junto com a subunidade  $\beta 1$ . A subunidade  $\alpha$  é composta por 4 domínios. Cada domínio contém 6 segmentos transmembrana (1-6). Os segmentos formadores de poro e sensores de voltagem estão em amarelo e vermelho, respectivamente. Os locais de fosforilação estão representados por círculos azuis e diamantes amarelos. O motivo de inativação e seu receptor estão identificados por círculos verdes e estrelas azuis, respectivamente. O filtro de seletividade iônica está mostrado por círculos pretos. (B) Representação esquemática do formato da subunidade  $\alpha$  formando o poro condutor do íon sódio (Ekberg & Adams, 2006). (C) Elementos estruturais do canal de sódio  $Na_v\alpha 1$ . Um domínio tem os seus 6 segmentos transmembranas realçados por cores (1-6, segmentos transmembranas S1-S6). Em azul o segmento S1 com o N terminal (S1N). P e P2 hélices formadoras do poro. "linker" significa a alça de ligação entre os segmentos S4 e S5. As estruturas mais próximas ao domínio do sensor de voltagem foram removidas para melhor visualização (Payandeh *et al.*, 2011).

Foram identificados e funcionalmente expressas 9 isoformas de canais de sódio em mamíferos. Todos apresentam mais de 50% de identidade na sua sequência de aminoácidos nos domínios transmembrana e extracelular (Godin *et al*, 2000; Catterall *et al*, 2005). Contudo, possuem características biofísicas e farmacológicas distintas como pode-se observar na tabela 1.

Em relação às propriedades farmacológicas, por exemplo, esses canais podem ser agrupados em canais sensíveis e resistentes à Tetrodotoxina (TTX) como pode-se observar na tabela 1. A TTX foi a primeira neurotoxina descrita como ligante específico de canais de sódio. Essa toxina se liga à parte extracelular do poro do canal, bloqueando a passagem de íons sódio. Os canais Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 e Nav1.7 formam o grupo de canais sensíveis a TTX (TTX-S), ou seja, o efeito máximo é atingido com concentrações nanomolares de toxina. Os canais Nav1.5, Nav1.8 e Nav1.9 formam o grupo dos canais resistentes a TTX (TTX-R). Para obter o efeito máximo da TTX, precisa-se de concentrações 1000x maiores de toxina (Patton & Goldin, 1991; Ekberg & Adams, 2006).

Outra característica que torna esses canais potenciais alvos de fármacos, é a expressão das diferentes isoformas de forma heterogênea nos tecidos do organismo. Por exemplo, como se pode observar na tabela 1, a isoforma Nav1.5 está prioritariamente presente em músculo cardíaco enquanto o Nav1.4 é típico de músculo esquelético. As isoformas Nav1.8 e Nav1.9 são encontrados no sistema nervoso periférico particularmente em neurônios sensitivos (Godin *et al*, 2000; Catterall, 2000). Alterações no funcionamento e

na expressão desses canais podem levar a diversas patologias como arritmias cardíacas, epilepsia e dor crônica (Catterall, 2000; Ekberg *et al*, 2006; England & Groot, 2009).

**Tabela 1:** Características das diferentes isoformas do canal de sódio ativado por voltagem de mamíferos

Isoforma do Canal de Sódio	Local primário de expressão	Concentração de toxina para obter-se 50% do efeito máximo (IC <sub>50</sub> )	Voltagem na qual 50% dos canais se encontram no estado ativado- V <sub>a</sub>	Voltagem na qual 50% dos canais se encontram no estado inativado- V <sub>h</sub>
Na <sub>v</sub> 1.1	Sistema Nervoso Central; Neurônios sensitivos	TTX-S 6 nM	-33 mV	-72 mV
Na <sub>v</sub> 1.2	Sistema Nervoso Central; Neurônios sensitivos	TTX-S 12 nM	-24 mV	- 53 mV
Na <sub>v</sub> 1.3	Sistema Nervoso Central; Neurônios sensitivos embrionários	TTX-S 4 nM	-23 a -26 mV	-65 a -69 mV
Na <sub>v</sub> 1.4	Músculo esquelético	TTX-S 5 nM	- 26 mV	-56 mV
Na <sub>v</sub> 1.5	Músculo Cardíaco; Músculo esquelético denervado e imaturo	TTX-R 1-2 µM	-27 mV (com aspartato como principal ânion extracelular)	-61 mV (com aspartato como principal ânion extracelular)
Na <sub>v</sub> 1.6	Sistema Nervoso Central; Neurônios sensitivos; Nódulos de Ranvier tanto no Sistema Nervoso Central e Periférico	TTX-S 1 nM	- 17 mV	-51 mV
Na <sub>v</sub> 1.7	Neurônios sensitivos; Neurônios Simpáticos; Células de Schwann	TTX-S 4 nM	- 45 mV	-65 mV
Na <sub>v</sub> 1.8	Neurônios sensitivos	TTX-R 60 µM	-16 a -21 mV	- 30 mV
Na <sub>v</sub> 1.9	Neurônios sensitivos	TTX-R 40 µM	- 47 a -54 mV	-44 a -54 mV

Modificado de Catterall *et al*, 2005; Eckberg *et al*, 2006.

Por causa da sua importância vital em muitos aspectos da regulação celular e da transdução de sinal, canais iônicos ativados por voltagem são alvos moleculares de um grande número de toxinas biológicas (Catterall *et al*, 2007). A alta afinidade e especificidade relativa das neurotoxinas as qualificam como importantes ferramentas para o estudo dos canais de sódio, através do entendimento dos seus mecanismos de ação e da identificação molecular dos seus sítios de ligação ao canal.

Existem 6 sítios de ligação de toxinas na estrutura do canal de sódio de mamíferos (Tabela 2). Cada local altera de forma distinta a função do canal podendo modificar seus parâmetros da ativação ou inativação ou atuar como bloqueadores de poro (Catterall *et al*, 2007; Cestele & Catterall, 2000).

Devido aos estudos de *screening* feitos com toxinas e venenos em diferentes isoformas de canais de sódio, verificou-se que algumas delas exibem preferência a determinada isoforma de canal em relação a outros. Essas toxinas fornecem poderosas ferramentas para estudos de estrutura-função desses canais (England & Groot, 2009). Na tabela 3, podemos observar alguns exemplos dessas toxinas.

### **O veneno de aranha *Phoneutria nigriventer*.**

Venenos de aranhas são misturas complexas, constituídos tanto de componentes de baixo peso molecular (íons inorgânicos e sais, ácidos livres, glicose, aminoácidos livres, amins biogênicas e neurotransmissores) quanto de toxinas peptídicas e enzimas (Escoubas *et al*, 2000).



A aranha *Phoneutria nigriventer*, também conhecida como armadeira ou aranha de bananeira, é conhecida por tomar uma posição típica quando se sente ameaçada. São bastante agressivas e não constroem teias. Alimentam-se principalmente de insetos e outros artrópodes. (Gomez *et al*, 2002; De Lima *et al*, 2009). Acidentes com esses animais são caracterizados por intensa dor, tremores, convulsões, lacrimação, paralisia espástica, priapismo, salivação, arritmia cardíaca, distúrbios visuais e suor frio (Diniz *et al*, 2006).

**Tabela 2:** Sítios de ligação de neurotoxinas em canais de sódio ativados por voltagem de mamíferos.

Sítio de ligação	Neurotoxina	Efeito funcional
<b>Sítio 1: IS5-S6, IIS5-S6, IIIS5-S6, IVS5-S6</b>	Tetrodotoxina, Saxitoxina, $\mu$ -conotoxina	Bloqueio de Poro
<b>Sítio 2: IS6, IVS6</b>	Batrachotoxina Veratridina; Grayanotoxina; Aconitina	Persistente ativação; Desloca o potencial da ativação para potenciais hiperpolarizados e bloqueio da ativação
<b>Sítio 3: IS5-IS6, IVS3-S4, IVS5-S6</b>	$\alpha$ - toxina de escorpião; toxina de anêmona marinha; Atrachotoxina	Lentificação da inativação
<b>Sítio 4: IIS1-S2, IIS3-4</b>	$\beta$ - toxina de escorpião	Desloca o potencial da ativação para potenciais hiperpolarizados
<b>Sítio 5: IS6, IVS5</b>	Brevetoxina; Ciguatoxina	Desloca o potencial da ativação para potenciais hiperpolarizados e bloqueio da inativação
<b>Sítio 6: IVIS3-4</b>	$\delta$ - conotoxina	Lentificação da inativação

Modificado de Cestele & Catterall, 2000/ Catterall *et al*, 2007

Em seu veneno foram inicialmente identificadas 4 frações com atividade tóxica sendo as frações 1, 2 e 3 ativas em mamíferos enquanto a fração 4 é ativa também em insetos (Rezende Jr *et al*, 1991, Figueiredo *et al*, 1995). A fração 2 contém toxinas que modificam a cinética de inativação de canais de sódio (Matavel *et al*, 2009). Já a fração 3 é mais complexa em sua composição e contém toxinas que atuam em canais de cálcio e de potássio (Kushmerick *et al*, 1999; Leão *et al*, 2000) A fração 4 tem toxinas que são tóxicas para insetos

e parece agir no sistema nervoso periférico na liberação de glutamato em junções neuromusculares desses animais (Figueiredo *et al*, 1995; Figueiredo *et al*, 1997). Essa fração também é constituída por toxinas que apresentam efeito na liberação de glutamato em sinaptossomas de ratos (Mafra *et al*, 1999). As toxinas presentes nessas frações possuem padrões bem conservados de cisteínas na sequência de aminoácidos que as caracterizam (Richardson *et al*, 2006).

**Tabela 3:** Toxinas que apresentam seletividade relativa às isoformas de canais de sódio.

<b>Toxina (espécies)</b>	<b>Efeito Funcional (Seletividade)</b>
I-conotoxina RXIA	Modifica a dependência de voltagem da ativação para potenciais hiperpolarizados. rNav <sub>v</sub> 1.6 > rNav <sub>v</sub> 1.2 > rNav <sub>v</sub> 1.7. Sem efeito: rNav <sub>v</sub> 1.1, rNav <sub>v</sub> 1.3, rNav <sub>v</sub> 1.4, rNav <sub>v</sub> 1.5, TTX-R
μ-conotoxina TIIIA	Inibe a corrente de sódio rNav <sub>v</sub> 1.2 ~ = rNav <sub>v</sub> 1.4 Sem efeito: rNav <sub>v</sub> 1.3, hNav <sub>v</sub> 1.5, hNav <sub>v</sub> 1.7, hNav <sub>v</sub> 1.8
μ-conotoxina KIIIA	Inibe a corrente de sódio rNav <sub>v</sub> 1.2 > rNav <sub>v</sub> 1.4 > rNav <sub>v</sub> 1.7 ≥ rNav <sub>v</sub> 1.1 > rNav <sub>v</sub> 1.3 > rNav <sub>v</sub> 1.5
μ-conotoxina GIIIA/B	Inibe a corrente de sódio rNav <sub>v</sub> 1.4 >> hNav <sub>v</sub> 1.4 > hNav <sub>v</sub> 1.5
μO-conotoxina MrVIB	Inibe a corrente de sódio hNav <sub>v</sub> 1.8 > rNav <sub>v</sub> 1.2, rNav <sub>v</sub> 1.3, hNav <sub>v</sub> 1.5
ProTxII	Inibe a corrente de sódio hNav <sub>v</sub> 1.7 > hNav <sub>v</sub> 1.6 > hNav <sub>v</sub> 1.5 > hNav <sub>v</sub> 1.8
Ceratotoxin1 Ceratotoxin2 Phrixotoxina	Inibe a corrente de sódio, modifica a dependência de voltagem da ativação rNav <sub>v</sub> 1.2 > hNav <sub>v</sub> 1.5 > rNav <sub>v</sub> 1.1 > rNav <sub>v</sub> 1.4 rNav <sub>v</sub> 1.2 > rNav <sub>v</sub> 1.3 > rNav <sub>v</sub> 1.1 = rNav <sub>v</sub> 1.4 > hNav <sub>v</sub> 1.5 rNav <sub>v</sub> 1.2 > rNav <sub>v</sub> 1.3 > hNav <sub>v</sub> 1.5 > rNav <sub>v</sub> 1.4 > rNav <sub>v</sub> 1.1
Jingzhaotoxina-XI	Inibe a corrente de sódio, pequena modificação despolarizante no limiar de ativação de Nav <sub>v</sub> 1.5, canais sensíveis a TTX INa (DRG de ratos) > rNav <sub>v</sub> 1.5 (cardiomiócitos)
Huwentoxina-IV	Inibe a corrente de sódio hNav <sub>v</sub> 1.7 > rNav <sub>v</sub> 1.2 > rNav <sub>v</sub> 1.3 >> hNav <sub>v</sub> 1.5 > rNav <sub>v</sub> 1.4

Modificado de England & Groot, 2009.

## A toxina PnTx1

A toxina PnTx1 foi purificada e sequenciada da fração 1 do veneno da aranha armadeira por Diniz *et al*, 1990. Ela possui 78 resíduos de aminoácidos, sendo 14 resíduos de cisteínas, e sua massa molecular corresponde a 8598,8 Da. Representa cerca de 0,45% do total de proteínas do veneno. Quando injetada por via intracerebroventricular em camundongos, leva a excitação, paralisia espástica e morte desses animais, com uma LD<sub>50</sub> de 0,05 mg/kg (Diniz *et al*, 1990, Diniz *et al*, 2006).

Segundo Richardson *et al*, 2006 a sequência de aminoácidos da PnTx1 apresenta aproximadamente 40% de homologia com a  $\omega$ -Agatoxina IIIA do veneno da aranha *A. aperta*, a qual é antagonista de canais de cálcio tipo N e L (Venema *et al*, 1992). Nesse sentido foram feitos estudos para analisar o efeito da toxina em canais de cálcio através de experimentos de ligação (Santos *et al*, 1999) e eletrofisiológicos (Gouvêa dos Santos *et al*, 2006). Os registros eletrofisiológicos mostraram um bloqueio de 40% das correntes de cálcio de células GH3.

Contudo em ensaios nos canais de sódio Nav1.2 expressos em células CHO, essa toxina mostrou um efeito inibitório dependente do potencial de membrana (Martin-Moutot *et al*, 2006). Nesse estudo os autores mostraram que a toxina compete em ensaios de ligação com a  $\mu$ -conotoxina, uma toxina bloqueadora de canais de sódio, e atribuíram o efeito nos canais de cálcio a uma contaminação de 5% da amostra com uma toxina da fração 3 (PnTx3-3)

conhecida na literatura como bloqueadora de canais de cálcio ativados por voltagem (Leão *et al*, 2000). A identificação da contaminação foi feita utilizando a análise comparativa da sequência de aminoácidos da porção N-terminal das toxinas. Martin-Moutot *et al*, 2006, afirmaram que, em experimentos de imunoprecipitação, a PnTx1 não se liga aos canais de cálcio, contudo os experimentos não foram mostrados.

### **A toxina recombinante rPnTx1**

Apesar de serem ferramentas interessantes para o estudo de estrutura e função de canais iônicos, o uso de toxinas purificadas de venenos de aranha apresenta algumas limitações importantes. Um dos principais problemas é a dificuldade de se obter grande quantidade de material. A ferramenta de clonagem molecular, caracterizando e expressando os genes que codificam essas toxinas pode solucionar esse problema. Além de permitir a obtenção da toxina livre de contaminação, essa metodologia permite fazer mutações sítio-dirigidas na sequência de aminoácidos. A limitação desse método, especialmente para toxinas de aranha, é que frequentemente a sua expressão gera peptídeos com conformações diferentes da nativa e com pouca ou nenhuma atividade.

A toxina PnTx1 foi expressa em forma recombinante por Diniz *et al*, 2006 (Tabela 4). Ela apresenta 3 aminoácidos a mais na sua sequência sendo uma alanina e metionina no N-terminal e uma glicina no-C terminal. Com isso, sua massa molecular apresenta-se maior que da toxina nativa (MM: 8858,13 Da). A

toxina recombinante tem perfil cromatográfico semelhante ao da nativa, bem como mesma atividade biológica quando injetada via intracerebroventricular em roedores (elevação de cauda, excitação, salivação e paralisia espástica), reatividade imunológica e capacidade de ligação a receptores em sinaptossomas de cérebro de rato.

**Tabela 4:** Sequência de aminoácidos da PnTx1 e da rPnTx1

Toxina	Seqüência de aminoácidos	Massa Molecular
<b>PnTx1</b>	AELTS <b>C</b> FPVGHE <b>C</b> DGDASN <b>CNCC</b> GDDVY <b>CGCG</b> WGRWN <b>CKCK</b> VADQSYAYG I <b>CKDKVNCP</b> NRHLWPAKV <b>CKKP</b> CRRN <b>CG</b>	8598.80
<b>rPnTx1</b>	<u>A</u> MAELTS <b>C</b> FPVGHE <b>C</b> DGDASN <b>CNCC</b> GDDVY <b>CGCG</b> WGRWN <b>CKCK</b> VADQSYA YGI <b>CKDKVNCP</b> NRHLWPAKV <b>CKKP</b> CRRN <b>CGG</b> <u></u>	8858.13

## **Justificativa**

O entendimento da estrutura e das funções fisiológicas dos canais de sódio é crucial, uma vez que seu funcionamento é importante para funções vitais. Devido à sua alta seletividade, muitas neurotoxinas constituem uma ferramenta poderosa para estudar esses canais, através do conhecimento do seu modo de ação e da identificação dos sítios moleculares envolvidos na sua ligação aos canais iônicos. Nove isoformas de canais de sódio de mamíferos já foram identificadas e as toxinas tornam-se ferramentas preciosas para distinguir e para revelar as propriedades únicas de cada isoforma.

Estudos eletrofisiológicos e de ligação em canais Nav1.2 com a toxina PnTx1 mostraram que ela bloqueia correntes de sódio de maneira estado-dependente e compete na ligação com a  $\mu$ -conotoxina, mas não com a tetrodotoxina. Apesar de apresentar efeitos fisiológicos semelhantes à toxina nativa, nenhum estudo eletrofisiológico foi feito com a toxina recombinante. Além disso, uma vez que a toxina recombinante é livre de contaminação com outras toxinas, permite que sejam feitos experimentos para certificar se ela atua ou não em canais de cálcio. Por abrir novas perspectivas, inclusive de mutações sítio-dirigidas, essa toxina torna-se uma nova ferramenta molecular para o estudo de canais de sódio.

## **Objetivo**

Verificar o efeito da toxina recombinante rPnTx1 em diferentes isoformas de canais de sódio ativados por voltagem.

## **Objetivos específicos**

- Caracterizar eletrofisiologicamente do efeito da rPnTx1 em diferentes isoformas de canais de sódio ativados por voltagem em ovócitos de *Xenopus laevis*, neurônios dos Gânglios da Raiz Dorsal de ratos e células de cultura imortalizadas.
- Comparar o efeito da rPnTx1 com o efeito da toxina nativa em canais de sódio expressos em ovócitos de *Xenopus laevis*.
- Comparar parâmetros estruturais da rPnTx1 com a PnTx1 através de experimentos de dicroísmo circular.
- Verificar o efeito da toxina rPnTx1 em canais de cálcio ativados por voltagem expressos em neurônios dos Gânglios das Raízes Dorsais de ratos.

## **Materiais e Métodos**

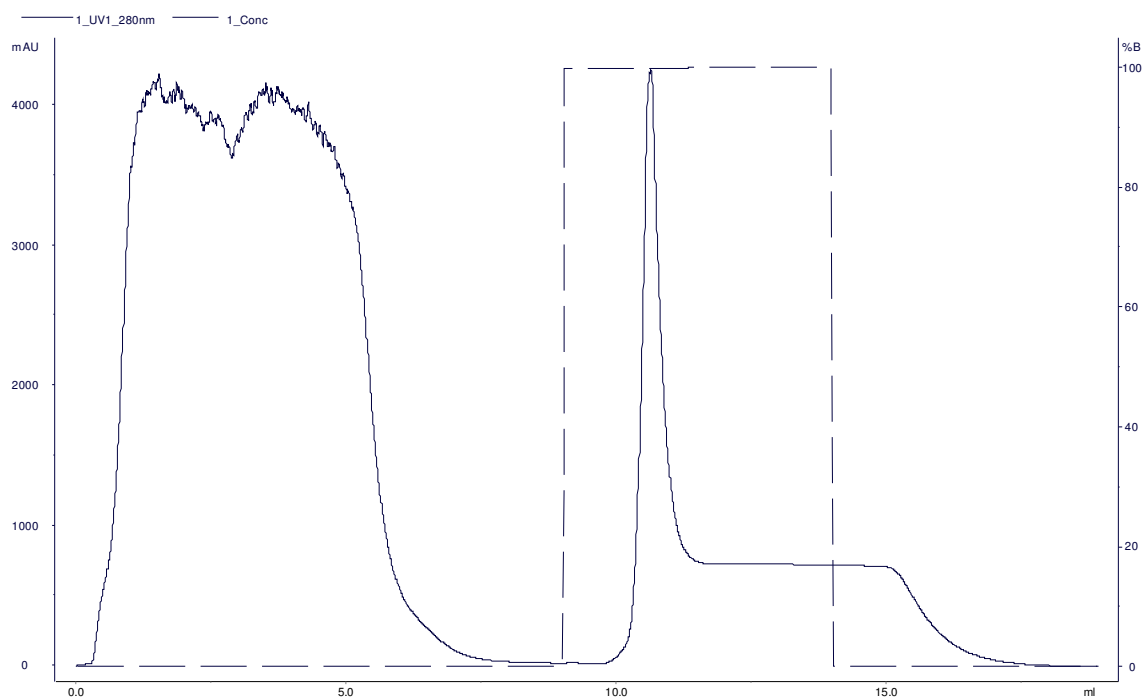
### **Expressão da toxina recombinante**

O protocolo a seguir foi determinado por Diniz *et al*, 2006 e modificado por Torres *et al*, 2010. O vetor de expressão pET32c(+) apresenta o promotor do fago T7, portanto a ativação da síntese da T7 polimerase pelo indutor leva a expressão dos peptídeos recombinante. Esses peptídeos originados pelo vetor contêm uma sequência de seis histidinas na porção N-terminal (*histag*), o que permite a purificação do peptídeo por cromatografia de afinidade em uma coluna carregada com o cátion metálico Ni<sup>2+</sup> (IMAC, *Immobilized metal ion affinity chromatography*). Dessa forma, células de *E. coli* da linhagem BL21(DE3)pLysS, transformadas com o DNA plasmídico recombinante pET-32c(+)-Tx1 (a transfecção era possibilitada após a exposição das bactérias a uma solução salina de cloreto de sódio) eram inoculadas em meio de cultura LB suplementados com ampicilina/cloranfenicol (100 µg/ml; 34 µg/ml) As culturas cresciam por 16h. Dez ml do pré-inóculo eram inoculados em 240 ml de meio LB, suplementado com os mesmos antibióticos, e cresciam sob agitação constante de 250 rpm até DO<sub>600nm</sub> entre 0,6 – 1,0. A produção do peptídeo recombinante foi induzida pela adição de isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) na concentração final de 1 mM com incubação a 23°C por 16h. Posteriormente, as células eram centrifugadas a 3.000 g (Beckman CS-6R) por 30 min, à temperatura ambiente e o sedimento submetido a congelamento por 20 min, seguido de descongelamento por 20 min. O precipitado viscoso era ressuspenso em uma solução de tampão de



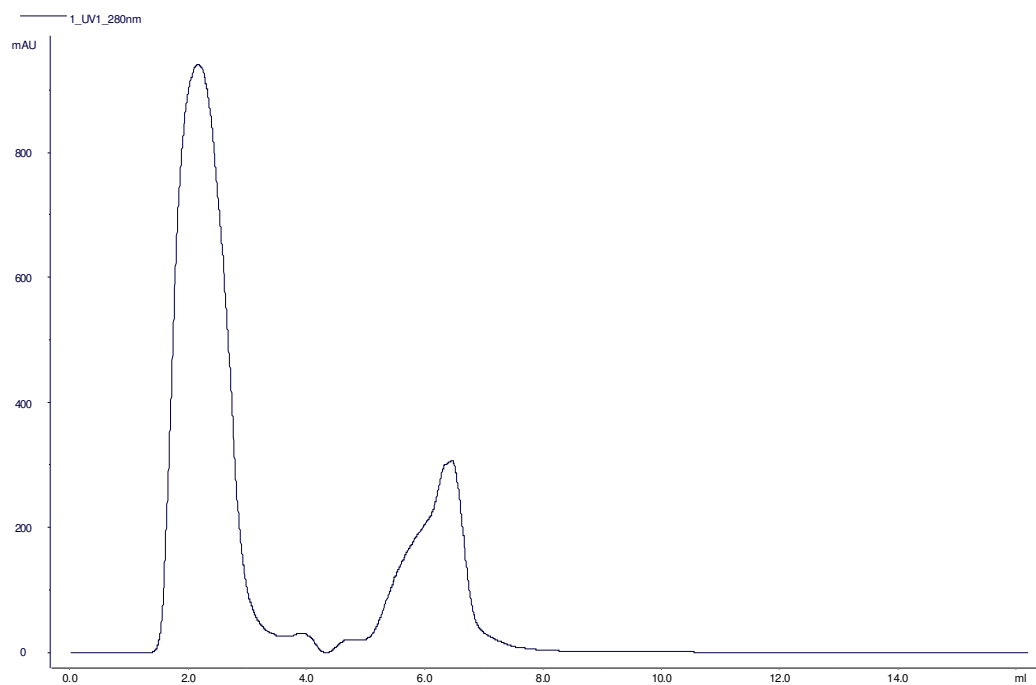
ligação (0,03 M imidazol, 0,5M NaCl e 0,02 M fosfato de sódio, pH=7,4). O rompimento celular era concluído por sonicação a 60 Hz (3 ciclos de 1 min). Uma centrifugação a 12.500 g (Beckman J2-MC Rotor JA-20) por 10 min possibilitava recolher o sobrenadante, que era utilizado para análises nos procedimentos de purificação.

Esse sobrenadante continha as proteínas do extrato celular e a toxina recombinante rPnTx1 em fusão com a proteína tiorredoxina (Trx), uma cadeia polipeptídica composta por seis histidinas, sítios de clivagem para a enzima enteroquinase e outros resíduos excedentes, estrutura aqui denominada de Trx-Histidina-Tx1. Essa foi aplicada em uma coluna de afinidade do tipo HisTrap™ HP Chelating HP 1 ml (Ni Sepharose™ Alta Performance - Amersham Biosciences), carregada com ions Ni<sup>2+</sup> imobilizados e equilibrada com o tampão de ligação. A cromatografia era realizada em aparelho HPLC (sistema ÄKTA Purifier 10, Amersham-Pharmacia Upsala, Suécia), controlado pelo software UNICORN 4.11 com um gradiente linear (0-100%) de tampão de ligação (A) (20 mM NaHPO<sub>4</sub>, 0,5 mM NaCl, 30 mM Imidazol, pH=7,4) e eluição (B) (20 mM NaHPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH=7,4), numa extensão de 22 ml. Frações de 1 ml eram coletadas em um fluxo de 1 ml/ min e o perfil de absorbância era acompanhado por leituras a 280 nm (Figura 2).



**Figura 2: Figura representativa obtida através Cromatografia de afinidade de uma amostra contendo rPnTx1.** Protocolo experimental representado pela linha pontilhada. À esquerda: O perfil de absorvância foi acompanhado por leituras a 280 nm. À direita: gradiente de concentração do tampão B. O pico em 100% de tampão B representa a saída da rPnTx1.

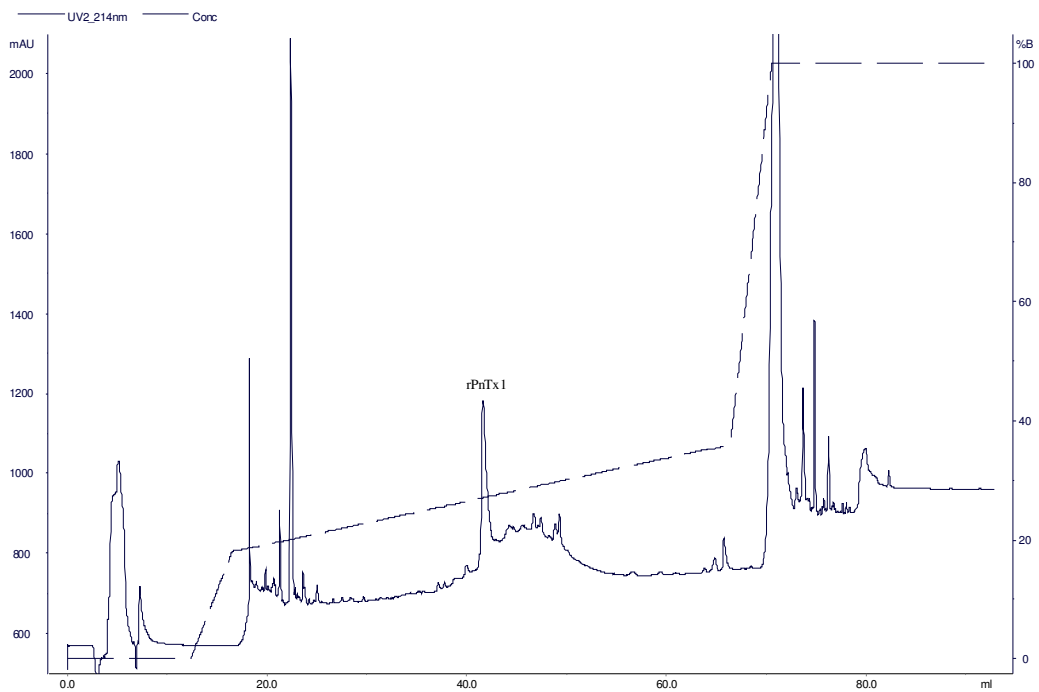
A fração obtida na etapa anterior era submetida à cromatografia de filtração em gel em sistema de HPLC, utilizando coluna Hitrap™ HP Desalting 5 ml (Sephadex™ G-25 Superfina - Amersham Biosciences). A coluna era previamente equilibrada com tampão Tris 0,025 M e as proteínas eluídas com o mesmo tampão, em um fluxo de 1ml/min. Frações de 1ml eram coletadas. O perfil de absorbância foi acompanhado por leituras a 280 nm (Figura 3).



**Figura 3: Figura representativa obtida através Cromatografia de gel filtração de uma amostra contendo rPnTx1. O primeiro pico representa a saída da toxina rPnTx1, enquanto o segundo pico a saída de sal da coluna cromatográfica.**

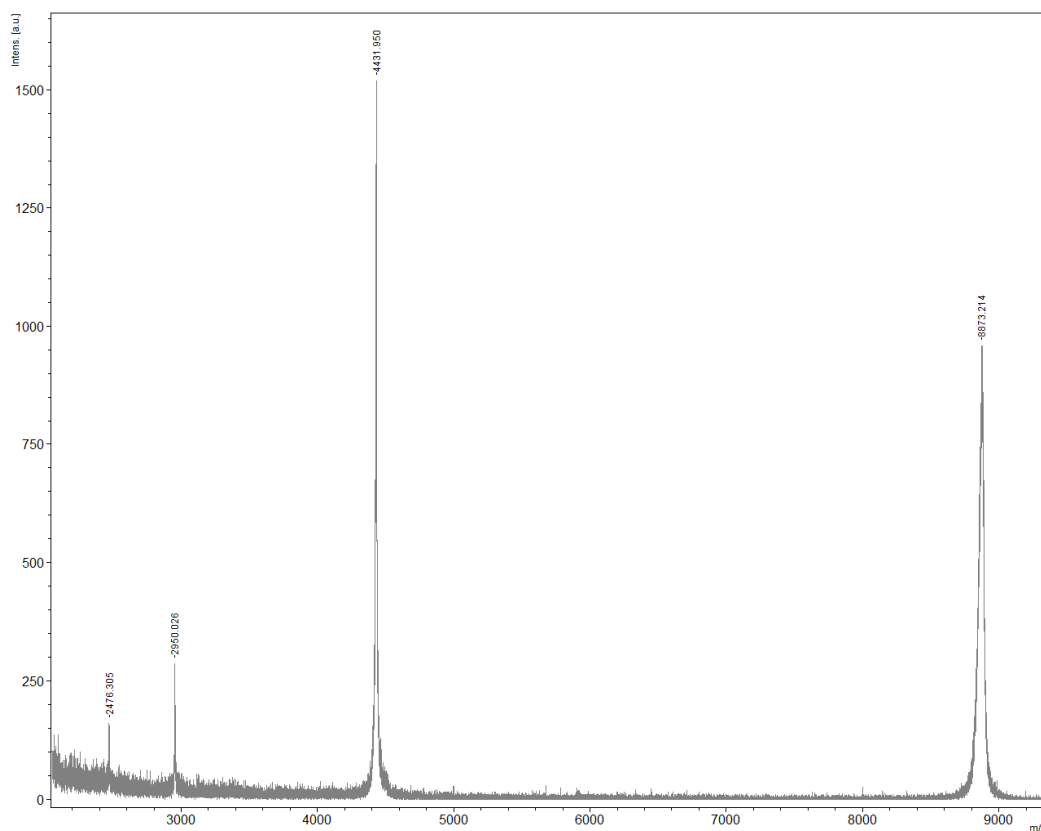
A fração purificada era colocada em tampão da enzima enteroquinase (Novagen- 0,02 M Tris-HCL pH=7,4, 0,05 M NaCl, 0,002 M CaCl<sub>2</sub>). Para a clivagem piloto, eram adicionadas diferentes quantidades de enzima enteroquinase e a reação era realizada a 37°C durante 16h. A análise da clivagem era realizada por cromatografia de fase reversa. Uma vez identificado o número de unidades de enteroquinase eficaz para a clivagem de determinada concentração toxina, era então montada a mistura de reação composta de toxina diluída em tampão de reação na concentração de 10 µg/µl (tampão de reação 10x com tris 100x concentrado; 0,5 unidades de enteroquinase diluída em tampão 1x e água Milli-Q®). O volume da reação de clivagem era 50 vezes maior que o volume da reação piloto.

Para obter a proteína pura, a solução contendo o peptídeo recombinante clivado era submetida à cromatografia em fase reversa em sistema de HPLC, com coluna Sephasil Peptide C 18 5µ ST 4.6/250, previamente equilibrada com o eluente A (0,1% de TFA em água Milli-Q®). O eluente B consiste em uma solução com 0,1% TFA em ACN. Os produtos de clivagem eram eluídos segundo o programa: 0% de B de 0 a 12 min.; 0 a 18% de B 2 min.; 18 - 36 % de B de 19 a 102 min.; 36 - 100% de B de 104 a 106min; 100% de B de 106 a 125 min. e 0% de B até 146 min). O fluxo era de 0,5 ml/min; frações de 1 ml eram coletadas e os peptídeos eram detectados por absorvância a 214nm (Figura 4).



**Figura 4: Figura representativa obtida através Cromatografia de fase reversa de uma amostra contendo rPnTx1.** Protocolo experimental representado pela linha pontilhada. À esquerda: O perfil de absorvância foi acompanhado por leituras a 214 nm. À direita: gradiente de concentração do eluente B. O pico em 28% de eluente B representa a saída da rPnTx1.

Para as análises por espectrometria em MALDI TOF/TOF MS era utilizado um aparelho Ultraflex II (Bruker Daltonics, Alemanha), controlado pelo programa FlexControl 2.4.30.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras (1  $\mu$ l) eram aplicadas em uma placa MTP AnchorChip 600/384 e era adicionada uma solução de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico) (1:1 v/v) até que houvesse a cristalização da mistura. Os espectros de MS eram obtidos em modo positivo/refletido, com a frequência do laser ajustada em 50Hz (Figura 5). Os dados eram analisados através do programa Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics, Alemanha).



**Figura 5: Figura representativa obtida através Espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF MS de uma amostra contendo rPnTx1. O pico à direita com a massa de 8858,1, seguido do pico de 4429 representam a toxina rPnTx1 na sua forma protonada e biprotionada respectivamente.**



## **Preparação e armazenamento da toxina**

A toxina recombinante liofilizada era ressuspensa em água desionizada, formando uma solução estoque com concentração de 1 mM, e essa solução dividida em alíquotas de 5 µl, que eram mantidas em -20°C. Após a leitura da concentração da toxina diluída no equipamento Nanodrop (Thermo Scientific) no comprimento de onda de 280 nm, a concentração da toxina foi calculada pela fórmula do coeficiente de extinção  $\epsilon_{280} = (\text{número de W}) * 5690 + (\text{número de Y}) * 1280 + (\text{número de C-C}) * 120$ . À medida que acabavam as alíquotas, o frasco seguinte era diluído. As alíquotas da toxina eram descongeladas na hora dos experimentos e a toxina era adicionada diretamente na solução extracelular.

## **Cultura de células dos Gânglios das Raizes Dorsais de ratos (DRG- Dorsal Root Ganglion)**

O protocolo para a obtenção dos neurônios DRG foi baseado no protocolo estabelecido por Eckert *et al*, (1997) e modificado por Moraes *et al*, (2011). As seguintes soluções eram usadas:

- **Solução de Ringer modificada** (sem adição de cálcio): NaCl (140,0 mM); KCl (2,5 mM); HEPES (10,0 mM) e Glicose (7,5 mM); pH ajustado em 7,4 com NaOH.

- **Solução Enzimática 1:** Papaína (1 mg/ml), ativada pela adição de cisteína (0,03 mg/ml) diluídas em solução de Ringer modificada filtrada.

- **Solução Enzimática 2:** Colagenase (3 mg/ml), diluída em solução de Ringer modificada filtrada.

- **Meio de cultura F12:** com 10% V/V soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina na concentração de 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina.

- **Meio de cultura L15:** com 10% V/V soro fetal bovino e concentração de 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina.

Os ratos Wistar machos (220-280g), provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, eram decapitados por guilhotinamento. Dos DRG obtidos cirurgicamente eram removidos manualmente o excesso de tecido conjuntivo e as meninges, colocados em solução de Ringer modificada e submetidos ao tratamento enzimático. Os gânglios eram incubados a 37°C em tubos de 15 ml contendo 3 ml da solução enzimática 1 por 20 min. Em seguida, eram centrifugados por 30 segundos e o sobrenadante era descartado. Era adicionada ao tubo a solução enzimática 2 e a mistura incubada e centrifugada conforme descrito anteriormente. Após o descarte da solução, eram adicionados 3 ml do meio de cultura F12 para lavar os gânglios e interromper a ação enzimática. Então, centrifugava-se e

descartava-se o sobrenadante novamente. Adicionava-se 1 ml do meio F12 e iniciava-se a dissociação mecânica com pipetas Pasteur de vidro com as pontas polidas (diâmetro interno final em torno de 2 mm). Eram colocados 500 µl do meio contendo as células isoladas em lamínulas de vidro autoclavadas e colocadas em placas de Petri (25 mm de diâmetro). As lamínulas eram previamente cobertas com solução de poli-L-lisina (20 µg/ml) e mantidas a 4 °C por no mínimo 12 horas. Após esse período, eram lavadas com água desionizada estéril e estocadas a 4 °C. Para o plaqueamento, as lamínulas eram cobertas com laminina (20 mg/ml) diluída em solução de Ringer modificada por 6 horas. O excesso de laminina era retirado antes do plaqueamento dos neurônios. As placas de Petri com as células eram colocadas na estufa (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% de umidade relativa) para a adesão dos neurônios às lamínulas. Após 2 horas, eram adicionados 2 ml de meio de cultura L15 às placas e essas placas eram mantidas a temperatura ambiente por 24 horas para a realização dos experimentos.

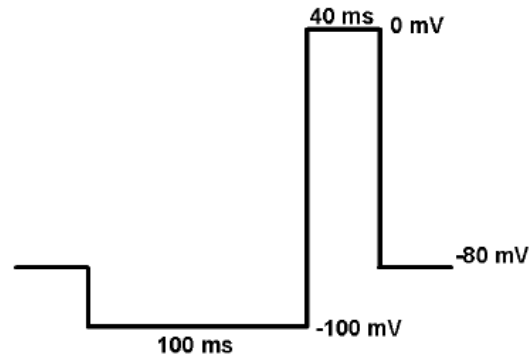
Para os experimentos eletrofisiológicos, utilizamos a técnica de *patch clamp*, na modalidade *whole-cell*. Os experimentos eram realizados à temperatura ambiente (20 – 25 °C) em uma mesa antivibratória (MTC-USA), com visualização em microscópio invertido *Nikon* (Japan) cercado por uma gaiola de *Faraday* devidamente aterrada com o objetivo de evitar a presença de interferência eletromagnética. As correntes eram registradas através de um amplificador (*Axonpatch* 200B - Axon Instruments, USA), ligado a um conversor analógico-digital (Digidata series 1200, Axon Instruments, USA) de modo de possibilitar a obtenção e visualização dos registros pelo *software pClamp 6*

(Axon Instruments, USA) instalado no computador. A micropipeta com resistência entre 1,0 e 1,5 M $\Omega$  era posicionada através do micro manipulador mecânico Narishige (Japan). O eletrodo de prata cloretada imerso na solução que preenche a pipeta de vidro era o responsável por detectar alterações elétricas nas membranas das células submetidas aos experimentos eletrofisiológicos, bem como por submeter as células às alterações de voltagem previamente selecionadas nos protocolos experimentais. O circuito elétrico era fechado pelo eletrodo de referência de prata cloretada imerso na solução de banho. Pipetas eram obtidas a partir de capilares de vidro de micro hematócrito usando um estirador vertical de pipetas de dois estágios (PP 830 Narishige, Tokyo, Japan). A ponta da pipeta era imersa na solução de banho e posicionada até sua ponta tocar a membrana da célula, o que podia ser verificado pelo aumento da resistência elétrica medida na ponta da pipeta. A pressão positiva feita antes de imergir a pipeta na solução era interrompida e, em seguida, era aplicada uma leve pressão negativa de modo a formar um selo de alta resistência, chamado de giga-selo. Posteriormente era aplicada uma pressão negativa adicional para o rompimento da membrana celular e a obtenção da configuração *whole-cell*. Essa configuração é caracterizada pela difusão da solução da pipeta para o meio intracelular de modo que se pode controlar as soluções intra e extracelulares e a corrente registrada é gerada pelos canais presentes em toda a membrana. A capacitância da membrana e a resistência de acesso eram compensadas e as correntes eram filtradas a 5 kHz e registradas com uma frequência de amostragem de 10 kHz. A subtração de artefatos capacitivos e de corrente de vazamento era feita por meio de um protocolo P/4.

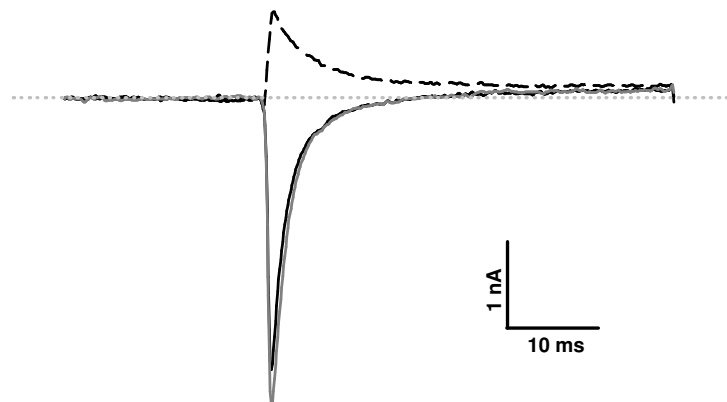
A solução contendo a toxina era perfundida próxima à célula estudada por um sistema de microperfusão. Essa solução ficava contida em uma seringa de vidro conectada a uma micropipeta cuja ponta tinha em média cerca de 80  $\mu\text{M}$  de diâmetro. A perfusão se faz por pressão ajustável de uma coluna de água, contruída a partir de uma seringa de vidro de 5 ml. O controle da perfusão foi feito acionando-se uma válvula solenóide, o que permite a utilização de volumes pequenos de solução contendo a toxina. Esse sistema permitia a utilização de pequenos volumes de solução contendo toxina.

O sistema de perfusão era testado periodicamente para verificar sua eficiência com solução de banho isenta de íons sódio. Pode-se observar na figura 6 que, na ausência de sódio, era passível de reversão, ou seja, geravam correntes positivas. Isso ocorre porque há uma pequena concentração deste íon na solução de pipeta que flui para o meio extracelular quando o canal está aberto. Na figura 7 pode-se observar o curso temporal da troca de solução ao redor da célula testada.

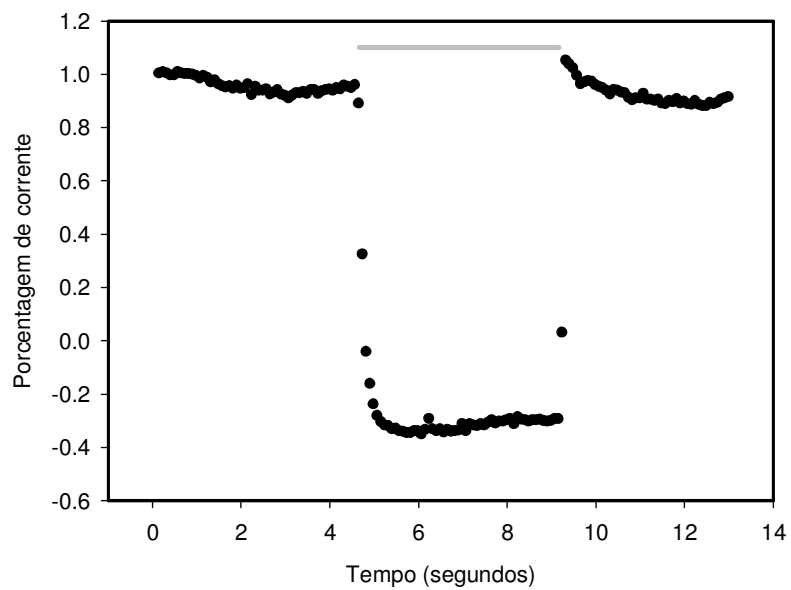
A



B



**Figura 6: Registro representativo da célula perfundida com solução de banho isenta de sódio.** (A) Desenho esquemático do protocolo experimental (B) A linha sólida preta representa o registro controle. A linha tracejada, a corrente observada após perfundir a célula com solução de banho 2. E a linha cinza mostra a corrente visualizada após a lavagem com a solução controle.



**Figura 7: Curso temporal da troca de solução pelo sistema de perfusão.** A célula era mantida a -80 mV e aplicava-se o pulso teste de 0 mV a cada 5 segundos. Cada ponto do gráfico corresponde ao valor do pico da corrente de sódio normalizada. A barra cinza acima corresponde ao período de perfusão com a solução de banho 2.

Para o registro das correntes de sódio em células dos DRG, as soluções de pipeta e banho eram preparadas de modo a evitar contaminações com correntes de outros canais ativados por voltagem expressos nesse tipo celular. Assim, as correntes de potássio eram bloqueadas utilizando íon césio como o cátion presente em maior concentração no meio intracelular e pela presença de cloreto de tetraetilamônio (TEA-Cl) nas soluções de pipeta e de banho. Canais de cálcio eram bloqueados pelos íons cádmio (0,2 mM) e níquel (0,2 mM) presentes na solução de banho. As seguintes soluções eram utilizadas:

- **Solução de pipeta** (mM): CsF ,100; NaCl, 20; HEPES, 10; EGTA, 11; TEA-Cl, 10 e MgCl<sub>2</sub> 5; pH 7,2 (CsOH).

- **Solução de banho 1** (mM): NaCl, 115; KCl, 5; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 1; HEPES, 10; TEA-Cl, 20; CdCl<sub>2</sub>, 0,2 e NiCl<sub>2</sub>, 0,2; Glicose, 5 mM; pH 7,4 (NaOH).

- **Solução de banho 2** (mM): cloreto de colina, 115; KCl, 5; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 1; HEPES, 10; TEA-Cl, 20; CdCl<sub>2</sub>, 0,2; NiCl<sub>2</sub>, 0,2; Glicose, 5; pH 7,4 (hidróxido de colina).

A solução final utilizada para registrar correntes de sódio era obtida pela combinação de 30% da solução de banho 1 e de 70% solução de banho 2. Desta forma a concentração final de sódio na solução de banho após o pH regulado para 7,4 era de 36 mM.



A célula examinada era mantida em um potencial elétrico igual a -80 mV (*holding potential*) em perfusão contínua, tanto por solução controle quanto experimental. Para estudar as correntes de sódio, um pré-pulso de -100 mV era aplicado por 100 ms, o que permitia que os canais iônicos deixassem o estado inativado, e seguido de um pulso teste de 0 mV por 40 ms. O protocolo era aplicado a cada 5 segundos e as correntes controle eram registradas até que se mostrassem estáveis. Em seguida, era perfundida a solução com toxina. O efeito da toxina recombinante era observado por até 10 minutos.

Para o gráfico da relação dose-resposta, a análise estatística dos resultados era utilizada a equação hipérbole retangular simples:  $y = \text{Max} * c / (IC_{50} + c)$ , onde  $y$  corresponde à porcentagem de inibição da corrente e  $c$  à concentração de toxina testada.

O protocolo de despolarização foi baseado no aplicado por Martin-Moutot *et al*, 2006. Esse protocolo consiste em manter o potencial de membrana (*holding potential*) despolarizado (-50 mV) e, depois de submeter a célula à um pulso hiperpolarizante (-100 mV por 100 ms), era aplicado um pulso teste a 0 mV por 40 ms.

Para o registro das correntes de cálcio, as seguintes soluções eram utilizadas:

- **Solução de pipeta** (mM): CsCl 140, HEPES 10, Lítio-ATP e fosfato de creatina 10; pH 7,4 (CsOH).

- **Solução de banho** (mM): TEA-Cl 132, CaCl<sub>2</sub> 2, CsCl 4, HEPES 10, Glicose 11, MgCl<sub>2</sub> 1; pH 7,4 (TEA-OH).

A célula estudada era mantida em -80 mV. O protocolo experimental para se observar o efeito da rPnTx1 nas correntes de cálcio consistia num pulso teste de -20 mV por 200 ms que se repetia a cada 5 segundos.

### **Cultura de células HEK 293 expressando canais Na<sub>v</sub>1.3**

As células de cultura imortalizada HEK 293 (Human Embryonic Kidney) eram mantidas em garrafas de cultura celular estéreis contendo 5 ml meio DMEM (Dulbecco Media Eagle Modified – Sigma Aldrich) suplementado com 10% V/V soro fetal bovino e concentração de 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Essas garrafas permaneciam em uma estufa a 37<sup>o</sup>C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para registros eletrofisiológicos, as células eram resuspendidas mecanicamente em meio de cultura e plaqueadas em lamínulas de vidro redondas com 12 mm de diâmetro colocadas em placas de Petri estéreis. Esse procedimento era feito entre 4 a 24 horas antes dos experimentos.

As configurações de *patch clamp* eram semelhantes às utilizadas em neurônios dos DRG. A resistência de pipeta utilizada para esse tipo celular estava entre 2,0- 2,5 MΩ.

As seguintes soluções eram utilizadas para os experimentos eletrofisiológicos com células HEK:

- **Solução de pipeta** (mM): CsCl, 135; MgCl<sub>2</sub>, 1; BAPTA, 10 e HEPES, 10. pH 7,2 (CsOH).

- **Solução de banho** (mM): NaCl, 150; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 1; glicose, 15 e HEPES, 10; pH 7,4 (NaOH).

Para verificar a velocidade de recuperação da inativação utilizamos um protocolo que consistia em manter a célula num potencial de -80 mV seguido por um pré-pulso de 0 mV por 200 ms. Era aplicado, então, um pulso hiperpolarizante de -100 mV, inicialmente de 0,5 ms aumentando de 2 em 2 ms até atingir 100 ms. Após o pulso hiperpolarizante de tempo variável, um pulso teste de 0 mV por 10 ms era dado de modo a observar-se a corrente residual.

### **Expressão heteróloga de canais de sódio ativados por voltagem em ovócitos de *Xenopus laevis***

Para a obtenção dos ovócitos, foi utilizado o protocolo semelhante ao descrito por Bianchi *et al*, 2006. Os ovócitos eram removidos cirurgicamente de rãs adultas da espécie sul-africana *Xenopus laevis* previamente anestesiadas. Para anestesiá-las, as rãs eram imersas em água fria com 0,03% de benzocaína, certificando-se que suas narinas estavam acima do nível da água. A rã era colocada com o ventre voltado para cima em gelo picado durante

aproximadamente 20 minutos antes de se iniciar o procedimento cirúrgico. O gelo era mantido até o fim da cirurgia para a manutenção da anestesia. Era feita uma incisão de aproximadamente 1 cm na parede abdominal inferior próximo a uma perna. Parte do ovário era removida cuidadosamente e colocada em solução ND96 (descrita abaixo). A pele era suturada e a rã era recolocada em água para se recuperar da anestesia.

Os ovócitos eram dissociados através de tratamento enzimático. Eles eram tratados com solução ND96 sem cálcio acrescida de 2 mg/ml de colagenase tipo II por 2 horas em temperatura ambiente para isolar os ovócitos e retirar a membrana folicular. Durante esse período, os ovócitos eram mantidos sob agitação suave e constante. Depois, eles eram lavados 4 vezes com solução ND96 e mantidos em solução por 3-4 horas antes de se realizar a seleção. Eram selecionados manualmente os ovócitos nos estágios IV e V através de seus aspectos morfológicos (tamanho e coloração). Nos estágios IV e V, os ovócitos estão maiores (1-1,2 mm em diâmetro) e visualiza-se que 50% de sua superfície está pigmentada de preto (polo animal) e 50% não está pigmentada (polo vegetal). Uma vez feita a seleção, eram injetados 50 nl de solução contendo o RNA do canal que se desejava expressar (subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ ) na concentração de 1 ng/nl utilizando um micro-injetor (Drummond Scientific, USA). Para a expressão, os seguintes vetores rNav<sub>v</sub>1.2/pCLT1, rNav<sub>v</sub>1.3/pNa3T, rNav<sub>v</sub>1.4/pUI-2, mNav<sub>v</sub>1.6/pLCT1, hNav<sub>v</sub>1.8/pBSTA, DmNav<sub>v</sub>1/pGH19, BgNav<sub>v</sub>1.1/pGH19 e VdNav<sub>v</sub>1/pGH19 eram linearizados com Not I. Os vetores rNav<sub>v</sub>1.7/pBSTA, e h $\beta$ 1/pGEM-HE eram linearizados com Sac II e Nhe I, respectivamente. Esses vetores eram transcritos com o Kit de transcrição T7

mMESSAGE-mMACHINE (Ambion). As construções hNav1.5/pSP64T e rβ1/pSP64T eram linearizadas com Xba I and Eco RI, respectivamente, e transcritos com o Kit de transcrição SP6 mMESSAGE-mMACHINE (Ambion).

Os ovócitos eram incubados em uma solução ND96 contendo (mM): NaCl, 96; KCl, 2; CaCl<sub>2</sub>, 1.8; MgCl<sub>2</sub>, 2 e HEPES, 5; pH 7,4 (NaOH) suplementado com 50 mg/l de sulfato de gentamicina e 180 mg/l de teofilina a 16°C por 1-5 dias até a expressão dos canais iônicos.

Para os experimentos eletrofisiológicos em ovócitos, os registros de *voltage clamp* de dois eletrodos eram realizados em temperatura ambiente (20-25°C) utilizando o amplificador GeneClamp 500 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) controlado por um sistema de aquisição de dados pClamp10 (Molecular Devices). Nessa técnica, um dos eletrodos (eletrodo de tensão) mede o potencial de membrana do ovócito e está conectado a um amplificador onde esse sinal é comparado ao sinal comandado. O outro eletrodo (o eletrodo de corrente) injeta a corrente correspondente à diferença de potencial de membrana medido e desejado. O circuito é fechado pelo eletrodo de referência imerso na solução de banho. Os eletrodos de corrente e voltagem são fios de prata cloretada (AgCl) imersos em uma pipeta de vidro preenchida com solução de KCl 3M. As resistências de ambos os eletrodos eram mantidas entre 0,5 e 1,5 MΩ. Um microscópio colocado sobre uma mesa antivibratória era utilizado para visualizar os ovócitos, que eram impalados com o auxílio de dois micromanipuladores manuais. Ao imergir os eletrodos na solução de banho, a diferença de potencial gerada entre os eletrodos e o banho era zerada. O

empalamento era feito no modo *current clamp* e era considerado bem sucedido quando verificado o potencial de repouso da membrana no amplificador. Após a inserção dos dois eletrodos, o amplificador é ajustado para o modo *voltage clamp* e era compensada a capacitância. A subtração de artefatos capacitivos e de corrente de vazamento era feita por meio de um protocolo P/4. A frequência de amostragem utilizada era de 20 kHz e utilizado o filtro de 2 kHz. A solução de banho (ND96) é a mesma utilizada anteriormente.

Para verificar o efeito da toxina nas diferentes isoformas de canais de sódio ativados por voltagem expressos em ovócitos, protocolos padrões de *voltage clamp* foram usados, a partir de um potencial de -90 mV e intervalos de 5 segundos em cada teste. O pulso teste consistia numa despolarização de 0 mV por 100 ms.

A relação corrente *versus* voltagem (*I*xV) era obtida por pulsos de despolarização de 50 ms iniciando em -90 mV até 70 mV com incrementos de 5 mV. A condutância do sódio ( $g_{Na}$ ) era calculada através de regressão linear do segmento ôhmico da relação *I*xV. Utilizando os parâmetros obtidos, a corrente máxima ( $I_{Na(max)}$ ) era calculada pela extrapolação da corrente em cada potencial. A fração dos canais ativados era dada por  $I_{Na}/I_{Na(max)}$ , onde  $I_{Na}$  é a medida do pico da corrente de sódio e  $I_{Na(max)}$  seria a corrente esperada se todos os canais estivessem abertos. Os dados eram ajustados através da equação de Boltzmann:  $I_{Na}/I_{Na(max)} = 1/[1 + (\exp(V_g - V)/k_g)]$ , onde V é o potencial de membrana,  $V_g$  é a voltagem correspondente a metade da condutância máxima e  $k_g$  é o fator de inclinação.

O efeito produzido pela toxina na dependência do potencial do estado estacionário da inativação foi investigado utilizando o protocolo padrão de dois estágios. Esse protocolo consiste em submeter as células ao pré-pulso de 200 ms de -90 a 65 mV (com incrementos de 5 mV) seguidos por um pulso teste de 0 mV por 100 ms. Os dados foram normalizados pela corrente de sódio máxima ( $I_{max}$ ), obtida nos potenciais mais negativos, grafados em função do potencial do pré-pulso e ajustados pela equação de Boltzmann:  $I_{Na}/I_{max} = \{1/[1 + \exp((V-V_h)/k_h)]\}$ , onde  $V_h$  é a voltagem correspondente à metade da inativação máxima,  $V$  é a voltagem do pré-pulso e  $k_h$  é o fator de inclinação.

### **Análise dos dados**

Para a análise dos registros experimentais, as correntes eram analisadas primeiramente no programa *pClamp 10* (Axon Instruments-USA) onde se obtinham os dados numéricos dos registros. Então, os dados eram importados pelo programa *Sigma Plot 10* no qual eram feitos os ajustes das curvas. Os dados eram apresentados através de média  $\pm$  Erro Padrão da Média (SEM, do inglês *Standard Error of Mean*) no texto e nas figuras. Os resultados foram analisados usando o *Student's paired t test*, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

### **Dicroísmo Circular**

Os espectros eram registrados em um espectrômetro de dicroísmo circular da marca Chirascan™. As concentrações de peptídeo utilizadas eram

de 6,8  $\mu\text{M}$  PnTx1 e 8,8  $\mu\text{M}$  rPnTx1 ambas dissolvidas em 1,0 ml de água desionizada. Os registros do espectro eram medidos na temperatura de 25°C de 190 a 250 nm usando uma cubeta de quartzo de 2mm. Os dados eram obtidos em intervalos de 0,5 nm na frequência de 1 nm/min. O espectro de dicroísmo circular registrado era a média de 10 leituras. A linha de base de cada uma dessas condições era subtraída de cada espectro das toxinas. A média dos espectros dicróicos foi estimada pelo programa de análise padrão *Pro Data Chirascan*.



## Resultados

### Efeito da rPnTx1 em correntes de sódio de células dos DRG

Os neurônios de menores diâmetros dos DRG expressam tanto canais de sódio sensíveis ( $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.6$  e  $Na_v1.7$ ) quanto canais resistentes a tetrodotoxina TTX ( $Na_v1.8$  e  $Na_v1.9$ ) e são responsáveis pela condução de estímulos dolorosos da periferia para o sistema nervoso central, sendo, então, um modelo fisiológico interessante para estudos experimentais (Catterall, 2000; Brochu *et al*, 2006; Ho & O'Leary, 2011).

A figura 8 mostra registros representativos das correntes de sódio em condições controle e após 10 minutos de tratamento com 3  $\mu$ M de rPnTx1, na qual pode-se observar uma inibição média no pico da corrente registrada de  $44,2 \pm 5,6\%$ .

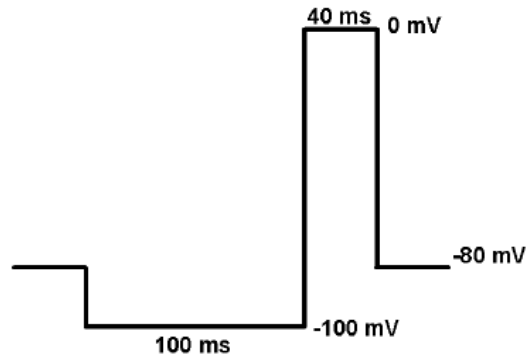
Como já mencionado anteriormente, as células dos DRG expressam tanto canais sensíveis quanto resistentes à tetrodotoxina. Até agora, verificou-se o efeito da rPnTx1 nas correntes de sódio total (soma das corrente de canais sensíveis e resistentes a TTX expressos na célula). O próximo passo, então, foi verificar se esse efeito inibitório ocorre nas isoformas resistentes a TTX. Para tanto, primeiramente a célula era perfundida com solução com 300 nM de tetrodotoxina, o suficiente para inibir toda a corrente sensível a essa toxina, e esperava-se a corrente estabilizar. Em seguida a célula era perfundida com solução contendo 300 nM de TTX e 3  $\mu$ M de rPnTx1 por 10 minutos

A figura 9 é um registro representativo de uma corrente com perfusão controle, na presença de TTX e após a perfusão da solução com TTX + rPnTx1. Uma vez que todos os canais de sódio sensíveis a TTX já estavam bloqueados, a rPnTx1 foi capaz de inibir  $26,2 \pm 4,9\%$  da corrente dos canais resistentes a TTX.

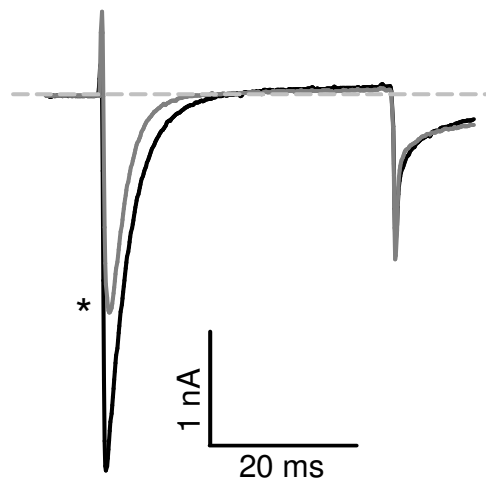
No estudo com a toxina nativa (Martin-Moutot *et al*, 2006), os pesquisadores mantiveram o potencial de membrana em potenciais despolarizados para verificar se havia modificação no efeito da toxina nos canais de sódio estudados. A hipótese era que a toxina poderia se ligar preferencialmente ao canal de maneira estado-dependente. Eles observaram que quando a célula era submetida a potenciais despolarizantes favorecia a ligação da toxina, uma vez que a inibição máxima foi obtida em um tempo mais curto e a porcentagem de inibição da corrente foi maior. Foi verificado, então, se também ocorreria modificação no percentual de inibição causada pela toxina recombinante, seguindo o mesmo protocolo experimental (Figura 10). A porcentagem de inibição aumentou significativamente de  $38,4 \pm 6,1\%$  para  $71,3 \pm 2,3\%$  (Figura 11) quando o neurônios dos DRG eram perfundidos por solução contendo  $1,5 \mu\text{M}$  de rPnTx1.

Diante do efeito inibitório observado, foram realizados experimentos para investigar a relação da inibição com a concentração de toxina no banho, em condições não despolarizantes. Na figura 11, pode-se observar a relação dose-resposta cuja inibição máxima observada foi de  $44,2 \pm 5,6\%$  e o  $\text{IC}_{50}$  foi  $0,6 \mu\text{M}$ .

A

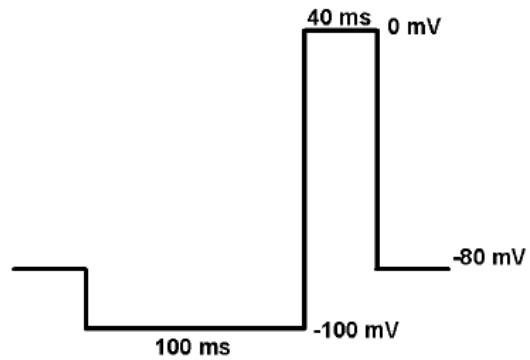


B

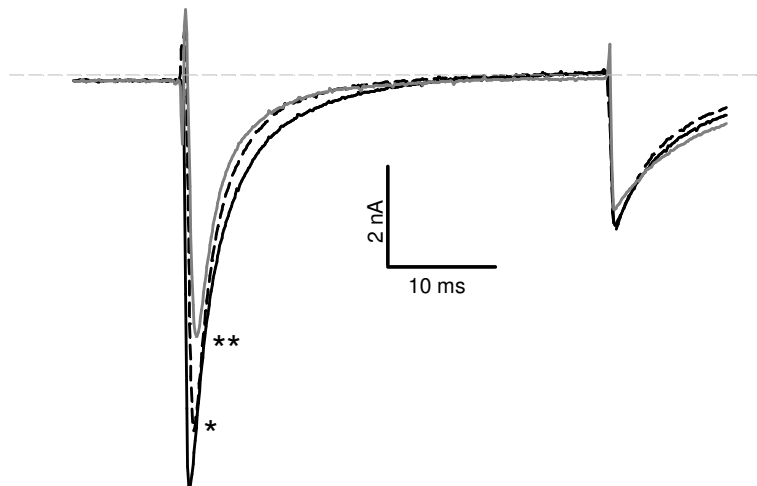


**Figura 8: Experimento representativo mostrando a inibição nas correntes de sódio de neurônios dos DRG.** (A) Desenho esquemático do protocolo experimental que consiste em manter a célula no potencial de -80 mV, um pré-pulso de -100 mV por 100 ms para remover a inativação, o potencial teste de -10 mV por 40 ms.(B) Em preto: a corrente de sódio da célula sob condição controle; Em cinza\*: corrente de sódio da mesma célula, registrado após 10 minutos de perfusão de 3 μM rPnTx1.

A

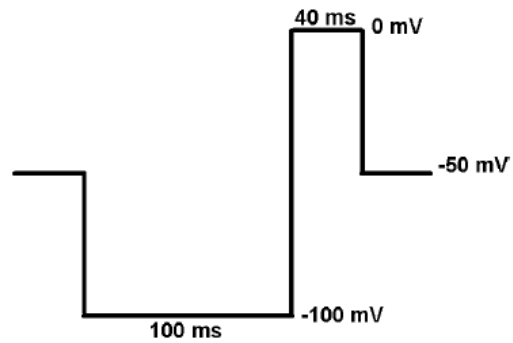


B

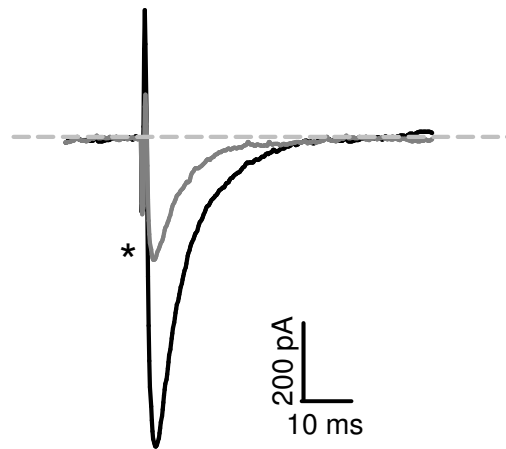


**Figura 9: Experimento representativo da inibição das correntes de sódio resistentes a TTX de neurônios dos DRG.** (A) Desenho esquemático do protocolo experimental (B) A linha preta sólida representa a corrente em condições controle e a linha tracejada\*, a corrente após a perfusão com 300 nM de TTX. A linha cinza\*\* mostra a corrente de sódio após 10 minutos de perfusão com a solução com 3  $\mu$ M rPnTx1. Potencial de  *Holding* -80 mV.

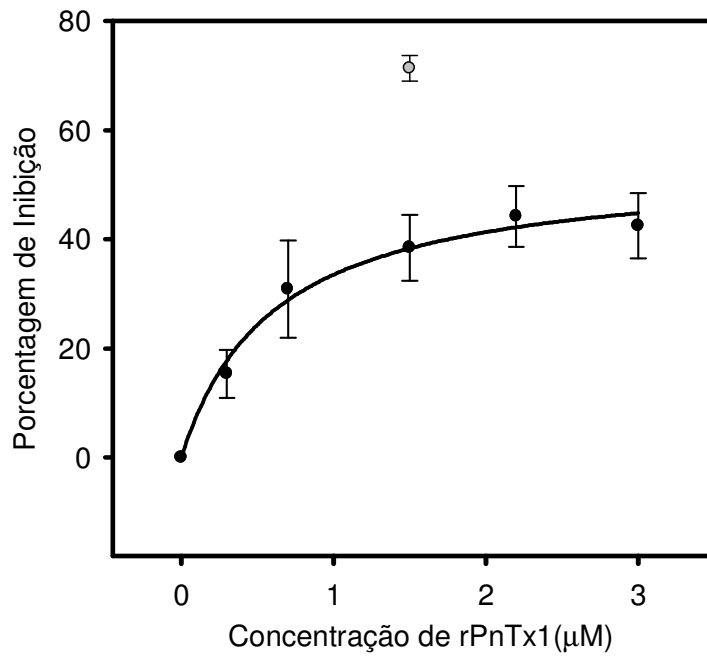
A



B



**Figura 10: Registros representativos das correntes de sódio com potencial de membrana mantido em -50 mV em neurônios dos DRG.** (A) Desenho esquemático do protocolo experimental (B) Registro controle (linha preta) e 10 minutos após a perfusão de solução com 1,5 μM rPnTx1 (linha cinza). As células foram mantidas no potencial de -50 mV, seguido de um pré-pulso de -100 mV por 100ms seguido pelo pulso teste de -10 mV por 40 ms.



**Figura 11: Relação concentração-resposta em neurônios dos DRG.** Os dados representados pelos círculos pretos foram obtidos no potencial de *holding* de -80 mV; em círculo cinza, no potencial de *holding* de -50 mV. Os dados foram ajustados utilizando a equação de hipérbole retangular simples em Materiais e Métodos. A análise da curva mostra que a inibição máxima foi de  $44,2 \pm 5,6\%$  e  $IC_{50} = 0,6 \mu\text{M}$ .

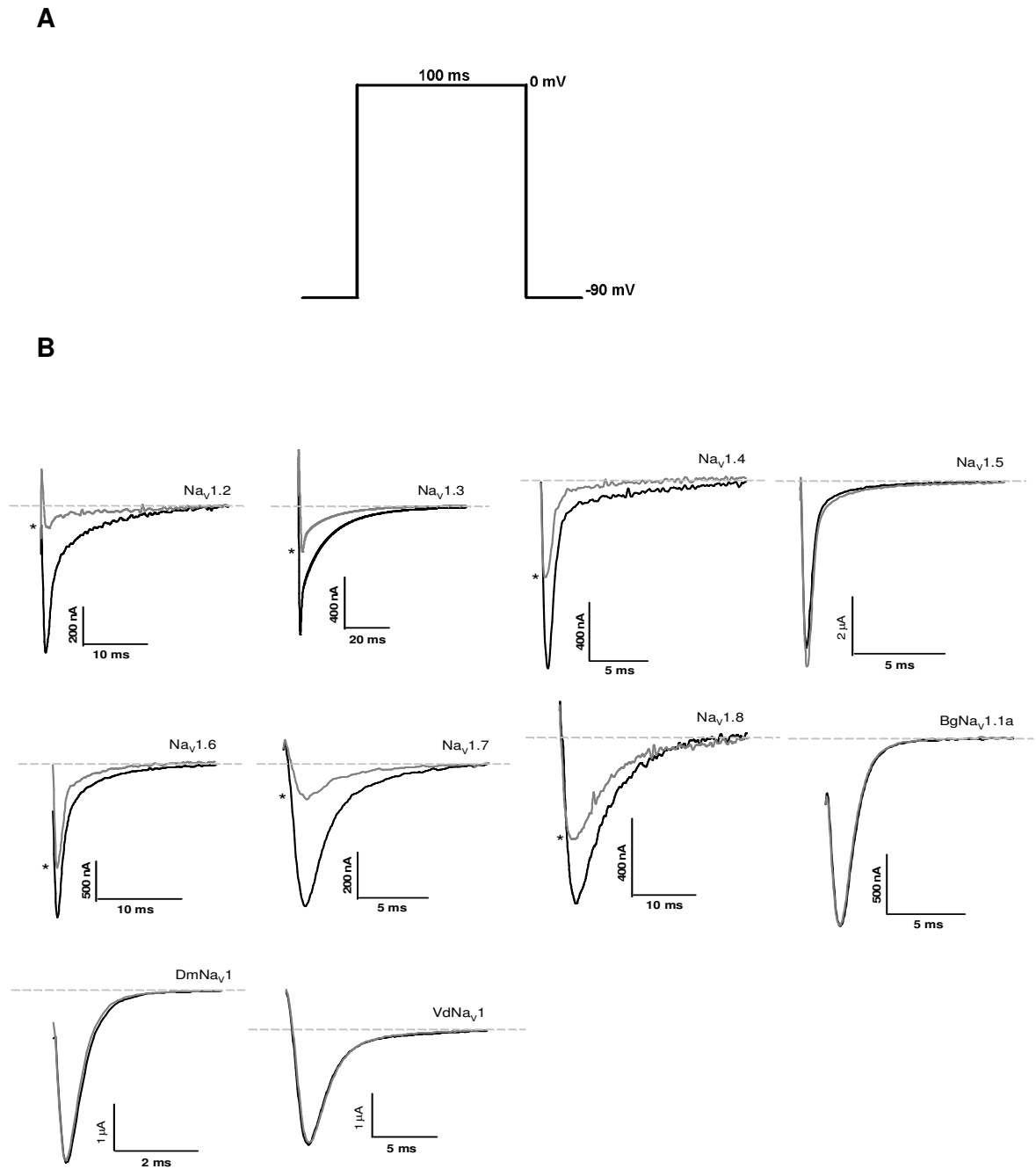
## **Ensaio do efeito da toxina recombinante em diferentes isoformas de canais de sódio**

O fato da inibição máxima ser parcial em célula expressando população heterogênea de canais de sódio, bem como o fato da inibição de correntes insensíveis a TTX ser menor do que a corrente total de sódio em neurônios dos DRG, sugere que a rPnTx1 tenha ações diferenciadas conforme a isoforma de canal de sódio. Para determinar a seletividade entre diferentes isoformas de canais de sódio ativados por voltagem de mamíferos e artrópodes foram realizados experimentos eletrofisiológicos em ovócitos de *Xenopus* expressando somente uma isoforma de canal de sódio. Uma vez que trata-se de uma célula grande (medindo em média 1 mm de diâmetro na fase selecionada), a vantagem desse modelo experimental é a possibilidade de obter correntes iônicas grandes.

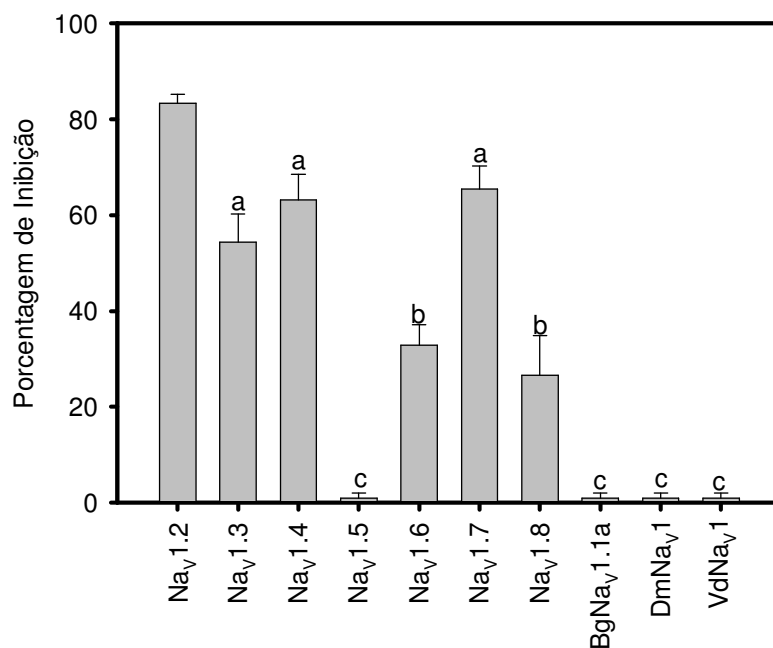
Na figura 12, verificou-se que a toxina apresentou alto efeito em canais rNav1.2, sendo observada a porcentagem de inibição igual a  $83,3 \pm 1,9\%$  com a perfusão de solução contendo a concentração de  $1\mu\text{M}$  de toxina. Também foi verificado que concentrações maiores de rPnTx1 não aumentaram o efeito inibitório. Na figura 13, podemos observar a porcentagem de inibição de cada isoforma testado e a seguinte ordem de seletividade para esses canais foi encontrada:  $r\text{Nav}1.2 > r\text{Nav}1.7 \approx r\text{Nav}1.4 \geq r\text{Nav}1.3 > m\text{Nav}1.6 \geq h\text{Nav}1.8$ . Nenhum efeito foi observado na isoforma hNav1.5 e em isoformas de canais de sódio de artrópodes estudados: de mosca de fruta *Drosophila melanogaster*

(DmNav1), de barata *Blattella germanica* (BgNav1.1a) e de ácaro *Varroa destructor* (VdNav1).





**Figura 12: Efeito da rPnTx1 em diferentes isoformas de canais de sódio expressos em ovócitos de *Xenopus laevis*.** (A) Desenho esquemático do protocolo experimental (B) Registros representativos de correntes sob condições controle (linha preta) e na presença de 1  $\mu\text{M}$  rPnTx1 (linha cinza\*) de 7 isoformas de canais de sódio ativados por voltagem de mamíferos e 3 isoformas de canais de artrópodes. A linha tracejada representa a linha de base. As células foram mantidas no potencial de -90 mV seguida do pulso teste de 0 mV.



**Figura 13: Porcentagem média de inibição das correntes de sódio em diferentes isoformas de canais expressos em ovócitos.** A inibição do canal Na<sub>v</sub>1.2 foi significativamente maior quando comparada com Na<sub>v</sub>1.3 (54,3±5,9%), Na<sub>v</sub>1.4 (63,2±5,3%) e Na<sub>v</sub>1.7 (65,4±4,8%) e nessas a inibição foi maior quando comparada a Na<sub>v</sub>1.6 (32,8±4,3%) e Na<sub>v</sub>1.8 (26,6±8,2%). Nenhum efeito foi observado em Na<sub>v</sub>1.5 e nas isoformas de artrópodes (DmNa<sub>v</sub>1, BgNa<sub>v</sub>1.1a e VdNa<sub>v</sub>1). Os símbolos (a), (b) e (c) denotam grupos sem diferença estatística entre eles. Concentração de rPnTx1 utilizada de 1 μM.

## **Análise cinética do efeito da toxina recombinante em canais Na<sub>v</sub>1.2**

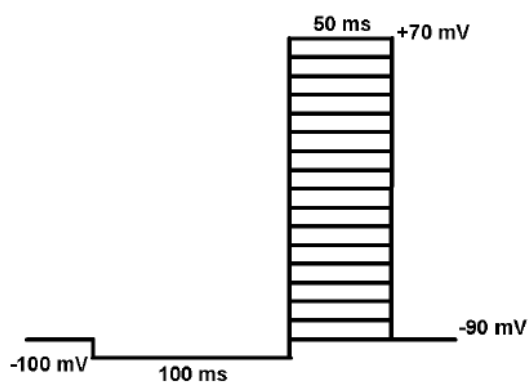
Após a observação do efeito inibitório da rPnTx1 nas correntes de sódio, com maior afinidade ao canal Na<sub>v</sub>1.2, verificou-se se a inibição ocorria devido ao bloqueio do poro ou se por alteração das propriedades cinéticas do canal. Na figura 14 pode-se observar a relação corrente *versus* voltagem (*I*xV).

A análise do gráfico *I*xV permite verificar se a inibição ocorreu devido a alterações na dependência de voltagem da abertura do canal. A concentração de toxina utilizada na solução de perfusão foi de 50 nM. Observou-se que o pico da corrente está reduzido e que não há mudança significativa na dependência de voltagem de abertura do canal.

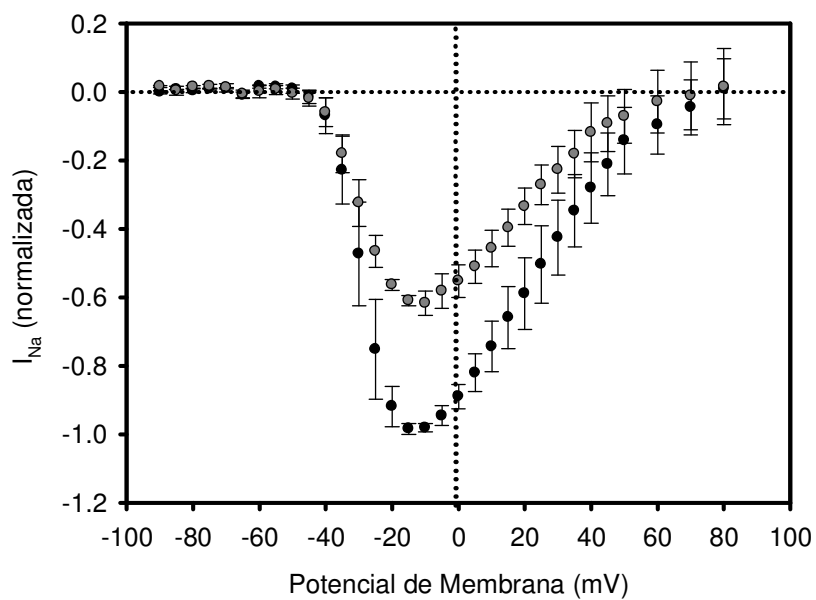
Na figura 15, observa-se o gráfico de corrente relativa (*I*/*I*<sub>máx</sub>) em relação à voltagem. Não houve diferença entre os parâmetros obtidos dos registros controles ( $V_{50} = -26,78 \pm 0,28$  mV;  $K = 5,11 \pm 0,25$ ) e os dos registros experimentais ( $V_{50} = -26,32 \pm 0,43$  mV;  $K = 6,11 \pm 0,39$ ), mostrando que a toxina não interfere na dependência de potencial da voltagem de ativação desses canais.

Também investigou-se o efeito da toxina recombinante no estado estacionário da inativação do canal de sódio. Na figura 16, mostrou-se através do ajuste da curva que não há diferença estatística entre os parâmetros dos dados experimentais e controle.

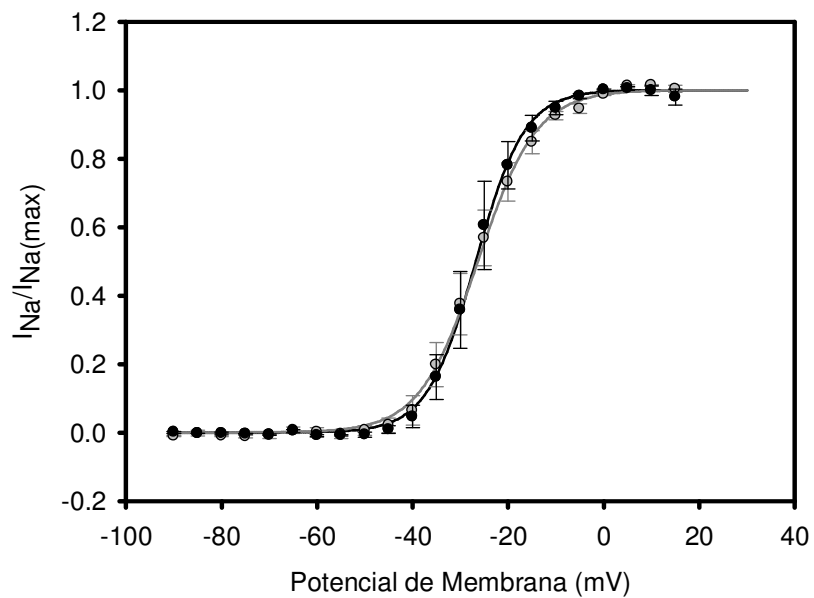
A



B

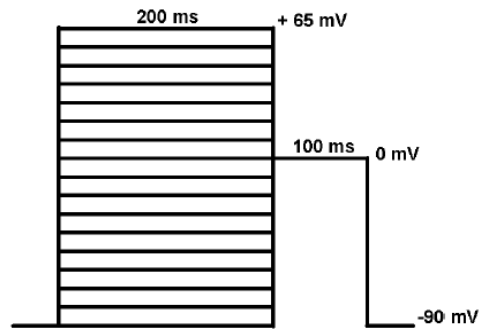


**Figura 14: Efeito de rPnTx1 na relação corrente versus voltagem.** (A) Desenho esquemático do protocolo experimental (B) Os simblos pretos mostram a média do pico das correntes de sódio controle e os simblos cinza mostram o pico da corrente na presença de 1  $\mu$ M rPnTx1 de 3 experimentos pareados. Todos os valores foram normalizados pelo pico máximo de corrente de cada célula correspondente.

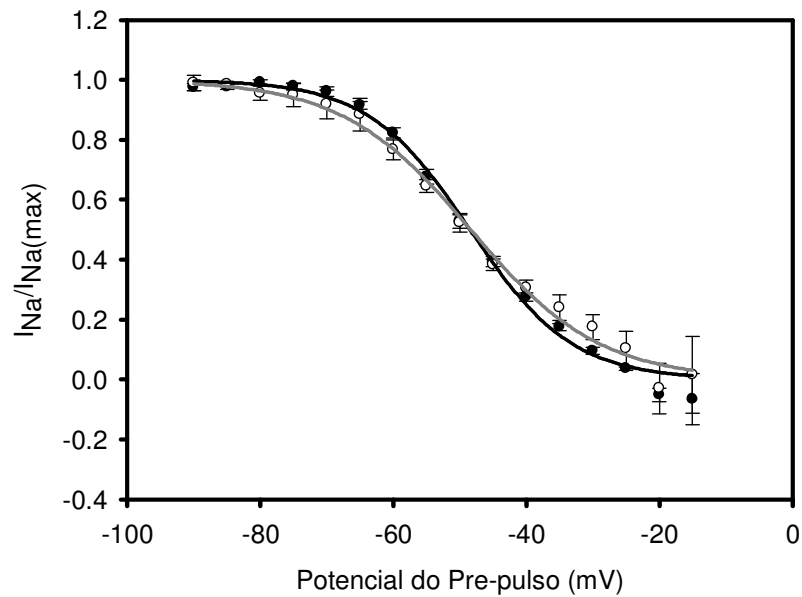


**Figura 15: Efeito da rPnTx1 na dependência de voltagem da ativação.** O gráfico representa pontos experimentais em condições controle (em preto) e após a perfusão de 50 nM de rPnTx1, em cinza (média  $\pm$  SEM,  $n=5$ ). Os dados foram ajustados com a equação de Boltzmann apresentada nos Materiais e Métodos, com os seguintes parâmetros:  $V_g = -26,78 \pm 0,28$  mV e  $-26,32 \pm 0,43$  mV,  $k_g = 5,11 \pm 0,25$  e  $6,11 \pm 0,38$  para controle e experimental, respectivamente.

A



B

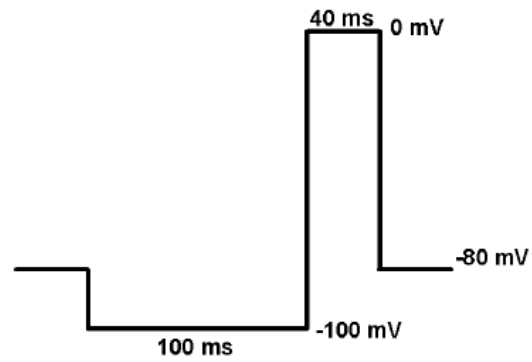


**Figura 16: A dependência de voltagem da inativação do estado estacionário.** (A) Desenho esquemático do protocolo experimental (B) Controle (em preto) e após perfusão com 50 nM de rPnTx1 (em cinza). Média de 3 experimentos. Pulso teste= 0 mV. Os dados foram ajustados com a equação de Boltzmann apresentada em Materiais e Métodos, com os parâmetros  $V_h = -48,47 \pm 0,51$  e  $-48,37 \pm 0,54$  mV,  $k_h = 7,6 \pm 0,45$  e  $9,7 \pm 0,5$  para controle e experimental respectivamente.

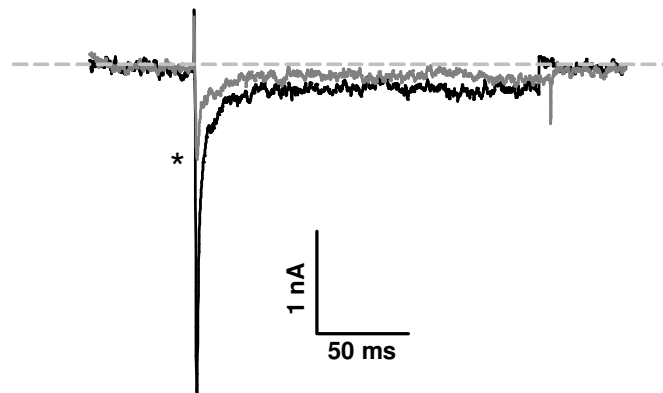
## Efeito da rPnTx1 na recuperação da inativação

A fim de confirmar se a ligação da toxina altera a velocidade de recuperação da inativação, utilizou-se células HEK 293 que expressam apenas os canais Nav1.3 e aplicou-se o protocolo para verificar a recuperação da inativação descrito previamente na seção de materiais e métodos. A vantagem desse modelo experimental é que pode-se ter a expressão homogênea de canais numa célula eucariota. Na figura 17 pode-se observar um registro representativo da inibição da rPnTx1 nesses canais. Com isso, o primeiro ponto era próximo de zero, pois em 0,5 ms não há tempo suficiente para que o canal se recupere do estado inativado gerado pelo longo pulso despolarizante. À medida que o tempo de hiperpolarização aumentava, mais canais saíam do estado inativado até que 100% dos canais tivessem tempo suficiente para se recuperar da inativação. Era feito o ajuste dos pontos com a equação de dupla exponencial:  $y = a \cdot (1 - \exp(-b \cdot x)) + c \cdot (1 - \exp(-d \cdot x))$ , onde a e b correspondem aos componentes rápidos da recuperação da inativação e c e d aos componentes lentos. Sendo que b e d são as constantes cinéticas da inativação, e quanto maior seus valores, mais rápida é a recuperação. Podemos observar na figura 18 os pontos correspondentes ao pico da corrente após cada tempo de recuperação. Os parâmetros do ajuste das curvas constantes na tabela 5 mostram que a toxina não altera a recuperação da inativação.

A



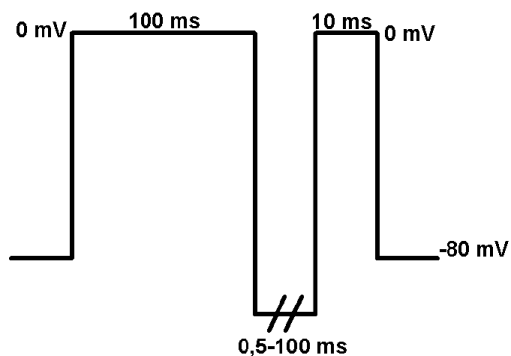
B



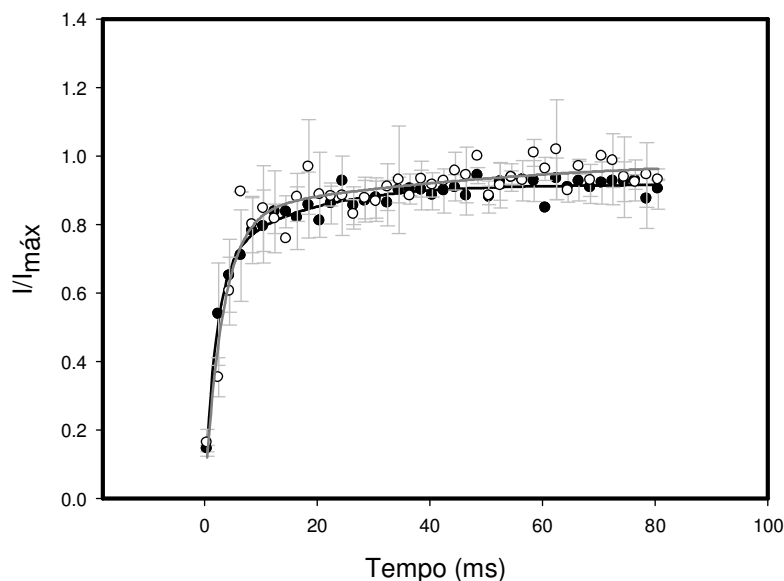
**Figura 17: Experimento representativo da inibição das correntes de sódio de canais de sódio  $\text{Na}_v1.3$  expressos em células HEK 293.** A linha preta sólida representa a corrente em condições controle e a linha cinza\* mostra a corrente de sódio após 10 minutos de perfusão com a solução com 1  $\mu$ M rPnTx1.



**A**



**B**



**Figura 18: Velocidade de recuperação da inativação.** (A) Desenho esquemático do protocolo experimental. As células foram mantidas a -80 mV seguido por um pré pulso de 0 mV por 200 ms. Logo após, a célula é submetida a um pulso hiperpolarizante de -100 mV, inicialmente de 0,5 ms aumentando de 2 em 2 ms até atingir 100 ms. Seguido por um pulso teste de 0 mV de 10 ms. (B) Os círculos pretos correspondem ao experimento controle, enquanto os brancos após a perfusão com a toxina. Os erros padrões estão representados pela barra cinza. Células HEK expressando canais  $Na_v1.3$  ( $n=2$ ).

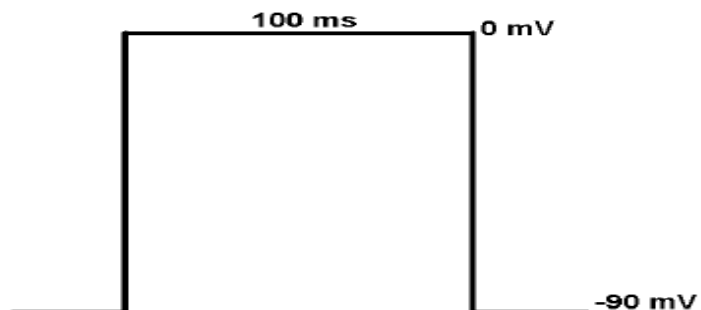
**Tabela 5:** Comparação dos parâmetros obtidos pelo ajuste das curvas de recuperação da inativação.

	<b>a</b>	<b>b ms<sup>-1</sup></b>	<b>c</b>	<b>d ms<sup>-1</sup></b>
<b>Controle</b>	0,68±0,05	0,49±0,07	0,24±0,05	0,06±0,02
<b>rPnTx1</b>	0,83±0,07	0,31±0,05	0,17±0,09	0,02±0,04

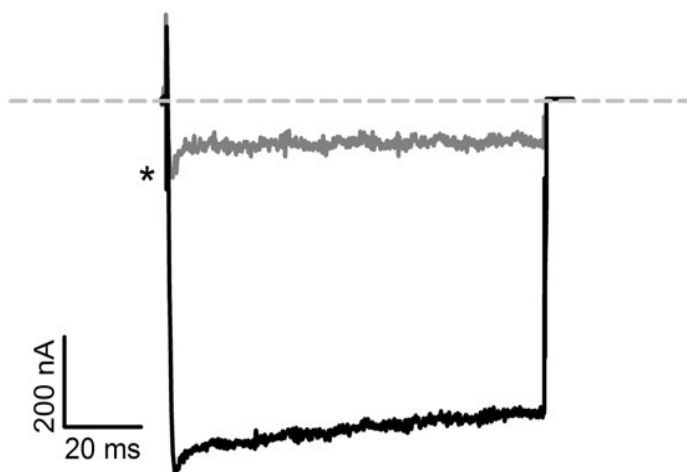
## **Efeito da rPnTx1 em canais deficientes na inativação rápida**

Uma vez que a toxina recombinante tem maior afinidade quando o canal é mantido em potenciais despolarizados, decidimos verificar se o bloqueio produzido se deve à manutenção do canal no estado inativado. Testamos o efeito da toxina em canais de sódio ativados por voltagem que não apresentam a inativação rápida conforme previamente descrito por West *et al*, 1992 . Para isso expressamos canais  $Na_v1.2$  uma vez que a toxina recombinante apresenta maior afinidade por esse canal. Nesses canais expressos em ovócitos de *Xenopus*, o motivo IFM, presente na alça intracelular entre os domínios III e IV, foi substituído por três glutaminas (QQQ). As correntes geradas pela abertura desses canais apresentam um perfil distinto das correntes do canal não mutado, por não apresentarem a inativação rápida (Figura 19). Observamos que esta preparação apresenta inibição quando perfundida com  $1\mu M$  de rPnTx1 (Figura 19). A porcentagem de inibição foi significativamente menor ( $74,0 \pm 3,0\%$ ) do que canais  $Na_v1.2$  não mutados, sugerindo que a inativação pode afetar de alguma forma o efeito da toxina. Porém, a acentuada inibição mostra que o efeito não se deve à estabilização do estado de inativação rápida.

A



B



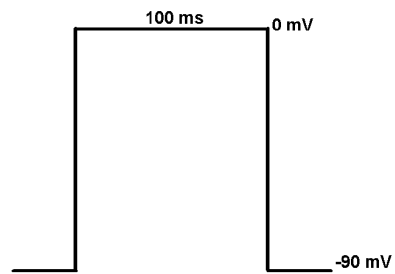
**Figura 19: Efeito da rPnTx1 nos canais  $Na_v1.2$  deficientes de inativação rápida.** (A) Desenho esquemático do protocolo experimental. O protocolo utilizado consistia em manter a célula em potencial de -90 mV, seguido de um pulso teste de 0 mV por 100 ms. (B) Registro representativo da corrente antes (em preto) e após (em cinza\*) a adição de 1  $\mu$ M rPnTx1 em ovócitos expressando canais  $Na_v1.2$  mutados para remover a inativação rápida. A linha tracejada representa a linha de base. A porcentagem de inibição da corrente nesses canais foi  $74.0 \pm 3.0$  (n=3).

## Comparação biofísica e estrutural entre as toxinas nativa e recombinante

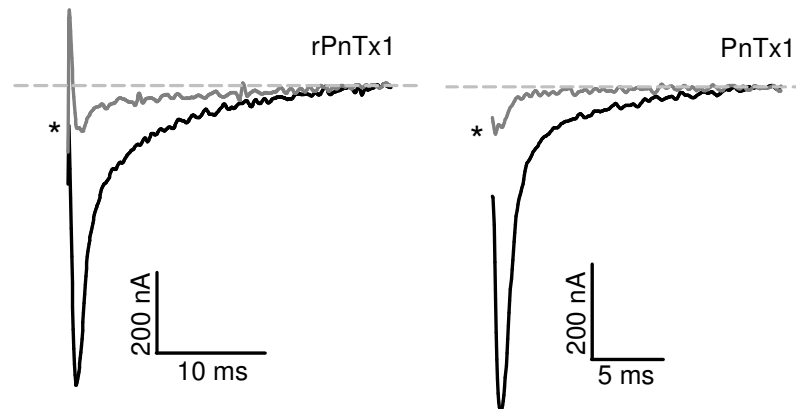
A fim de verificar se a toxina recombinante apresentava efeito semelhante à toxina nativa, comparamos o efeito de ambas nas correntes de sódio de canais  $Na_v1.2$  (Figura 20). Não houve diferença significativa na porcentagem de inibição da corrente de ambas as toxinas (PnTx1:  $85,0 \pm 0,8\%$ ; rPnTx1:  $83,3 \pm 1,9\%$ ). Contudo, para nossa surpresa, ao analisar o gráfico concentração-resposta das toxinas (Figura 21) observamos que o  $IC_{50}$  da rPnTx1 foi estatisticamente menor que da PnTx1 ( $IC_{50}$   $33,7 \pm 2,9$  nM e  $105 \pm 12$  nM, respectivamente).

Partimos então para a comparação estrutural através da análise dos sinais dicróicos em experimentos de dicroísmo circular (CD). As toxinas foram diluídas em 1 ml água desionizada e medidas suas concentrações ( $6,8 \mu\text{M}$  e  $8,8 \mu\text{M}$  para PnTx1 e rPnTx1, respectivamente). Utilizou-se a cubeta de 2 mm e os espectros de cada peptídeo obtidos da média de 10 leituras, subtraída da linha de base dada pela leitura do espectro da água desionizada na ausência de peptídeo. O resultado pode ser observado no gráfico da figura 22, onde pode-se verificar que os espectros dicróicos apresentam uma boa superposição em ampla faixa de comprimentos de onda e diferença na região do comprimento de onda entre 190-205 nm. Uma possível explicação seria que essa diferença se deve à presença de três resíduos de aminoácidos a mais (uma alanina e uma metionina na porção N-terminal e uma glicina no C-terminal) na toxina recombinante em relação à nativa.

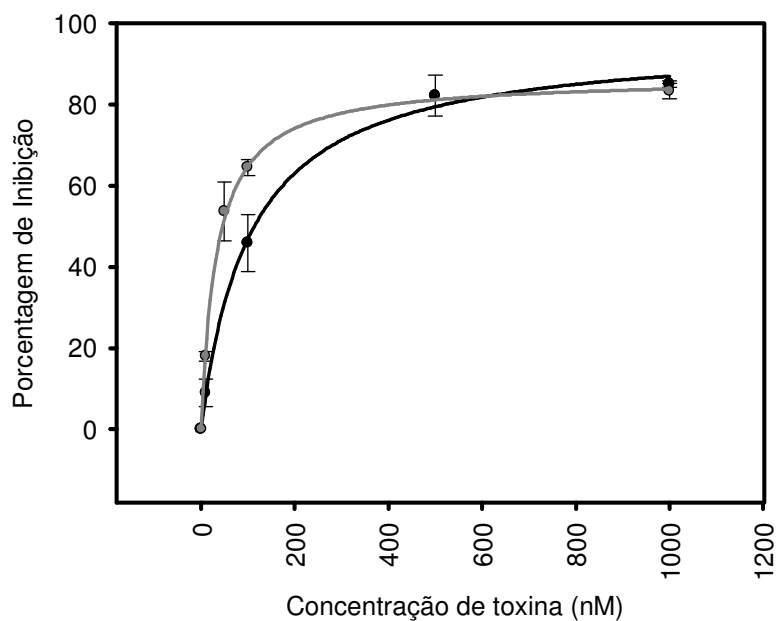
**A**



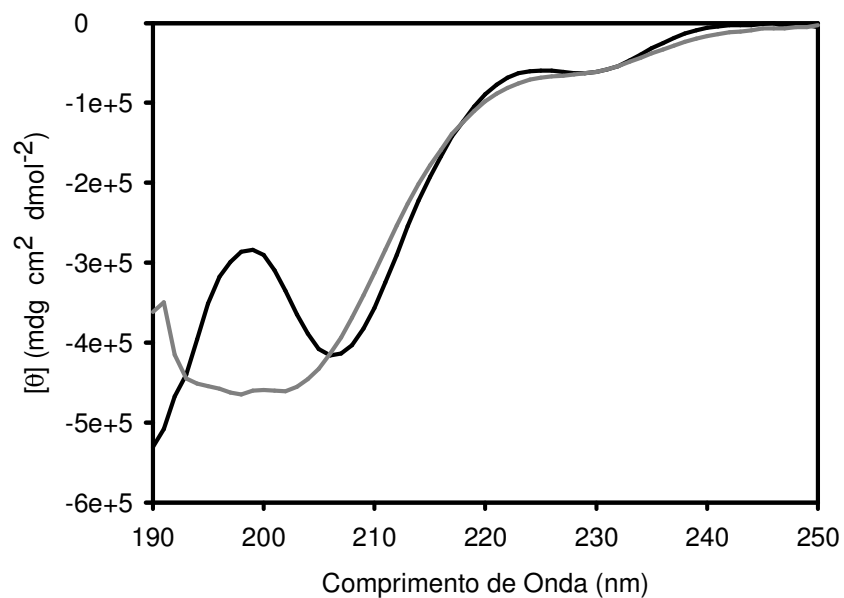
**B**



**Figura 20: Comparação do efeito da rPnTx1 com o efeito da toxina nativa (PnTx1) em canais  $Na_v1.2$ .** (A) Desenho esquemático do protocolo experimental (B) À esquerda: Traço representativo da corrente antes (em preto) e após (em cinza\*) adição de 1  $\mu$ M de rPnTx1 à solução externa. À direita: Traço representativo da corrente antes (em preto) e após (em cinza\*) a perfusão com 1  $\mu$ M PnTx1.



**Figura 21: Gráfico da dependência da concentração de toxina na inibição de canais  $Na_v1.2$ .** Efeito da PnTx1 (símbolo preto) e da rPnTx1 (símbolo cinza). Os dados foram ajustados com a equação hipérbole retangular simples (Materiais e Métodos) na qual obtemos os seguintes parâmetros: inibição máxima  $85,0 \pm 0,8\%$  e  $83,3 \pm 1,9\%$ , e  $IC_{50}$   $33,7$  nM e  $104,8$  nM para rPnTx1 e PnTx1 respectivamente (n=3).



**Figura 22: Espectro de dicroísmo circular das toxinas nativa e recombinante.** Cada faixa representa a média dos espectros dicróicos das toxinas PnTx1 (linha preta) e rPnTx1 (linha cinza). As toxinas foram diluídas em água desionizada. A concentração dos peptídeos foi de 0,15 mg/ml e 0,19 mg/ml respectivamente. Os traços representam a média de 10 espectros separados para cada condição.

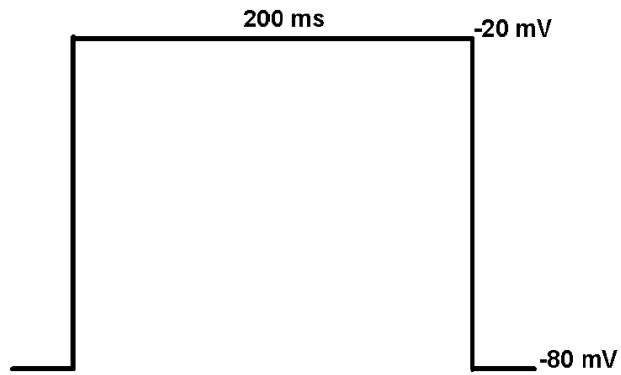
## **Efeito da rPnTx1 em correntes de cálcio de células dos DRG**

Uma questão a ser resolvida era em relação à existência ou não de efeito em canais de cálcio, dado a similaridade da sequência de aminoácidos da PnTx1 com a  $\omega$ -Agatoxina IIIA, toxina conhecida por bloquear canais de cálcio ativados por voltagem. Existem trabalhos na literatura que mostram a atuação da PnTx1 nesse canal (Santos *et al*, 1999; Gouvêa dos Santos *et al*, 2006). Contudo, o trabalho de Martin-Moutot *et al*, 2006 sugere que esse efeito seja devido à contaminação da amostra pela toxina PnTx3-3 conhecida por bloquear canais de cálcio (Leão *et al*, 2000). Uma vez que a rPnTx1 é sintetizada em um sistema heterólogo, livre de contaminação com outra toxina, torna-se um modelo interessante para esse tipo de experimento. Testou-se, então, efeito de 1 $\mu$ M da toxina recombinante em canais de cálcio expressos constitutivamente em neurônios de DRG de ratos.

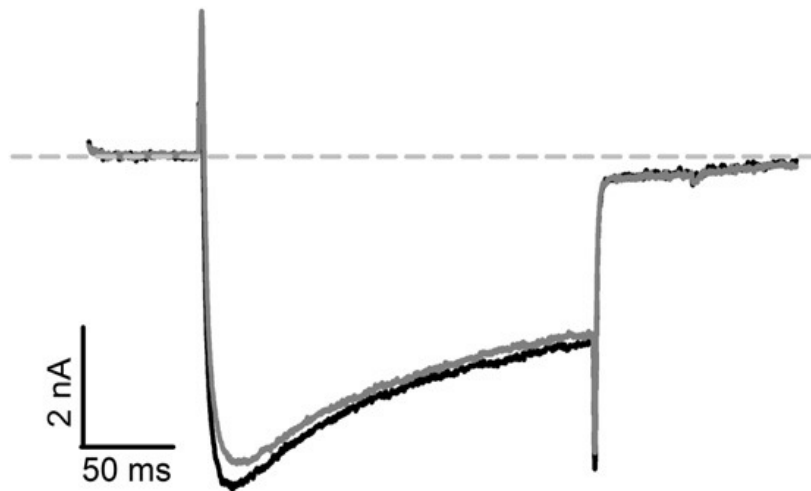
Assim, mostrou-se que a toxina recombinante não tem efeito na corrente de cálcio de canais ativados por voltagem neuronais (Figura 23).



A



B



**Figura 23: Efeito de 1 $\mu$ M rPnTx1 em canais de cálcio de neurônio dos DRG.** (A) Desenho esquemático do protocolo experimental. As células foram mantidas no potencial de *holding* igual à -80 mV e o pulso teste usado era -20 mV por 200 ms, registrado na frequência de 5 segundos.(B) Registro representativo das correntes de cálcio antes (em preto) e 10 minutos após (em cinza) a perfusão de na solução externa com 1  $\mu$ M de rPnTx1. A linha de base é representada pela linha cinza tracejada.

## Discussão

Este estudo foi o primeiro a caracterizar eletrofisiologicamente o efeito da toxina recombinante rPnTx1 em canais de sódio ativados por voltagem. Também mostrou-se, utilizando uma toxina livre de possível contaminação com outras toxinas do veneno, que ela não tem efeito em canais de cálcio dependentes de voltagem. Assim, apesar de apresentar uma similaridade com a sequência de aminoácidos da  $\omega$ -agatoxina IIIA, podemos afirmar que essa toxina não tem efeito significativo em canais de cálcio neuronais ( $Ca_v2.1$ ,  $Ca_v2.2$ ,  $Ca_v2.3$  e  $Ca_v3.2$ ) (Lewis *et al*, 2012). Esse resultado suporta a interpretação do estudo de Martin-Moutot *et al*, (2006), o qual afirma que o efeito da toxina relatado em canais de cálcio foi devido à contaminação da amostra com uma toxina da fração 3 do mesmo veneno e atuante nesses canais.

Por causa das limitações na realização de experimentos com toxinas nativas, a expressão do peptídeo recombinante pode vir a suprir algumas dessas limitações, como a possibilidade de obter quantidades maiores de material sem contaminação e, além disso, de permitir a realização de mutações sítio-dirigidas para estudos de estrutura-função. A principal dificuldade da utilização do sistema de expressão heteróloga para obtenção da toxina recombinante é que ela apresente estrutura e atividade semelhantes à nativa. Uma dificuldade especial das toxinas de aranha, particularmente as toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer*, é a grande quantidade de cisteínas na sua sequência de aminoácidos e formação de pontes dissulfeto (Richardson *et al*,

2006). Por esse motivo, na maioria das vezes, a tentativa da expressão dessas toxinas recombinantes resulta em peptídeos com baixa ou nenhuma atividade. Dessa forma, a expressão da rPnTx1 com 81 aminoácidos em sua sequência e formação de 7 pontes dissulfeto é uma realização muito significativa. Os resultados deste trabalho mostram que o efeito inibitório da toxina recombinante não apresenta diferença significativa com o efeito da toxina nativa indicando que as toxinas devem apresentar estruturas semelhantes. Contudo, verificou-se diferença nos espectros dicróicos de ambas as toxinas o que pode ser devido à presença de 3 aminoácidos a mais na sequência da toxina recombinante (uma Alanina e uma Metionina na porção N-terminal e uma Glicina na porção C-terminal). Uma vez que a expressão da toxina recombinante possibilita a obtenção de maiores quantidades de peptídeo livre de contaminação, isso possibilita a realização de estudos estruturais para o esclarecimento dessas questões.

A toxina recombinante apresenta uma maior afinidade à isoforma de canal de sódio  $Na_v1.2$  do que aos outros, como pode-se observar em sua sequência de seletividade:  $rNa_v1.2 > rNa_v1.7 \approx rNa_v1.4 \geq rNa_v1.3 > mNa_v1.6 \geq hNa_v1.8$ . Esta característica, a de apresentar seletividade entre as diferentes isoformas de canais de sódio, é também observada em algumas toxinas presentes em veneno de caracóis marinhos do gênero *Conus*, as  $\mu$ -conotoxinas. Inclusive, a maior afinidade à isoforma  $Na_v1.2$  foi vista nas  $\mu$ -conotoxinas KIIIA (*Conus kinoshita*) em trabalho publicado por Zhang *et al*, (2007) e SIIIA (*Conus striatus*), trabalho de Yao *et al*, (2008). Através da comparação da sequência de aminoácidos da PnTx1 com a sequência da  $\mu$ -

conotoxina KIIIA, pôde-se observar uma importante similaridade no segmento central (Figura 24). De fato, pode-se identificar na sequência da PnTx1 os aminoácidos W33, R35 e K39 que tem alinhamento similar aos aminoácidos W8, R10 e R14, respectivamente, presentes na  $\mu$ -conotoxina KIIIA (Khoo *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2010). Esses aminoácidos são determinantes na seletividade da  $\mu$ -conotoxina KIIIA às isoformas de canais de sódio como pôde se observado em estudos com mutações sítio-dirigidas. Por exemplo, Van Der Haegen *et al*, (2011) mostraram que a substituição do triptofano na posição 8 por uma arginina alterou a seletividade da toxina que passou a ter maior afinidade à isoforma  $Na_v1.4$  em relação ao  $Na_v1.2$ . McArthur *et al*, (2011), substituíram a arginina na posição 14 por uma alanina. Dessa forma, a  $\mu$ -conotoxina KIIIA passou a inibir preferencialmente a isoforma  $Na_v1.7$  em relação às isoformas  $Na_v1.2$  e  $Na_v1.4$ . Nenhum estudo nesse sentido foi realizado com a rPnTx1 e muitas questões a respeito dessa toxina permanecem abertas, o que a torna um objeto interessante para futuros estudos.

Mostrou-se nesse estudo que a rPnTx1 não altera a cinética de ativação e inativação do canal de sódio (Figuras 9, 10 e 11). Esses dados sugerem que seu mecanismo inibitório não se dá pela alteração da cinética de abertura e fechamento do canal. A possibilidade dela estabilizar o estado de inativação rápida também foi excluído pelos resultados mostrados na Figura 13. Martin-Moutot *et al*, (2006) mostraram em ensaios de ligação que a PnTx1 compete com a  $\mu$ -conotoxina GIIB pelo seu sítio de ligação, que já foi caracterizado com

<u>AMAELTSCFPVGHECDGDASNCN</u>	rPnTx1 (1-23)
CCN-----CSSKWCRDHSRC-----C	KIIIA
CCGDDVYCGCGWGRWNCKCKVADQSYAYGIC	rPnTx1 (24-54)
KDKVNCPNRHLWPAKVCKKP CRRNCGG	rPnTx1 (55-81)

Figura 24: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das toxinas rPnTx1 e KIIIA. Aminoácidos idênticos estão destacados com fundo cinza escuro e similares com fundo cinza claro. Os três aminoácidos que não estão presentes na toxina nativa estão sublinhados.

sendo no sítio 1 dos canais de sódio. Curiosamente, esses pesquisadores também verificaram nesses estudos que a PnTx1 não compete com a TTX. Contudo a  $\mu$ -conotoxina GIIIB perde sua capacidade de deslocar a PnTx1 na presença de excesso de TTX. Isso significa que a PnTx1 e as  $\mu$ -conotoxinas têm diferentes sítios de ligações que se superpõem. Juntas, essas informações suportam a hipótese que a toxina rPnTx1 é uma toxina bloqueadora de poro. Os sítios de cargas positivas nesses peptídeos permitem que eles participem de numerosas interações eletrostáticas que podem contribuir para a sua ligação ao canal (Li *et al*, 2003) e para bloquear a condução iônica (Hui *et al*, 2002; Hui *et al*, 2003). Outra semelhança da rPnTx1 com as  $\mu$ -conotoxinas GIIIA e KIIIA é o fato de permanecer uma corrente residual mesmo em concentrações saturadas de toxina. Pode-se observar na figura 14 que a inibição máxima de corrente em canais  $Na_v1.2$  é de 85% e de 83,3% para a toxina nativa e recombinante, respectivamente. Como o canal de sódio  $Na_v1.2$  está expresso em populações homogêneas, significa que a inibição de cada canal deve ser incompleta. Isto pode acontecer pela diminuição da condutância unitária ou alteração da cinética de abertura do canal. Entretanto, foi mostrado nesse estudo que a cinética macroscópica do canal não foi alterada pela ligação da rPnTx1. Além disso, a PnTx1 não compete com toxinas que modificam a cinética de abertura (Santos *et al*, 1999), como as  $\alpha$ -toxinas de escorpião (sítio 3) e  $\beta$ -toxinas de escorpião (sítio 4) (Catterall, 1980; Campos *et al*, 2007). Uma possível explicação seria que a toxina bloquearia parcialmente o poro do canal. Experimentos de canal unitário (French *et al*, 2004; French *et al*, 2010), mostram que a  $\mu$ -conotoxina GIIIA (que se liga ao sítio 1 no canal de sódio) leva o canal ao estado de semi-condutância. French *et al* (2010)

propuseram que isso poderia ocorrer devido ao fato dessas toxinas serem grandes quando comparadas, por exemplo, à TTX. Elas, então, se ligariam mais superficialmente ao vestíbulo extracelular do poro do canal, permitindo, mesmo ligada, a passagem parcial de íons e de moléculas pequenas. A TTX, então, conseguiria se ligar ao canal numa região mais profunda do poro causando a inibição total da corrente. Estudos correlacionando os efeitos da  $\mu$ -conotoxina KIIIA com a TTX (Zhang *et al*, 2009), mostram que a TTX é capaz de ligar ao canal mesmo na presença da  $\mu$ -conotoxina, levando a completa inibição da corrente residual de sódio. Essa hipótese pode explicar a ausência de competição entre a PnTx1 e a TTX, observada por Martin-Moutot *et al*, (2006). Uma vez que se consiga mapear os sítios de interação molecular da PnTx1, este mapeamento poderá fornecer importantes esclarecimentos sobre a estrutura do vestíbulo extracelular do canal (Catterall *et al*, 2007). A seletividade da rPnTx1 às diferentes isoformas de canais de sódio ativados por voltagem mostra que a região externa do poro não é igual em todos os canais de sódio ativados por voltagem e essa observação fornece base conceitual para pesquisas de fármacos que sejam bloqueadores mais específicos.

O maior efeito quando a célula é mantida em potencial despolarizado é uma questão que ainda precisa ser esclarecida. Um possível mecanismo poderia ser a estabilização do canal no estado inativado. Contudo, como já mencionado, nos experimentos onde os canais se apresentavam com mutações no motivo IFM, a toxina recombinante inibiu significativamente as correntes de sódio. Adicionalmente, os resultados mostrados na Figura 12 e Tabela 4 mostram que a rPnTx1 não dificulta a recuperação da inativação

rápida, mostrando que este mecanismo não poderia explicar a ação inibidora desta toxina. Outra possível explicação seria maior exposição do sítio de ligação da rPnTx1 como consequência da manutenção do canal de sódio ao potencial despolarizado. Dessa forma, o efeito da toxina PnTx1 pode ser mais proeminente em células que permaneçam despolarizadas por longos períodos. Partton & Goldin, 1991 e Liu *et al*, (2011) mostraram que a TTX tem maior afinidade ao canal de sódio após prolongada despolarização do que após uma despolarização curta ou ao canal fechado. Como a TTX e a rPnTx1 se ligam ao canal na mesma região (sítio 1), esses resultados reforçam esta hipótese. Uma possível correlação deste fenômeno com a inativação lenta precisa ser melhor investigada.

Como já mencionado acima, a PnTx1 possui seletividade às isoformas de canais de sódio semelhantes às  $\mu$ -conotoxinas KIIIA, com maior afinidade aos canais  $\text{Na}_v1.2$  (Zhang *et al*, 2007). Estudos com essas  $\mu$ -conotoxinas têm mostrado que elas possuem um potente efeito analgésico (Zhang *et al*, 2007; Khoo *et al*, 2009), o que leva à hipótese que a rPnTx1 possua também essa característica. Essa hipótese é reforçada pelo fato da rPnTx1 ter uma alta afinidade à isoforma de canal de sódio  $\text{Na}_v1.7$ . Essa isoforma de canal de sódio já foi relacionado na literatura pelo seu envolvimento na dor aguda e inflamatória, o que gera um grande interesse na descoberta de fármacos com alta seletividade a essa isoforma de canal (Liu & Wood, 2011). É interessante que futuros estudos sejam realizados com o intuito de verificar o efeito da PnTx1 no mecanismo da dor. Por outro lado, seu efeito em canais  $\text{Na}_v1.2$  também pode ser de grande interesse. Dentre as canalopatias causadas por



hiperatividade da isoforma neuronal de canal de sódio  $Na_v1.2$  estão alguns tipos de epilepsia e a síndrome de Dravet (George Jr, 2005). Toxinas seletivas a essa isoforma podem ser instrumentos para o desenvolvimento de fármacos além de auxiliar no estudo estrutura-função desses canais.

## Conclusão

Nesse estudo, foi observado que a toxina recombinante rPnTx1 tem efeito inibitório em correntes de canais de sódio ativados por voltagem com seletividade a canais de sódio sensíveis e resistentes a TTX e nenhum efeito na isoforma  $Na_v1.5$  e em canais de artrópodes. A toxina recombinante tem maior efeito em canais  $Na_v1.2$  com o  $IC_{50}$  33 nM, o que a torna uma ferramenta interessante para estudos de canalopatias envolvendo esse canal. Além de permitir estudos de estrutura-função e a investigação dos mecanismos de seu efeito inibitório, o estudo das toxinas nativas e recombinantes de aranhas como a *Phoneutria nigriventer* pode abrir perspectivas para o entendimento de características específicas dos canais e o desenvolvimento de novos fármacos.

## Referências Bibliográficas

BIANCHI, L., DRISCOLL, M. Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. **WormBook**, v. 1, p. 1-16, 2006.

BROCHU, R.M., DICK, I.E., TARPLEY, J.W., MCGOWAN, E., GUNNER, D., HERRINGTON, J., SHAO, P.P., OK, D., LI, C., PARSONS, W.H., STUMP, G.L., REGAN, C.P., LYNCH, J.J., LYONS, K.A., MCMANUS, O.B., CLARK, S., ALI, Z., KACZOROWSKI, G.J., MARTIN, W.J., PRIEST, B.T. Block of peripheral nerve sodium channels selectively inhibits features of neuropathic pain in rats. **Molecular Pharmacology**, v. 69, p. 823–832, 2006.

CAMPOS, F.V. CHANDA, B., BEIRÃO, P.S.L., BENZANILLA, F.  $\beta$ -Scorpion toxin modifies gating transitions in all four voltage sensors of the sodium channel. **Journal of General Physiology**, v. 130, p. 257-268, 2007.

CAMPOS, F.V. CHANDA, B., BEIRÃO, P.S.L., BENZANILLA, F.  $\alpha$ -Scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels. **Journal of General Physiology**, v. 132, p. 251-263, 2008.

CATTERALL, W.A., Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 20, p. 15-43, 1980.

CATTERALL, W.A. From Ionic Currents to Molecular Review Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. **Neuron Review**, v. 26, p. 13–25, 2000.

CATTERALL, W.A. GOLDIN, A.L., WAXMAN, S.G. International union of pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationship of voltage-gated sodium channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 397-409, 2005.

CATTERALL, W.A., CESTÈLE, S., YAROV-YAROVOY, V., YU, F.H., KONOKI, K., SCHEUER, T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, p. 124–141, 2007.

CETÈLE, S., CATTERALL, W.A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v. 82, p. 883-892, 2000.

CHANDA, B., BENZANILLA, F. Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. *Journal of General Physiology*, v. 120, p. 629-645, 2002.

DE LIMA, M.E., PIMENTA, A.M.C., MARTIN-EAUCLAIRE, M. F., ZINGALI, R. B., ROCHAT, H. **Animal toxins: state of the art perspectives in health and biotechnology**. ed. UFMG, Belo Horizonte, 2009.

DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; JUNIOR, L.R.; KELLY, P.; FISCHER, S.; REIMANN, F.; OLIVEIRA, E.B.; RICHARDSON, M. The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. **FEBS Journal**, v. 263, p. 251-253, 1990.

DINIZ, M.R.V.; PAINE, M.J.I.; DINIZ, C.R.; THEAKSTON, R.D.G.; CRAMPTON, J.M. Sequence of the cDNA coding for the lethal neurotoxin Tx1 from the brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* predicts the synthesis and processing of a preprotoxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 15340-15342, 1993.

DINIZ, M.R.V., THEAKSTON, R.D.G., CRAMPTON, J.M., CORDEIRO, M.N., PIMENTA, A.M.C., DE-LIMA, M.E., DINIZ, C.R. Functional expression and purification of recombinant Tx1, a sodium channel blocker neurotoxin from the venom of the Brazilian "armed" spider, *Phoneutria nigriventer*. **Protein Expression and Purification**, v. 50, p. 18–24, 2006.

ECKERT, S.P., TADDESE, A., MCCLESKEY, E. W. Isolation and culture of rat sensory neurons having distinct sensory modalities. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 77, p. 183-190, 1997.

EKBERG, J., ADAMS, D.J. Neuronal voltage-gated sodium channel subtypes: key roles in inflammatory and neuropathic pain. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 2005–2010, 2006.

ENGLAND, S., de GROOT, M. J. Subtype-selective targeting of voltage-gated sodium channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, p. 1413–1425, 2009.

ESCOUBAS, P., DIOCHOT, S., CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**, v. 82, p. 893–907, 2000.

FAVRE, I., MOCZYDLOWSKI, E., SCHILD, L. On the structural basis for ionic selectivity among Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Ca<sup>+2</sup> in the voltage gated Na<sup>+</sup> channel. **Biophysics Journal**, v. 71, p. 3110–3125, 1996.

FIGUEIREDO, S.G., LIMA-PEREZ GARCIA, M.E., VALENTIM, A.C., CORDEIRO, M.N., DINIZ, C.R., RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the ‘armed’ spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). **Toxicon**, v 33, p. 83–93, 1995.

FIGUEIREDO, S.G., MAFRA, R.A., PIMENTA, A.M.C., CORDEIRO, M.N., DINIZ, C.R., DE LIMA, M.E. Purification and pharmacological activity of two potent insecticidal neurotoxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.3, p.84, 1997.

FRENCH, R.J., TERLAU, H. Sodium channels toxins-receptor targeting and therapeutic potential. **Current Medicine Chemistry**, v. 11, p. 3053-3064, 2004.

FRENCH, R.J., YOSHIKAMI, D., SHEETS, M.F., OLIVEIRA, B.M. The tetrodotoxina receptorof voltage-gated sodium channels- perspectives from interactions with  $\mu$ -conotoxins. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2153-2161, 2010.

GEORGE JR, A.L. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 1990-1999, 2005.

GOLDIN, A. L., BARCHI, R. L., CALDWELL, J. H., HOFMANN, F., HOWE, J. R., HUNTER, J. C., KALLEN, R. G., MANDEL, G., MEISLER, M. H., NETTER, Y. B., NODA, M., TAMKUN, M. M., WAXMAN, S. G., WOOD, J. N., CATTERALL, W. A. Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. **Neuron**, v. 28, p. 365–368, 2000.

GOMEZ, M.V.; KALAPOTHAKIS, E.; GUATIMOSIM, C.; PRADO, M.A.M. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, p. 579-588, 2002.

GOUVÊA DOS SANTOS, R.; SOARES, M.A.; CRUZ, J.S.; MAFRA, R.; LOMEIO, R. CORDEIRO, M.N.; PIMENTA, M.E.; DE LIMA, M.E. Tx1, from *Phoneutria nigriventer* spider venom, interacts with dihydropyridine sensitive-calcium channels in GH3 cells. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 269, p. 585-589, 2006.

HO, C., O'LEARY, M.E. Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 46, p. 159–166, 2011.

HUI, K., LIPKIND G., FOZZARD, H.A., FRENCH, R.J. Electrostatic and Steric Contributions to block of the skeletal muscle sodium channel by  $\mu$ -Conotoxin. **Journal of General Physiology**, v. 119 p. 45–54, 2002.

HUI, K., MCINTYRE, D., FRENCH, R.J. Conotoxins as sensors of local pH and electrostatic potential in the outer vestibule of the sodium channel. **Journal of General Physiology**, v. 122 p. 63–79, 2003.

KHOO, K.K., FENG, Z.-P., SMITH, B.J., ZHANG, M.-M., YOSHIKAMI, D., OLIVERA, B.M., BULAJ, G., NORTON, R.S. Structure of the analgesic  $\mu$ -Conotoxin KIIIA and effects on the structure and function of disulfide selection. **Biochemistry**, v. 48, p. 1210–1219, 2009.

KUSHMERICK, C., KALAPOTHAKIS, E., BEIRÃO, P.S., PENAFORTE, C.L., PRADO, V.F., CRUZ, J.S., DINIZ, C.R., CORDEIRO, M.N., GOMEZ, M.V., ROMANO-SILVA, M.A., PRADO, M.A. Phoneutria nigriventer toxin 3-1 blocks A-type k<sup>+</sup> currents controlling Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency in GH3 cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, p. 1472-1481, 1999.

LEÃO, R. M., CRUZ, J. S., DINIZ, C. R., CORDEIRO, M. N., BEIRÃO, P. S. L. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the  $\omega$ -Phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 1756–1767, 2000.

LEWIS, R.J., DUTERTRE, S., VETTER, I., CHRISTIE, M.J. Conus venom peptide pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 64, p. 259-298, 2012.

LI, R.A., HUI, K., FRENCH, R.J., SATO, K., HENRIKSON, C.A., TOMASELLI, G.F., MARBÁN, E. Dependence of  $\mu$ -Conotoxin block of sodium channels on ionic strength but not on the permeating [Na<sup>+</sup>]. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 30912–30919, 2003.

LIU, M., WOOD, J.N. The role of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of neuropathic pain, **Pain Medicine**, v.12, p. 93-99, 2011.

LIU, Y., BECK, E.J., FLORES, C.M. Validation of patch clamp screening protocol that simultaneously measures compound activity in multiple states of the voltage-gated sodium channel Nav1.2. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 9, p. 628-634, 2011.

MAFRA, R.A., FIGUEIREDO, S.G., DINIZ, C.R., CORDEIRO, M.N., CRUZ, J.D. DE LIMA, M.E. PhTx4, a new class of toxins from Phoneutria nigriventer spider

venom, inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes. **Brain Research**, v. 831, p. 297-300, 1999.

MARTIN-MOUTOT, N., MANSUELLE, P., ALCARAZ, G., GOUVÊA DOS SANTOS, R., CORDEIRO, M.N., DE LIMA, M.E. SEAGAR, M., VAN RENTERGHEM. *Phoneutria nigriventer* toxin 1: a novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with  $\mu$  conotoxin binding sites. **Molecular Pharmacology**, v. 69, p. 1931–1937, 2006.

MATAVEL, A., FLEURY, C., OLIVEIRA, L.C., MOLINA, F., DE LIMA, M.E., CRUZ, J.S., CORDEIRO, M.N., RICHARDSON, M., RAMOS, C..I., BEIRÃO, P.S.L. Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics. *Biochemistry*, v. 48, p. 3078-3088, 2009.

McARTHUR, J.R., SINGH, G., McMASTER, D., WINKFEIN, R., TIELEMAN, D.P., FRENCH, R.J. Interactions of key charged residues contributing to selective block of neuronal sodium channels by  $\mu$ -conotoxin KIIIA. **Molecular Pharmacology**, v. 80, p. 573-584, 2011.

MORAES, E. R., KALAPOTHAKIS, E., NAVES, L. A., KUSHMERICK, C. Differential effects of *Tityus bahiensis* scorpion venom on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium currents. **Neurotoxin Research**, v. 19, p. 102–114, 2011.

PAYANDEH, J., SCHEUER, T., ZHENG, N., CATTERALL, W.A. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel, *Nature*, v. 475, p. 353-359, 2011.

REZENDE Jr., L., COREDEIRO, M.N., OLIVEIRA, E.B, DINIZ, C.R. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon**, v. 29, p. 1225–1233, 1991.

RICHARDSON, M., PIMENTA, A. M. C., BEMQUERER, M. P., SANTORO, M. M., BEIRÃO, P. S. L., DE LIMA, M. E., FIGUEIREDO, S. G., BLOCH JR, C., VASCONCELOS, E. A. R., CAMPOS, F. A. P., GOMES, P. C., CORDEIRO, M.



N. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 142, p. 173–187, 2006.

SANTOS, R. G., DINIZ, C. R., CORDEIRO, M. N., DE LIMA, M. E. Binding sites and actions of Tx1, a neurotoxin from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, in guinea pig ileum. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1565-1569, 1999.

TORRES, F. S., SILVA, C. N., LANZA, L. F., SANTOS, A. V., PIMENTA, A. M. C., DE LIMA, M. E., DINIZ, M. R. V. Functional expression of a recombinant toxin – rPnTx2-6 – active in erectile function in rat. **Toxicon**, v. 56, p. 1172–1180, 2010.

VAN DER HAEGEN, A., PEIGNEUR, S., TYTGAT, J. Importance of position 8 in  $\mu$ -conotoxin KIIIA for voltage-gated sodium channel selectivity. **FEBS Journal**, v. 278, p. 3408–3418, 2011.

VENEMA, V.J., SWIDEREK, K.M., LEE, T.D., HATHAWAY, G.M., ADAMS, M.E. Antagonism of synaptosomal Ca channels by sub-types of omega-agatoxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 2610–2615, 1992.

WEST, J.W., PATTON, D.E., SCHEUER, T., WANG, Y., GOLDIN, A.L., CATTERALL, W.A. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast  $\text{Na}^+$ -channel inactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 10910–10914, 1992.

YAO, S., ZHANG, M-M., YOSHIKAMI, D., AZAM, L., OLIVERA, B.M., BULAJ, G., NORTON, R.S. Structure, dynamics, and selectivity of the sodium channel blocker  $\mu$ -conotoxin SIIIA. *Biochemistry*, v. 47, p. 10940-10949, 2008.

ZHANG, M-M., GREEN, B.R., CATLIN, P., FIELDLER, B., AZAM, L., CHADWICK, A., TERLAU, H., McARTHUR, J.R., FRENCH, R.J., GULYAS, F., RIVIER, J.E., SMITH, B.J., NORTON, R.S., OLIVERA, B.M., YOSHIKAMI, D.,

BULAJ, G. Structure/function characterization of  $\mu$ -conotoxina KIIIA, an analgesic, nearly irreversible blocker of mammalian neuronal sodium channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 30699–30706, 2007.

ZHANG, M-M., McARTHUR, J.R., AZAM, L., BULAJ, G., OLIVERA, B.M., FRENCH, R.J., YOSHIKAMI, D. Synergistic and antagonistic interactions between tetrodotoxin and  $\mu$ -Conotoxin in blocking voltage-gated sodium channels. **Channels**, v. 3, p. 32–38, 2009.

ZHANG, M-M., HAN, T.S., OLIVERA, B.M., BULAJ, G., YOSHIKAMI, D.  $\mu$ -Conotoxin KIIIA derivatives with divergent affinities *versus* efficacies in blocking voltage-gated sodium channels. **Biochemistry**, v. 49, p. 4804–4812, 2010.

## **Anexo:** Publicação Científica